

Comparing the Antibacterial Properties of Chitin, Chitosan and Chito-oligomers Extracted from Shell of *Metapenaeus affinis*

Mohammad Sadegh Khakshoor¹,
Jamileh Pazooki²

¹ PhD Student in Marine Biology, Faculty of Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Professor, Department of Aquatic Biology and Biotechnology, Faculty of Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

(Received Jan 25, 2017 Accepted May 15, 2017)

Abstract

Background and purpose: Chitin is one of the main components of crustaceans' exoskeleton. Chitosan is produced by deacetylation of chitin. Molecular weight and degree of deacetylation play important roles in biological activity of chitin, chitosan, and their derivatives. So far, various derivatives of chitin and chitosan are obtained. The purpose of this study was to prepare derivatives of chitin and chitosan derived from the shells of shrimp (*Metapenaeus affinis*) to compare their antibacterial properties.

Materials and methods: By investigating different factors, the best condition was determined for extracting chitin and chitosan from the shell of *Metapenaeus affinis*. N-acetyl chitoooligosaccharides and chitoooligosaccharides oligomers were prepared through chemical hydrolysis of chitin and chitosan, respectively. The antimicrobial properties of four polymers obtained were investigated on four bacterial strains and compared with an emphasis on molecular weight and percentage of deacetylation

Results: The amounts of ash, moisture, protein, and molecular weight of chitin was found to be more than those of chitosan. But, the degree of deacetylation of chitosan was much higher than that of chitin. The highest and lowest antibacterial activity was seen in chitoooligomers and chitin, respectively. Chitin (somewhat) and chitosan showed bacteriostatic properties against most strains. But, the oligomers revealed bactericidal activity against most of the strains.

Conclusion: This study showed that a product with higher purity can be obtained by manipulating the extraction method (demineralization and deproteinization). Moreover, antibacterial activity is directly related to reduced molecular weight and increased percentage of deacetylation, so, oligomers showed more antibacterial properties.

Keywords: Crustaceans, oligochitosans, biological activity, molecular weight, deacetylation

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (151):62-73 (Persian).

مقایسه ی خواص ضد باکتری کیتین، کیتوزان و کیتوالیگومرهای به دست آمده از پوسته ی میگوی سفید سر تیز (*Metapenaeus affinis*)

محمد صادق خاکشور¹

جمیله پازوکی²

چکیده

سابقه و هدف: کیتین یکی از اجزای اصلی اسکلت خارجی سخت پوستان می باشد. کیتوزان با حذف گروه های استیل از روی مولکول کیتین حاصل می شود. وزن مولکولی و درصد داستیله نقش تعیین کننده ای در خواص زیستی کیتین، کیتوزان و مشتقات آن ها دارد. تاکنون مشتقات مختلفی از کیتین و کیتوزان به دست آمده است. با این تفاسیر هدف این مطالعه تهیه مشتقات کیتوالیگومری از کیتین و کیتوزان دست آمده از پوسته میگوی سفید سر تیز (*Metapenaeus affinis*) و مقایسه خواص ضد باکتری آن ها می باشد.

مواد و روش ها: با بررسی سطوح مختلف فاکتورهای مختلف، بهترین حالت برای استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته ی میگوی سفید سر تیز استفاده شد. الیگومرهای N- استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید به ترتیب با هیدرولیز شیمیایی کیتین و کیتوزان تهیه شدند. خواص ضد میکروبی 4 پلیمر به دست آمده روی چهار سویه ی باکتریایی با تاکید بر وزن مولکولی و درصد داستیله مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: مقدار خاکستر، رطوبت، پروتئین و وزن مولکولی کیتین بیش تر از کیتوزان محاسبه شد. اما درصد داستیله کیتوزان خیلی بیش تر از کیتین بود. بیش ترین کم ترین فعالیت ضد باکتری به ترتیب مربوط به کیتو الیگومرها و کیتین بود. کیتین تا حدودی و کیتوزان روی اکثر سویه ها خاصیت باکتریوستاتیک از خود نشان دادند. اما الیگومرهای N- استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید روی اکثر سویه ها فعالیت باکتریسیدال داشتند.

استنتاج: نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد که با دستکاری در مراحل استخراج (حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی)، می توان مشتقاتی با خلوص بالاتر تهیه نمود. از آنجایی که خواص ضد میکروبی ارتباط مستقیمی با کاهش وزن مولکولی و افزایش درصد داستیله دارد، کیتوالیگومرها خواص ضد میکروبی بیش تری از خود نشان دادند.

واژه های کلیدی: سخت پوستان، الیگوکیتوزان، فعالیت زیستی، وزن مولکولی، داستیله

مقدمه

پلیمری است که بخش اصلی اسکلت خارجی سخت پوستان را تشکیل می دهد و کیتوزان نیز با داستیله شدن نسبی کیتین دست می آید (4، 3). کیتوزان و مشتقات آن

در طی سال های اخیر، مطالعات مختلفی روی پلیمرهای کیتین، کیتوزان و مشتقات آن ها به عنوان ترکیبات زیست فعال صورت گرفته است (2، 1). کیتین

Email: pazooki2001@yahoo.com

مؤلف مسئول: جمیله پازوکی - تهران، ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی

1. دانشجوی دکتری زیست شناسی جانوران دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

2. استاد، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1395/11/6 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/11/10 تاریخ تصویب: 1396/2/25

کاربردهای زیادی در صنایع غذایی، آرایشی، کشاورزی و پزشکی دارند(5). با این وجود وزن مولکولی بالای کیتوزان باعث افزایش ویسکوزیته و کاهش حلالیت و در نتیجه محدودیت استفاده در برخی صنایع مختلف می شود(1). از این رو مطالعات مختلفی برای افزایش حلالیت کیتوزان و تبدیل آن به الیگوساکاریدها و در نتیجه افزایش زمینه های کاربردی آن تاکنون انجام شده است(6). کیتوزان به همراه الیگوساکاریدها و کیتوالیگوساکاریدهای مشتق شده از آن ترکیباتی با پتانسیل ضد میکروبی، آنتی اکسیدان و ضد سرطان می باشند(7). بررسی فعالیت ضد میکروبی کیتین، کیتوزان و مشتقات آن ها در طی سال های اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است(2). خواص ضد میکروبی کیتوزان شدیداً به خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن از جمله وزن مولکولی و درصد داستیله بستگی دارد. افزایش درصد داستیله و کاهش وزن مولکولی در قالب الیگومرهای کیتوزانی باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی کیتوزان می شود(8،1). در این مطالعه خواص ضد میکروبی کیتین، کیتوزان و کیتوالیگوساکاریدهای به دست آمده از پوسته میگوی سفید سرتیز با تاکید بر وزن مولکولی و درصد داستیله مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه ها

نمونه های میگوی سفید سرتیز (*Metapenaeus affinis*) در قالب صید ضمنی و با استفاده از تور ترال کف از آب های دور از ساحل بندر عباس در تابستان 1394 جمع آوری شد. پس از شستشو و حذف مواد آلی محلول و دیگر ناخالصی های نمونه ها، اسکلت خارجی آن ها به صورت دستی جدا، خشک (دمای 55 درجه سانتی گراد) و پودر گردید (250 میکرون). تا زمان

آزمایش نمونه ها در پلاستیک های زیپ دار و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج کیتین و کیتوزان

برای حذف ترکیبات معدنی از غلظت های 0/25 تا 2 مولار اسید کلریدریک (Merkcompany) و مدت زمان 10 تا 120 دقیقه استفاده شد. نسبت پودر اسکلت به اسید از 1:10 تا 1:30 (w/v) و دمای 25 تا 100 درجه سانتی گراد متغیر بود(9). هیدروکسید سدیم (Merk company) با غلظت 0/5 تا 5 مولار، زمان 10 تا 400 دقیقه، دمای 20 تا 100 درجه سانتی گراد و نسبت پودر به باز از 1:10 تا 1:30 برای بررسی بهترین حالت برای حذف ترکیبات پروتئینی استفاده شد(9). برای حذف ترکیبات رنگدانه ای کیتین استخراج شده به نسبت 1:10 (w/v) با استن مخلوط و پس از 10 دقیقه آن را صاف کرده و به مدت 2 ساعت در دمای محیط خشک گردید. در ادامه رنگزدایی با هیپوکلریت سدیم 0/32/32 درصد به مدت 5 دقیقه و نسبت مشابه با استن انجام شد(1). با بررسی حالت های مختلف بهترین حالت برای حذف ترکیبات معدنی (اسید کلریدریک 2 مولار، زمان 60 دقیقه، دمای 50 درجه سانتی گراد و نسبت 1:15 پودر به اسید) و پروتئینی (هیدروکسید سدیم 2 مولار، زمان 200 دقیقه، دمای 75 درجه سانتی گراد و نسبت 1:20 پودر به باز) و تولید کیتین انتخاب شد. با استفاده از هیدروکسید سدیم 50 درصد، نسبت 1:15 (w/v) پودر به باز، دمای 100 درجه سانتی گراد و مدت زمان 2 ساعت کیتین به کیتوزان تبدیل شد(1). در پایان هر مرحله محلول با کاغذ فیلتر (Whatman No. 3) صاف، با آب مقطر برای رسیدن به pH خنثی شستشو و در دمای 60 درجه سانتی گراد خشک گردید. درصد رطوبت و ترکیبات معدنی و پروتئینی کیتین و کیتوزان استخراج شده اندازه گیری شد(10).

اندازه گیری درصد داستیله به روش Ming-Tsung و همکاران (11) و محاسبه وزن مولکولی کیتین و کیتوزان نیز با استفاده از روش Mirzadeh میرزاده و همکاران (12) انجام شد.

تهیه الیگومرهای کیتوالیگوساکارید و N-استیل کیتو الیگوساکارید

با هیدرولیز شیمیایی 1 گرم کیتین با 50 میلی لیتر اسید کلریدریک 7 نرمال در دمای 70 درجه سانتی گراد و به مدت 3 ساعت، الیگومر N-استیل کیتو الیگوساکارید تهیه شد. با هیدرولیز 1 گرم کیتوزان با 50 میلی لیتر اسید کلریدریک 6/27 نرمال در دمای 55 درجه سانتی گراد و به مدت 3 ساعت نیز الیگومر کیتوالیگوساکارید تهیه شد (1).

مطالعه ضد باکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی کیتین، کیتوزان، N-استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید روی 2 باکتری گرم مثبت شامل *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189) و *Bacillus subtilis* (PTCC 1156) و 2 باکتری گرم منفی شامل *Escherichia coli* (PTCC 1176) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1310) بررسی شد. سویه های باکتریایی از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی تهیه گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی استاندارد هر سویه به محیط های کشت مایع مولر هینتون برات (Merk company) حاوی غلظت 0/1 درصد پلیمرهای استخراج شده به صورت جداگانه تلقیح و در دمای 37 درجه سانتی گراد و به روش کشت در ارلن متحرک¹ گرم خانه گذاری شد. با اندازه گیری جذب محیط کشت های باکتریایی (Optical Density) در طول موج 640 nm در طی زمان (0، 2، 4، 6، 8، 10 و

12 ساعت پس از کشت) نمودارهای فعالیت ضد باکتریایی 4 پلیمر مورد نظر در غلظت 0/1 درصد رسم گردید. از غلظت های 0/1، 0/05، 0/01 و 0/005 درصد کیتین، کیتوزان، N-استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید برای اندازه گیری کمتر کم ترین غلظت بازدارنده رشد (MIC) (کم ترین غلظتی که کاملاً مانع رشد باکتریایی در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 72 ساعت گرمخانه گذاری می شود) استفاده شد (1).

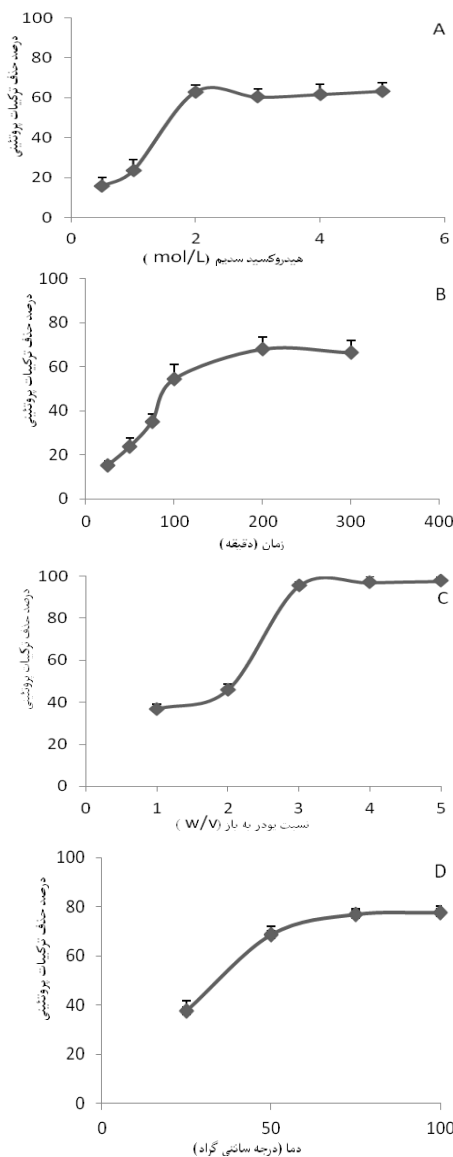
یافته ها

از بین 5 غلظت اسید کلریدریک مورد استفاده برای حذف ترکیبات معدنی، بهترین بازده از غلظت 2 مولار به دست آمد (شکل شماره 1، A). دمای 50 درجه سانتی گراد نیز بهترین دما برای حذف ترکیبات معدنی محاسبه شد (تصویر شماره 1، D). هم چنین بهترین بازده حذف ترکیبات معدنی با استفاده از نسبت w/v 1:15 پودر به اسید و زمان 60 دقیقه به دست آمد (تصویر شماره 1، B و C). همان طور که در تصویر شماره 1 نشان داده شده است، فاکتورهای غلظت اسید و زمان فرایند نقش کلیدی در حذف ترکیبات معدنی دارند. بهترین بازده حذف ترکیبات پروتئینی از پودر پوسته ی میگو نیز با استفاده از غلظت 2 مولار هیدروکسید سدیم، دمای 75 درجه سانتی گراد، نسبت w/v 1:20 پودر به باز و در زمان 200 دقیقه به دست آمد (تصویر شماره 2). با توجه به تصویر شماره 2، نسبت پودر به باز فاکتور کلیدی تری برای حذف ترکیبات پروتئینی می باشد. مقادیر کیتین و کیتوزان به دست آمده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها در جدول شماره 1 آورده شده است. وزن مولکولی کیتوزان نسبت به کیتین کم تر و درصد داستیله ی آن به مراتب بیش تر می باشد.

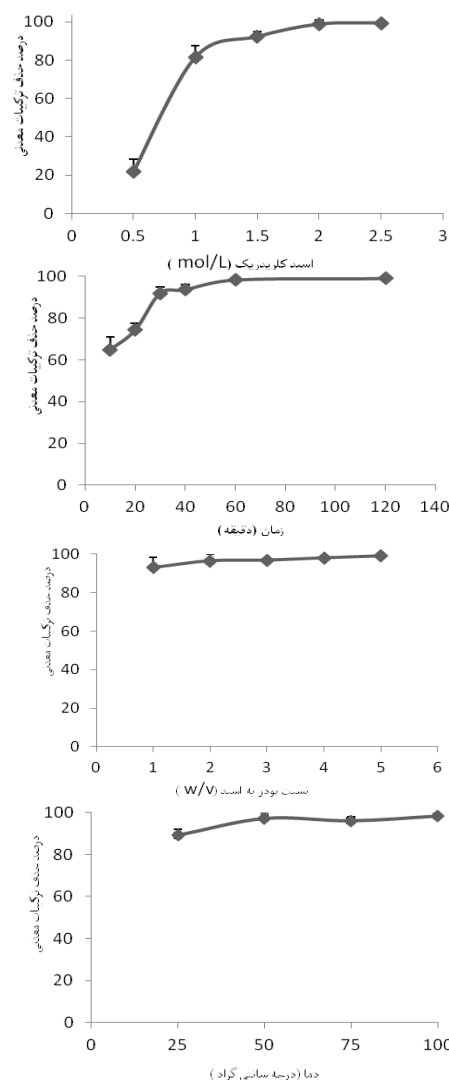
1. Shaking flask method

جدول شماره 1: ویژگی های فیزیکوشیمیایی کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته میگوئی سفید سر تیز (*Metapenaeus affinis*)

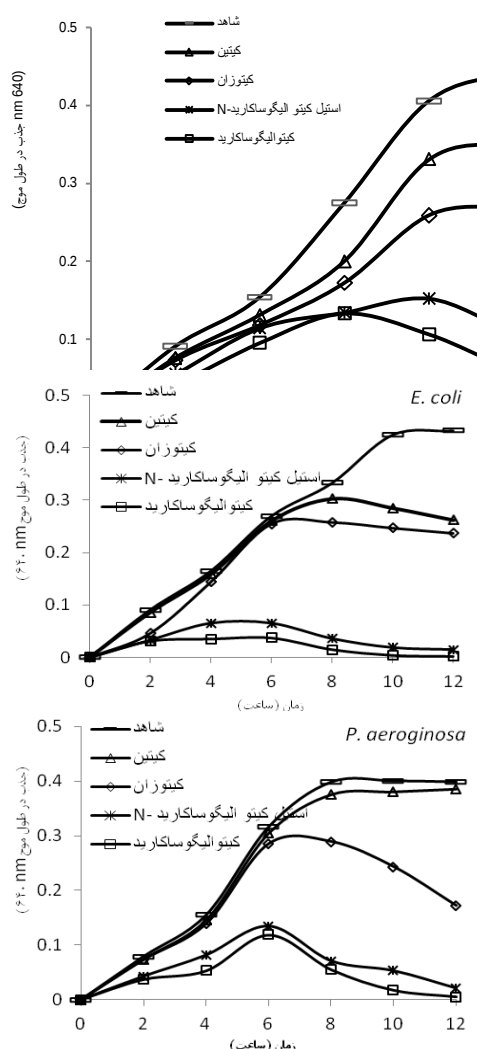
نمونه	مقدار استخراج شده (%)	خاکستر (درصد)	رطوبت (درصد)	پروتئین (%)	وزن مولکولی (دالتون)	دانسیته (درصد)
کیتین	18/6±/21	66±/09	23/24±/31	3/21±/1	450000	22
کیتوزان	16/2±/1	39±/06	6/51±/1	1/49±/08	26000	82/5



تصویر شماره 2: (A): تاثیر غلظت هیدروکسید سدیم بر حذف ترکیبات پروتئینی (دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به باز و مدت زمان 120 دقیقه، (B): تاثیر مدت زمان واکنش بر حذف ترکیبات پروتئینی (غلظت 2 مولار هیدروکسید سدیم، دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به باز، (C): تاثیر نسبت پودر به باز (w/v) بر حذف ترکیبات پروتئینی ((1:10=1)، (1:15=2)، (1:20=3)، (1:25=4)، (1:30=5)، غلظت 2 مولار هیدروکسید سدیم، دمای 25 درجه سانتی گراد و مدت زمان 120 دقیقه)، (D): تاثیر دمای واکنش بر حذف ترکیبات پروتئینی (غلظت 2 مولار هیدروکسید سدیم، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به باز و مدت زمان 120 دقیقه).



تصویر شماره 1: (A): تاثیر غلظت اسید کلریدریک بر حذف ترکیبات معدنی (دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به اسید و مدت زمان 30 دقیقه، (B): تاثیر مدت زمان واکنش بر حذف ترکیبات معدنی (غلظت 1/5 مولار اسید کلریدریک، دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به اسید، (C): تاثیر نسبت پودر به اسید (w/v) بر حذف ترکیبات معدنی ((1:10=1)، (1:15=2)، (1:20=3)، (1:25=4)، (1:30=5)، غلظت 1/5 مولار اسید کلریدریک، دمای 25 درجه سانتی گراد و مدت زمان 30 دقیقه)، (D): تاثیر دمای واکنش بر حذف ترکیبات معدنی (غلظت 1/5 مولار اسید کلریدریک، نسبت 1:15 (w/v)) پودر به اسید و مدت زمان 30 دقیقه).



تصویر شماره 3: تاثیر کیتین، کیتوزان، N-استیل کیتو الیگوساکارید و کیتو الیگوساکارید روی سویه های باکتریایی

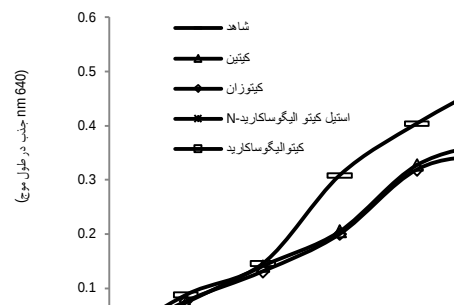
بحث

کیفیت کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته میگو با توجه به فاکتورهای تاثیر گذار در این فرایند می تواند متغیر باشد. فاکتورهای غلظت اسید و باز، زمان، دما و نسبت پودر اولیه به اسید و باز می تواند روی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و در نتیجه روی خواص زیستی از جمله خواص ضد میکروبی محصول نهایی تاثیر گذار باشد. بنابراین بررسی حالت ای مختلف این فاکتورهای تاثیر گذار روی کیفیت کیتین، کیتوزان و

N-استیل کیتو الیگوساکارید و کیتو الیگوساکارید نسبت به کیتین و کیتوزان مقادیر MIC کمتری را از خود نشان دادند که نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی قوی تر این مشتقات می باشد (جدول شماره 2). کمترین غلظت بازدارنده رشد کیتین و کیتوزان به ترتیب 0/1 و 0/05 درصد بود. محدوده MIC N-استیل کیتو الیگوساکارید و کیتو الیگوساکارید نیز بین 0/01 و 0/05 درصد محاسبه شد. در شکل شماره 3، جذب نوری (optical density, OD) در طول موج 640 nm را در طی زمان کشت برای کیتین، کیتوزان و الیگومرهای آن ها در غلظت 0/1 درصد نشان می دهد که میزان فعالیت ضد باکتری بر اساس درصد مهار کلنی زایی باکتریایی بیان شده است. همان طور که از نتایج می توان فهمید، پلیمرهای استخراجی بر اساس وزن مولکولی و نوع سویه باکتری فعالیت ضد میکروبی متفاوتی دارند.

جدول شماره 2: کمترین غلظت بازدارنده رشد کیتین، کیتوزان و مشتقات آن ها به منظور مقایسه فعالیت ضد باکتری آن ها

کیتو الیگوساکارید	N-استیل کیتو الیگوساکارید	MIC (درصد)	
		کیتوزان	کیتین
<i>Staphylococcus aureus</i>	0/01	0/1	< 0/1
<i>Bacillus subtilis</i>	0/01	0/1	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/01	0/05	< 0/1
<i>Escherichia coli</i>	0/01	0/05	0/1



مشتقات آن‌ها در مراحل حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی در بسیاری از مطالعات مورد توجه محققین مختلف بوده است. در حالی که برای حذف ترکیبات معدنی پوسته‌ی سخت پوستان از غلظت‌های بین 1 تا 8 درصد اسید استفاده می‌شود، اما افزایش غلظت اسید تا حد مشخصی (2 مولار در این مطالعه) باعث افزایش بازده می‌شود (13).

در مطالعه Felicity و همکاران، تفاوت معنی‌داری در غلظت بیش‌تر از 5 درصد اسید کلریدریک برای حذف ترکیبات معدنی پوسته‌ی میگو مشاهده نشد (14). Percot و همکاران نسبت 1:40 (اسید کلریدریک 0/25 مولار) را برای پوسته‌ی میگو پیشنهاد دادند (15). در مطالعه Mahmoud و همکاران (16) و Charoen vuttitham و همکاران (17)، نسبت 1:20 اسید کلریدریک (0/25 مولار) برای حذف ترکیبات معدنی از پوسته سخت پوستان پیشنهاد شده است که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. حذف کامل ترکیبات معدنی زمانی اتفاق می‌افتد که حجم اسید مورد استفاده از نظر وزن مولکولی عناصر بیش‌تر از محتوی ترکیبات معدنی باشد (18). افزایش بیش از حد دما باعث افزایش معنی‌دار بازده نمی‌شود، بلکه ممکن است اثرات منفی روی ساختار کیتین داشته باشد که نتایج مطالعه‌ی حاضر را تایید می‌کند (13).

در مطالعه Al Sagheer و همکاران، بهترین بازده حذف ترکیبات معدنی از پوسته‌ی میگو در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به‌دست‌آمد که با نتایج مطالعه Mahmoud و همکاران و مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (16، 19). اگرچه افزایش زمان باعث کاهش محتوی ترکیبات معدنی می‌شود، اما می‌تواند باعث دگرگونی ساختار کیتین نیز بشود (13، 18). هم‌چنین در مطالعه‌ی Percot و همکاران، زمانی حدود 15 دقیقه برای حذف ترکیبات معدنی از پوسته میگو پیشنهاد شده است (15). ترکیبات پروتئینی با پیوندهای کووالانسی با کیتین در

ارتباط بوده و رسیدن به دپروتئینه کردن 100 درصد، مشکل می‌باشد.

در مطالعه Charoen vuttitham و همکاران بر خلاف مطالعه حاضر، تفاوت معنی‌داری در نسبت پودر به باز در بازده دپروتئینه شدن مشاهده نشد (17). اما در مطالعه Benhabiles و همکاران به مانند مطالعه حاضر، فاکتور نسبت پودر به باز در حذف ترکیبات پروتئینی بسیار تعیین‌کننده و نسبت 1:20 به عنوان بهترین حالت گزارش شده است (1). هم‌چنین در این مطالعه غلظت 2 نرمال، دمای 50 درجه سانتی‌گراد و زمان 100 دقیقه برای فرایند دپروتئینه کردن پیشنهاد شده است که با مطالعه Liang و Gengia (20) و نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. بهترین حالت برای حذف ترکیبات پروتئینی از پوسته‌ی میگو در مطالعه Bajaj و همکاران، غلظت 2/5 N NaOH، دمای 65 درجه سانتی‌گراد و زمان 4 ساعت گزارش شده است (21). Pranee و همکاران نیز بازده دپروتئینه شدن را تا افزایش غلظت باز تا 7 درصد معنی‌دار گزارش کرده‌اند (22).

آنالیزهای شیمیایی نشان داد که 18/6 درصد از اسکلت میگوی مورد مطالعه کیتین بود که با نتایج No و Meyers هم‌خوانی دارد (23). مقادیر بیش‌تر کیتین از برخی گونه‌های میگو از جمله *Peneus monodon* (25/73 درصد) و *Metapeneus monodon* (24/33 درصد) تاکنون گزارش شده است (17، 10). در مطالعه Al Sagheer و همکاران نیز کیتین استخراج شده از خرچنگ *Portunus segnis* 20/47 درصد گزارش شده است (19). در مطالعه حاضر پس از داستیله کردن کیتین مقدار کیتوزان 16/2 درصد محاسبه گردید. در برخی از مطالعات از جمله Tipparat و Oraphan (14/6 درصد) (24)، علیشاهی و همکاران (15/25 درصد) (10) مقادیر کم‌تر و در مطالعه Kucukgulmez و همکاران (17/48 درصد) (25) مقادیر کیتوزان بیش‌تری از گونه‌های مختلف سخت‌پوست گزارش کردند. در

مطالعه مشابه دیگری، محدوده کیتوزان استخراجی از پوسته‌ی خرچنگ 30-32/2 درصد گزارش شده است (26). در مطالعات گذشته، مقدار خاکستر کیتوزان با کیفیت را زیر 1 درصد گزارش کرده‌اند (23). مقادیر 0/61 و 0/45 درصد به ترتیب توسط علیشاهی و همکاران (10) و Kucukgulmez و همکاران (25) گزارش شده است که نسبت به مطالعه حاضر (0/39 درصد) بیش‌تر می‌باشد. اما به‌طور کلی کمیت و کیفیت کیتین و کیتوزان و مشتقات آن‌ها با توجه به نوع منبع، نوع گونه، فصل، تفاوت‌های اکولوژیکی و محیطی منطقه و روش استخراج متفاوت می‌باشد (27). وزن مولکولی کیتوزان در مطالعه‌ی حاضر (26000 دالتون) کم‌تر از وزن مولکولی کیتین (450000 دالتون) محاسبه گردید (جدول شماره 1). وزن مولکولی کیتین و کیتوزان به نوع منبع و روش استخراج بستگی دارد (28). مشابه مطالعه Benhabiles و همکاران، در مطالعه‌ی No و همکاران (23) روی اسکلت خارجی میگو وزن مولکولی کیتین به مراتب کم‌تر از وزن مولکولی کیتوزان گزارش شده است. دمای بالا باعث حل شدن اکسیژن شده و در نهایت باعث شکستن زنجیره کیتوزان در طی فرایند داستیله شدن می‌شود. بنابراین تهیه کیتوزان با درصد داستیله‌ی خاص بدون شکستن زنجیره‌ی مولکول کیتوزان مشکل می‌باشد (2).

N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید نسبت به کیتین و کیتوزان مقادیر MIC کم‌تری را از خود نشان دادند (0/05 درصد) که نشان‌دهنده‌ی فعالیت ضد میکروبی قوی‌تر این مشتقات می‌باشد (جدول شماره 2). در مطالعه Benhabiles و همکاران، کم‌ترین مقدار MIC برای N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید، 0/003 درصد گزارش شده است که از مقادیر مطالعه حاضر کم‌تر می‌باشد (1). هم‌چنین MIC کیتین و کیتوزان به‌مانند مطالعه‌ی حاضر از الیگومرها آن‌ها بیش‌تر می‌باشد (9). همان‌طور که از

نتایج جدول شماره 2 می‌توان فهمید، بیوپلیمرهای استخراجی با وزن مولکولی پایین‌تر قدرت بازدارندگی رشد بیش‌تری روی پاتوژن‌ها دارند.

کیتوزان فعالیت ضد میکروبی بیش‌تری از کیتین و کم‌تر از دیگر الیگومرها روی سویه‌ی *S. aureus* از خود نشان داد (تصویر شماره 3) که با مطالعه‌ی Benhabiles و همکاران هم‌خوانی دارد (1). در مطالعه حاضر محیط کشت‌های *S. aureus* تیمار شده با کیتوزان پس از 8 ساعت به‌انتهای رشد لگاریتمی رسیدند. اما در مطالعه Benhabiles، محیط کشت‌های سویه مذکور تیمار شده با کیتوزان پس از 4 ساعت وارد مرحله رشد سکون شدند (1). فعالیت ضد میکروبی کیتوزان در این مطالعه با گزارش Gerasimenko و همکاران روی اثر بازدارندگی رشد کیتوزان روی *S. aureus* مطابقت دارد (29). هم‌چنین در مطالعه Gerasimenko و همکاران، فعالیت ضد میکروبی کیتوزان با وزن مولکولی 12000 دالتون بیش‌تر از فعالیت کیتوزان با وزن مولکولی 27000 دالتون گزارش شده است که نتایج مطالعه حاضر را تایید می‌کند. در مطالعه Benhabiles و همکاران رشد سویه *S. aureus* تیمار شده با غلظت 0/1 درصد N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید پس از 2 ساعت متوقف شد که نسبت به مطالعه حاضر فعالیت بازدارندگی رشد شدیدتری نشان داده است (1).

غلظت 0/1 درصد دو پلیمر N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید پس از 12 ساعت رشد سویه‌ی *B. subtilis* را کاملاً متوقف کرد که این مدت زمان طولانی‌تر از مطالعه Benhabiles و همکاران (3 ساعت) می‌باشد (1). در تیمارهای با غلظت 0/1 درصد کیتین و کیتوزان نیز پس از 8 ساعت رشد سویه‌های *B. subtilis* متوقف شد که نسبت به مطالعه‌ی Benhabiles و همکاران (4 ساعت) طولانی‌تر است (1).

در مطالعه Gerasimenko و همکاران و Benhabiles و همکاران، حساسیت سویه های باسیلوس در برابر غلظت 0/1 درصد کیتوزان نسبت به همین غلظت کیتین بیش تر بوده است که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (1، 29). No و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و الیگومرهای آن ها روی *Bacillus* sp. با کاهش وزن مولکولی و ویسکوزیته افزایش می یابد. علت این پدیده را این گونه می توان توضیح داد که زنجیره های کیتوزان کوچک تر، توانایی برهمکنش بیش تری با سلول های باکتریایی دارند (30).

جمعیت باکتریایی *E. coli* در غلظت 0/1 درصد کیتین و کیتوزان به ترتیب پس از 8 و 6 ساعت وارد فاز سکون شدند. در بسیاری از مطالعات به مانند این مطالعه، فعالیت بازدارندگی کیتوزان روی رشد *E. coli* گزارش شده است (24، 31). غلظت 0/1 درصد N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید خاصیت ضد میکروبی بیش تری روی *E. coli* از خود نشان دادند. در مطالعه ی مشابه، Liu و همکاران الیگومرهای کیتوزانی (غلظت 0/5 درصد) با وزن مولکولی 3000 دالتون خاصیت ضد میکروبی بیش تری نسبت به الیگومرهای با وزن حدود 50000 دالتون از خود نشان دادند. می توان این گونه تفسیر کرد که افزایش ویسکوزیته کیتوالیگوساکارید با وزن بالاتر باعث کاهش فعالیت ضد میکروبی آن شده است (31). همان طور که نتایج نشان داده است، جمعیت باکتریایی در تیمارهای با 0/1 درصد کیتوزان کم تر از تیمار شاهد در طی زمان انکوبه (6-0 ساعت) می باشد که نشان دهنده قدرت بازدارندگی رشد کیتوزان در غلظت مذکور می باشد که با نتایج مطالعه Jeon و همکاران مطابقت دارد (32). با این وجود کیتین قابلیت بازدارندگی ضعیف تری روی رشد *P. aeruginosa* از خود نشان نداد. کیتوالیگوساکارید و N- استیل کیتوالیگوساکارید بازدارندگی بیش تری روی رشد *P. aeruginosa* نسبت به کیتین و کیتوزان از خود نشان دادند که با نتایج

مطالعه Bhhatt و همکاران مطابقت دارد (33). بر اساس نتایج به دست آمده، کیتوزان و کیتین خاصیت باکتریوستاتیک بیش تری نسبت به خاصیت باکتریوسیدال از خود نشان دادند. احتمال می رود این دو پلیمر با ایجاد فولیکول هایی در اطراف سلول های باکتریایی باعث عدم انتقال مواد غذایی مورد نیاز به سلول و احتمالاً باعث مرگ سلول می شوند (34). مولکول های کیتوزان با وزن مولکولی پایین تر قابلیت بیش تری برای باند شدن با بیش از یک سلول باکتریایی را دارند. در این شرایط پیوندهای بین سلول های باکتریایی و زنجیره ی کیتوزان سریعاً شکل گرفته و سلول باکتریایی غیرفعال می شود (34). از طرف دیگر پلیمرهای N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید را می توان به عنوان یک عامل باکتریوسیدال معرفی نمود. احتمال می رود که وزن مولکولی پایین این پلیمرها باعث عبور آن ها از دیواره سلولی و ایجاد پیوندهای چند لایه با غشا سلولی می شود (31).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر فاکتورهای غیر زیستی در مراحل حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی کیتین و کیتوزان روی خواص فیزیوشیمیایی و زیستی این پلیمرها تاثیر گذار می باشند. هم چنین مشتقات الیگوساکاریدی با وزن مولکولی کم تر و درصد خلوص بالاتر خواص ضد باکتری قوی تری را نسبت به کیتین و کیتوزان از خود نشان دادند. بنابراین با بررسی فاکتورهای تاثیر گذار در مراحل مختلف استخراج کیتین و کیتوزان می توان مشتقاتی با کیفیت و خواص زیستی بهتری را تهیه کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین آزمایشگاه تحقیقات و بیوتکنولوژی آبریان و خصوصاً خانم دکتر پازوکی جهت فراهم نمودن امکانات جهت انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می نمایم.

References

1. Benhabiles MS, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFF, Mameri N. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll* 2012; 29(1): 48-56.
2. Limam Z, Selmi S, Sadok S, El Abed A. Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: Biological and physicochemical properties. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(4):640-647.
3. Yen MT, Yang JH, Mau JL. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydr polym* 2009; 75(1): 15-21.
4. Bolat Y, Sengul B, Ali G, Levent L, Seval BK, Soner C, HabilUgur K. Chitin-chitosan yield of freshwater crab (PotamonPotamios, Oliver 1804) shell. *Pak Vet J* 2010; 30(4): 227-231.
5. Sugumar G, Ramesh U, Selvan A. Susceptibility of crab chitosan against *Staphylococcus aureus*. *Bioreseach Bulletin* 2010; 1(1): 7-9.
6. Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Li B, et al. Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical application. *Marine Drugs* 2010; 8(7):1962-1987.
7. Yang E J, Kim JG, Kim JY, Kim S, Lee N. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. *Cent Eur J Biol* 2010; 5(1): 95-102.
8. Mohan CO, Ravishankar CN, Lalitha KV, Srinivasa TK. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. *Food Hydrocoll* 2012; 26(1): 167-174.
9. Natarajan K, Sathish R, Regupathi T, Riyaz, A. Antibacterial activity of crude extracts of marine invertebrate *Polychinum madrasensis* Sebastian. *Indian J Sci Technol*. 2010; 3(3): 303-304.
10. Alishahi A, Mirvaghefi A, Tehrani MR, Farahmand H, Shojaosadati SA. Enhancement and Characterization of Chitosan Extraction from the Wastes of Shrimp Packaging Plants. *J Polym Environ* .2011; 19(3):776-783.
11. Ming-Tsung Y, Joan-Hwa Y, Jeng-Leum Mau. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym* 2008; 75(1): 15-21.
12. Mirzadeh H, Yaghoobi N, Amanpour S, Ahmadi H, Mohaghebi MA, Hormozi F. Preparation of chitosan derived from shrimp shell of Persian Gulf as blood haemostasis agents. *Iranian Polym J* .2002; 11(1): 63-68.(Persian)
13. Tango SA, Ghaly AE. A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*. *Appl Microb Biotechnol* 2002; 58(6): 712-720.
14. Felicity B, Clifford L, Michael A, Oghenekome O. Extraction and evaluation of chitosan from exoskeleton as a seed fungicide and plant growth enhancer. *American-Eurasian J Agric Environ Sci* 2007; 2(2): 103-111.
15. Percot A, Viton C, Domard A. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* .2003; 4(1): 12-18.

16. Mahmoud NS, Ghaly AE, Arab F. Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin Production. Am J Biochem Biotechnol .2007; 3 (1): 1-9
17. Charoenvuttitham P, Shi J, Mittal GS. Chitin Extraction from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Waste using Organic Acids. Sep Sci Technol. 2007; 41(6): 1135-1153.
18. Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. Crit Rev Food Sci Nutr .2003; 43 (2):145-171.
19. Al Sagheer FA, Al-Sughayer MA, Muslim S, Elsabee MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydr Polym. 2009; 77(2):410-419.
20. Liang BC, Gengia T. Response Surface Optimization and Kinetics of isolation chitin from Pink Shrimp (*Solenocera melanthro*) shell waste. J Agric Food Chem 1997; 45(5): 1900-1904.
21. Bajaj M, Winter J, Gallert C. Effect of deproteination and deacetylation condition on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste 2011. Biochem Engin J; 56(1-2): 51-62.
22. Pranee L, How NC, Suwalee C, Willem FS. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. Journal of Metals, Materials and Minerals. 2002 ;12 (1) : 11-18
23. No HK, Meyers SP. Preparation and characterization of chitin and chitosan: a review. J Aqua Food Pro Technol 1995; 4(2): 27-52.
24. Tipparat H, Oraphan R. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J Sci Technol 2008; 30(Suppl): 1-9.
25. Kucukgulmez A, Celik M, Yanar Y, Sen D, Polat H, Kadak AE. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. Food Chem 2011; 126(3): 1144–1148.
26. Tajik H, Moradi M, Razavi Rohani SM, Erfani AM, Shokouhi SJF. Preparation of Chitosan from Brine Shrimp (*Artemia urmiana*) Cyst Shells and Effects of Different Chemical Processing Sequences on the Physicochemical and Functional Properties of the Product. Molecules 2008; 13(3): 1263-1274.
27. Yamaguchi I, Itoh S, Suzuki M, Sakane MA, Tanaka J. The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. Biomaterials 2003; 24(12): 2031-2036.
28. Fernandez-Martin F, Arancibia M, Lopez-Caballero L, Gomez-Guillen C, Montero P, Fernandez-Garcia M. Preparation and Molecular Characterization of Chitosans Obtained from Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Shells. J Food Sci 2014; 79(9): 1722-1731.
29. Gerasimenko DV, Advienko ID, Bannikova GE, Zueva OY, Varlamov VP. Antibacterial effects of water soluble low molecular weight chitosans on different microorganisms. Prikl Biokhim Microbiol. 2004; 40(3): 253-257.
30. Marques A, Encarnação S, Pedro S, Nunes ML. In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and Chitosan against *Salmonella enteric*. World J Microbial Biotechnol 2002; 24(10): 2357-2360.

31. Liu N, Chen XG, Park HJ, Liu CA, Meng XA, Yu LJ. Effect of Mw and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. Carbohydr Polym. 2006.; 64: 60-65.
32. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydr. Polym 2001; 44(1): 71-76.
33. Bhatt LR, Kim BM, Nam SM, OH GS, Chai KY. Antimicrobial activity of water soluble chitosan oligomers with different molecular weights. Journal of Chitin and Chitosan 2009; 14(4): 179-181.
34. Wu XY, Zeng QX, Mo SF, Ruan Z. Antibacterial activity of chitosan with different degree of deacetylation and molecular masses. Journal of South China University Technology 2006; 34: 58-62.