ORIGINAL ARTICLE

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

Mohammad Sadegh Khakshoor[1],
Jamileh Pazooki[2]

[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 chitooligosaccharides and chitooligosaccharides 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 chitooligomers 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 151 مرداد سال 1396 (73-62)

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

محمد صادق خاکشور[1]
جمیله پازوکی[2]

چکیده

سابقه و هدف: کیتین یکی از اجزای اصلی اسکلت خارجی سخت پوستان می‌باشد. کیتوزان با حذف گروه‌های استیل از روی مولکول کیتین حاصل می‌شود. وزن مولکولی و درصد داستیله نقش تعیین‌کننده‌ای در خواص زیستی کیتین، کیتوزان و مشتقات آن‌ها 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 ضدباکتری آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: با بررسی سطوح مختلف فاکتورهای مختلف، بهترین حالت برای استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته‌ی میگوی سفید سرتیز 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 سویه‌ی باکتریایی با تاکید بر وزن مولکولی و درصد داستیله مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار خاکستر، رطوبت، پروتئین و وزن مولکولی کیتین بیش‌تر از کیتوزان محاسبه شد. اما درصد داستیله کیتوزان خیلی بیش‌تر از کیتین بود. بیش‌ترین کم‌ترین فعالیت ضد باکتری به ترتیب مربوط به کیتو الیگومرها و کیتین بود. کیتین تا حدودی و کیتوزان روی اکثر سویه‌ها خاصیت باکتریوستاتیک از خود نشان دادند. اما الیگومرهای N- استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید روی اکثر سویه‌ها فعالیت باکتریسیدال داشتند.

استنتاج: نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که با دستکاری در مراحل استخراج (حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی)، می‌توان 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 بیش‌تری از خود نشان دادند.

واژه های کلیدی: سخت‌پوستان، الیگوکیتوزان، فعالیت زیستی، وزن مولکولی، داستیله

مقدمه

در طی سال‌های اخیر، مطالعات مختلفی روی پلیمرهای کیتین، کیتوزان و مشتقات آن‌ها به عنوان ترکیبات زیست فعال صورت گرفته است(2 ،1). کیتین پلیمری است که بخش اصلی اسکلت خارجی سخت پوستان را تشکیل می‌دهد و کیتوزان نیز با داستیله شدن نسبی کیتین دست می‌آید(4 ،3). کیتوزان و مشتقات آن

مولف مسئول: جمیله پازوکی - تهران، ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی Email: pazooki2001@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

کاربردهای زیادی در صنایع‌غذایی، 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 می‌شود(1). از این‌رو مطالعات مختلفی برای افزایش حلالیت کیتوزان و تبدیل آن به الیگوساکاریدها و در نتیجه افزایش زمینه‌های 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 می‌باشند(7). بررسی فعالیت ضد میکروبی کیتین، کیتوزان و مشتقات آن‌ها در طی سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققیق را به خود جلب کرده است(2). خواص ضد میکروبی کیتوزان شدیدا 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 می‌شود(8،1). در این مطالعه خواص ضد میکروبی کیتین، کیتوزان و کیتوالیگوساکاریدهای به‌دست آمده از پوسته میگوی سفید سرتیز با تاکید بر وزن مولکولی و درصد داستیله مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های میگوی سفید سرتیز (Metapenaeus affinis) در قالب صید ضمنی و با استفاده از تور ترال کف از آب‌های دور از ساحل بندر عباس در تابستان 1394 جمع‌آوری شد. پس از شستشو و حذف مواد آلی محلول و دیگر ناخالصی‌های نمونه‌ها، اسکلت خارجی آن‌ها به صورت دستی جدا، خشک (دمای 55 درجه سانتی‌گراد) و پودر گردید (250 میکرون). تا زمان آزمایش نمونه‌ها در پلاستیک‌های زیپ‌دار و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

استخراج کیتین و کیتوزان

برای حذف ترکیبات معدنی از غلظت‌های 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 سانتی‌گراد متغیر بود(9). هیدروکسید سدیم (Merk company) با غلظت 0/5 تا 5 مولار، زمان 10 تا 400 دقیقه، دمای 20 تا 100 درجه سانتی‌گراد 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 رنگدانه‌ای 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 حالت‌های مختلف بهترین حالت برای حذف ترکیبات معدنی (اسید کلریدریک 2 مولار، زمان 60 دقیقه، دمای 50 درجه سانتی‌گراد و نسبت 1:15 پودر به اسید) و پروتئینی (هیدروکسید سدیم 2 مولار، زمان 200 دقیقه، دمای 75 درجه سانتی‌گراد و نسبت 1:20 پودر با باز) و تولید کیتین انتخاب شد. با استفاده از هیدروکسید سدیم 50 درصد، نسبت 1:15 (w/v) پودر به باز، دمای 100 درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد خشک گردید. درصد رطوبت و ترکیبات معدنی و پروتئینی کیتین و کیتوزان استخراج شده اندازه‌گیری شد(10).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

اندازه‌گیری 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 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 7 نرمال در دمای 70 درجه سانتی‌گراد و به مدت 3 ساعت، الیگومر N- استیل کیتو الیگوساکارید تهیه شد. با هیدرولیز 1 گرم کیتوزان با 50 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 6/27 نرمال در دمای 55 در جه سانتی‌گراد 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 aeroginosa (PTCC 1310) بررسی شد. سویه‌های باکتریایی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردیدند. سوسپانسیون باکتریایی استاندارد هر سویه به محیط‌های کشت مایع مولر هینتون براث (Merk company) حاوی غلظت 0/1 درصد پلیمرهای استخراج شده به صورت جداگانه تلقیح و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و به روش کشت در ارلن متحرک [1] گرم‌خانه‌گذاری شد. با اندازه‌گیری جذب محیط کشت‌های 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 غلظت‌های 0/1 ، 0/05، 0/01 و 0/005 درصد کیتین، کیتوزان، N- استیل کیتو الیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید برای اندازه‌گیری کمترکم‌ترین غلظت بازدارنده رشد (MIC) (کم‌ترین غلظتی که کاملاً مانع رشد باکتریایی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت گرمخانه گذاری می‌شود) استفاده شد(1).

یافته ها

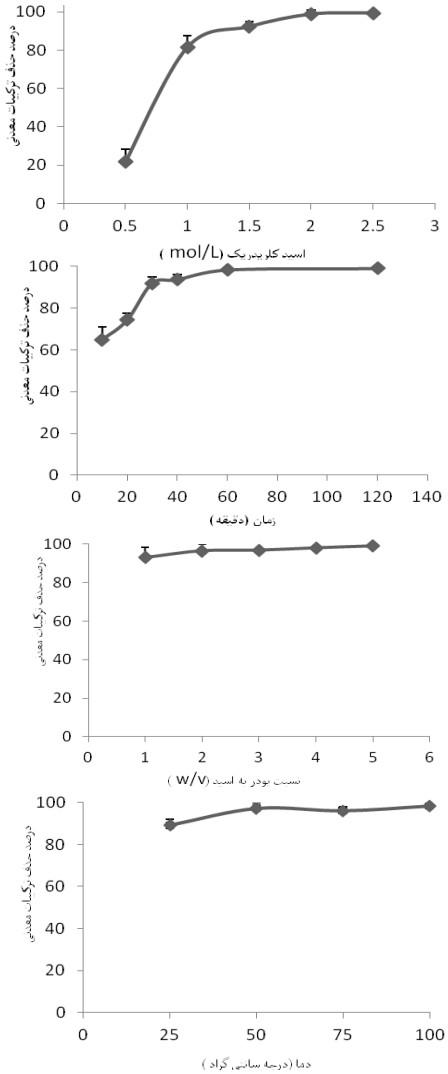
از بین 5 غلظت اسید کلریدریک مورد استفاده برای حذف ترکیبات معدنی، بهترین بازده از غلظت 2 مولار به‌دست‌آمد (شکل شماره 1، A). دمای 50 درجه سانتی‌گراد نیز بهترین دما برای حذف ترکیبات معدنی محاسبه شد (تصویر شماره 1، D). هم‌چنین بهترین بازده حذف ترکیبات معدنی با استفاده از نسبت w/v 1:15 پودر به اسید و زمان 60 دقیقه به‌دست‌آمد (تصویر شماره 1، B و C). همان‌طور 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 پوسته‌ی 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 به‌دست‌آمد (تصویر شماره 2). با توجه به تصویر شماره 2، نسبت پودر به باز فاکتور کلیدی‌تری برای حذف ترکیبات پروتئینی می باشد. مقادیر کیتین و کیتوزان به‌دست‌آمده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها در جدول شماره 1 آورده شده است. وزن مولکولی کیتوزان نسبت به کیتین کم‌تر و درصد داستیله‌ی آن به مراتب بیش‌تر می‌باشد.

1. Shaking flask method

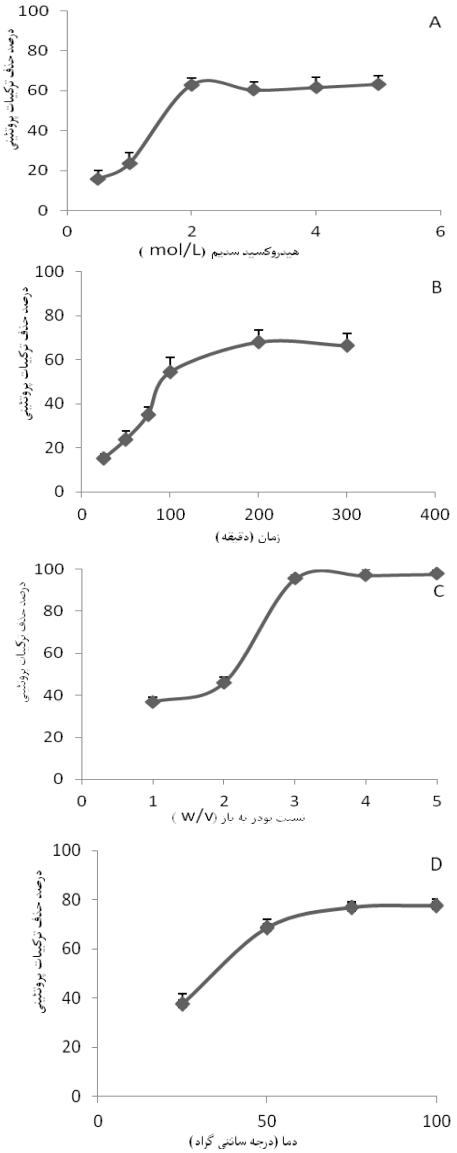
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

جدول شماره 1: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته میگوی سفید سرتیز (Metapenaeus affinis)

نمونه	مقدار استخراج شده(٪)	خاکستر (درصد)	رطوبت (درصد)	پروتئین (%)	وزن مولکولی (دالتون)	داستیله (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 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).



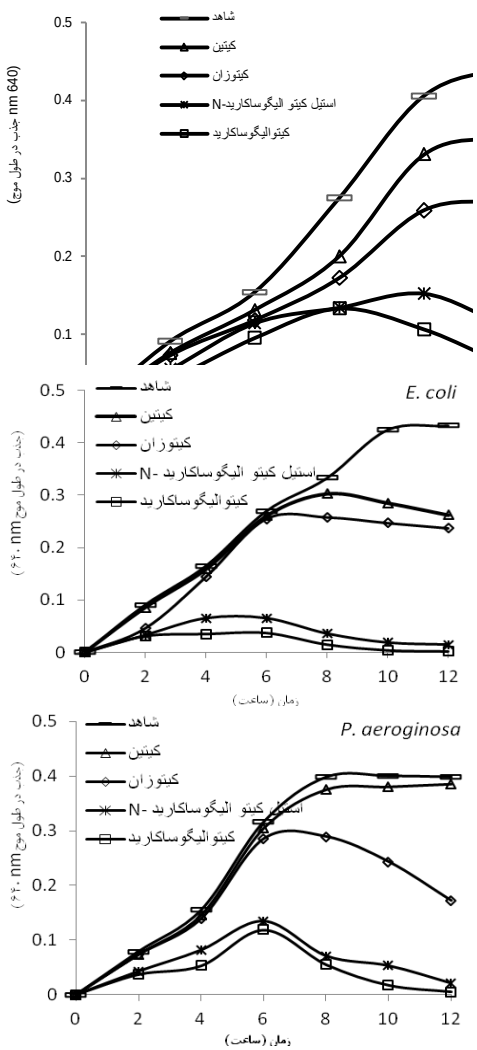
تصویر شماره 2: (A): تاثیر غلظت هیدروکسید سدیم بر حذف ترکیبات پروتئینی (دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v) پودر به باز و مدت زمان 120 دقیقه)، (B): تاثیر مدت زمان واکنش بر حذف ترکیبات پروتئینی (غلظت 2 مولار هیدروکسید سدیم، دمای 25 درجه سانتی گراد، نسبت 1:15 (w/v) پودر به باز)، (C): تاثیر نسبت پودر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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

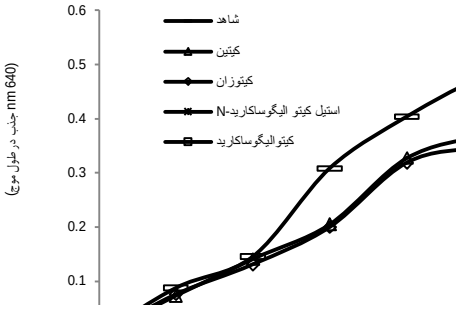
N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید نسبت به کیتین و کیتوزان مقادیر MIC کم‌تری را از خود نشان دادند که نشان‌دهنده‌ی فعالیت ضدمیکروبی قوی‌تر این مشتقات می‌باشد (جدول شماره 2). کم‌ترین غلظت بازدارنده‌ی رشد کیتین و کیتوزان به ترتیب 0/1 و 0/05 درصد بود. محدوده‌ی MIC N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید 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 آن‌ها در غلظت 0/1 درصد نشان می‌دهد که میزان فعالیت ضدباکتری بر اساس درصد مهار کلنی‌زایی باکتریایی بیان شده است. همان‌طور که از نتایج می‌توان فهمید، پلیمرهای استخراجی بر اساس وزن مولکولی و نوع سویه باکتری فعالیت ضد میکروبی متفاوتی دارند.

جدول شماره 2: کم‌ترین غلظت بازدارنده‌ی رشد کیتین، کیتوزان و مشتقات آن‌ها به منظور مقایسه فعالیت ضد باکتری آن‌ها

باکتری های مورد مطالعه	MIC (درصد)		N- استیل کیتو الیگوساکارید	کیتوالیگوساکارید
	کیتین	کیتوزان		
Staphylococcus aureus	< /1	/1	/01	0/01
Bacillus subtilis	/1	/1	/01	0/01
Pseudomonas aeroginosa	< /1	/1	/05	0/01
Escherichia coli	/1	/05	/05	0/01



تصویر شماره 3: تاثیر کیتین، کیتوزان، N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید روی سویه‌های باکتریایی



بحث

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

مشتقات آن‌ها در مراحل حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی در بسیاری از مطالعات مورد توجه محققین مختلف بوده است. در حالی‌که برای حذف ترکیبات معدنی پوسته‌ی سخت‌پوستان 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 سخت‌پوستان 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(19 ،16). اگرچه افزایش زمان باعث کاهش محتوی ترکیبات معدنی می‌شود، اما می‌تواند باعث دگرگونی ساختار کیتین نیز بشود(18 ،13). 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 کوالانسی 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 NaOH 2/5 N، 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 مطالعه‌ی Kucukgulmez و همکاران (17/48 درصد)(25) مقادیر کیتوزان بیش‌تری از گونه‌های مختلف سخت‌پوست گزارش کردند. در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

مطالعه مشابه دیگری، محدوده کیتوزان استخراجی از پوسته‌ی خرچنگ 32/2-30 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 به‌طورکلی 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 الیگومرهای 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

در مطالعه Gerasimenko و همکاران و Benhabiles و همکاران، حساسیت سویه‌های باسیلوس در برابر غلظت 0/1 درصد کیتوزان نسبت به همین غلظت کیتین بیش‌تر بوده است که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد(1، 29). No و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و الیگومرهای آن‌ها روی *Bacillus* sp. با کاهش وزن مولکولی و ویسکوزیته افزایش می‌یابد. علت این پدیده را این‌گونه می‌توان توضیح داد که زنجیره‌های کیتوزان کوچک‌تر، توانایی برهمکنش بیش‌تری با سلول‌های 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 به‌مانند این مطالعه، فعالیت بازدارندگی کیتوزان روی رشد *E. coli* گزارش شده است(31 ،24). غلظت 0/1 درصد N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید خاصیت ضد میکروبی بیش‌تری روی *E. coli* از خود نشان دادند. در مطالعه‌ی مشابه، Liu و همکاران الیگومرهای کیتوزانی (غلظت 0/5 درصد) با وزن مولکولی 3000 دالتون خاصیت ضد میکروبی بیش‌تری نسبت به الیگومرهای با وزن حدود 50000 دالتون از خود نشان دادند. می‌توان این‌گونه تفسیر کرد که افزایش ویسکوزیته کیتوالیگوساکارید با وزن بالاتر باعث کاهش فعالیت ضد میکروبی آن شده است(31). همان‌طور که نتایج نشان داده است، جمعیت باکتریایی در تیمارهای با 0/1 درصد کیتوزان کم‌تر از تیمار شاهد در طی زمان انکوبه (6- 0 ساعت) می‌باشد که نشان‌دهنده قدرت بازدارندگی رشد کیتوزان در غلظت مذکور می‌باشد که با نتایج مطالعه Jeon و همکاران مطابقت دارد(32). با این وجود کیتین قابلیت بازدارندگی ضعیف‌تری روی رشد *P. aeroginosa* از خود نشان نداد. کیتوالیگوساکارید و N- استیل کیتوالیگوساکارید بازدارندگی بیش‌تری روی رشد *P. aeroginosa* نسبت به کیتین و کیتوزان از خود نشان دادند که با نتایج مطالعه Bhhatt و همکاران مطابقت دارد(33). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، کیتوزان و کیتین خاصیت باکتریوستاتیک بیش‌تری نسبت به خاصیت باکتریوسیدال از خود نشان دادند. احتمال می‌رود این دو پلیمر با ایجاد فولیکول‌هایی در اطراف سلول‌های باکتریایی باعث عدم انتقال مواد غذایی مورد نیاز به سلول و احتمالاً باعث مرگ سلول می‌شوند(34). مولکول‌های کیتوزان با وزن مولکولی پایین‌تر قابلیت بیش‌تری برای باند شدن با بیش از یک سلول باکتریایی را دارند. در این شرایط پیوندهای بین سلول‌های باکتریایی و زنجیره‌ی کیتوزان سریعاً شکل گرفته و سلول باکتریایی غیرفعال می‌شود(34). از طرف دیگر پلیمرهای N- استیل کیتوالیگوساکارید و کیتوالیگوساکارید را می‌توان به‌عنوان یک عامل باکتریسیدال معرفی نمود. احتمال می‌رود که وزن مولکولی پایین این پلیمرها باعث عبور آن‌ها از دیواره سلولی و ایجاد پیوندهای چند لایه با غشا سلولی می‌شود(31).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر فاکتورهای غیر زیستی در مراحل حذف ترکیبات معدنی و پروتئینی کیتین و کیتوزان روی خواص فیزیکوشیمیایی و زیستی این پلیمرها تاثیر گذار می‌باشند. هم‌چنین مشتقات الیگوساکاریدی با وزن مولکولی کم‌تر و درصد خلوص بالاتر خواص ضد باکتری قوی‌تری را نسبت به کیتین و کیتوزان از خود نشان دادند. بنابراین با بررسی فاکتورهای تاثیر گذار در مراحل مختلف استخراج کیتین و کیتوزان می‌توان مشتقاتی با کیفیت و خواص زیستی بهتری را تهیه کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولین آزمایشگاه تحقیقات و بیوتکنولوژی آبزیان و خصوصا خانم دکتر پازوکی جهت فراهم نمودن امکانات جهت انجام این مطالعه تقدیر و تشکر می‌نماییم.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

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. Physiochemical 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 andpharmaceutical/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 Polyclinum 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, Yaghobi N, Amanpour S, Ahmadi H, Mohaghebi MA, Hormozi F. Preparation of chitosan derived from shrimp shell of Persian Gulfas 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

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 melantho) 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-Garcıa 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-09-07]