

## استخراج کیتوزان $\alpha$ ، $\beta$ و $\gamma$ از خرچنگ *Portunus segnis*، سپیا *Sepia pharaonis* و قارچ *Aspergillus niger* و مقایسه 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 آریان، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

\*مسئول مکاتبات: j-pazooki@sbu.ac.ir

**چکیده.** سه نوع کیتین به نام  $\alpha$  (اسکلت خارجی سخت پوستان)،  $\beta$  (اسکلت داخلی سرپایان) و  $\gamma$  (دیواره سلولی برخی قارچ‌ها) در طبیعت وجود دارد. کیتوزان مهم‌ترین مشتق کیتین است که فعالیت‌های زیستی مختلفی دارد. در این مطالعه سه نوع کیتوزان  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  به ترتیب از پوسته خرچنگ *Portunus segnis*، صدف داخلی *Sepia pharaonis* و دیواره سلولی قارچ *Aspergillus niger* استخراج شد. نمونه‌های سخت پوست و نرم‌تن در تابستان ۱۳۹۳ از آب‌های بندر عباس و سویه قارچی *Aspergillus niger* (PTCC 5223) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه شد. مقدار کیتوزان استخراج شده از پوسته خرچنگ به‌طور معنی‌داری بیشتر از کیتوزان سپیا و کیتوزان قارچ محاسبه شد. خواص ضد میکروبی سه نوع کیتوزان به روش انتشار دیسک در آگار روی نه سویه باکتریایی و دو سویه قارچی بررسی شد. به‌طور میانگین، کیتوزان  $\alpha$  بیشترین و کیتوزان  $\gamma$  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 ضد میکروبی قابل توجهی را از خود نشان دادند. مطالعات بیشتر در این زمینه نیز پیشنهاد می‌شود.

**واژه‌های کلیدی.** ترکیبات زیستی، سخت پوستان، نرم‌تنان، میکروارگانیسم‌ها

## Extraction of $\alpha$ -, $\beta$ - and $\gamma$ -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  $\alpha$  (exoskeleton of crustaceans),  $\beta$  (cuttlebone of cephalopods) and  $\gamma$  (some fungal cell wall) exist in nature. Chitosan is the most important derivative of chitin, which has various biological activities. In this study,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -chitosans were extracted from *Portunus segnis* exoskeleton, *Sepia pharaonis* 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  $\alpha$  chitosan and  $\gamma$  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

## مقدمه

کیتین پلیمری است که از واحدهای  $\beta$ -1, 4-N-acetylgl-ucoseamine ساخته شده و پس از سلولز فراوانترین پلیمر طبیعی است (Yen *et al.*, 2009). سه نوع کیتین در طبیعت وجود دارد: کیتین نوع  $\alpha$  که از زنجیره‌های موازی ناهم‌سو تشکیل شده و در اسکلت خارجی سخت‌پوستان وجود دارد (Enstar *et al.*, 2008). کیتین نوع  $\beta$  که از زنجیره‌های موازی و هم‌سو تشکیل شده و در اسکلت داخلی سرپایان وجود دارند. کیتین  $\gamma$  که با وجود زنجیره‌های موازی هم‌سو و ناهم‌سو ترکیبی از نوع  $\alpha$  و  $\beta$  است که در دیواره 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 داستیل‌شدن نسبی کیتین به دست می‌آید، از واحدهای 2-amino-2-deoxy-D-glucose و 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose تشکیل شده است (Bolal *et al.*, 2003; Ya-maguchi *et al.*, 2010). 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 ضد میکروبی، 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 مقایسه کمی انواع کیتوزان از منابع مختلف و مقایسه خواص ضد میکروبی آنها با یکدیگر است.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه‌های خرچنگ و سیپا 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 سیپا جدا و پس از خشک کردن در آون در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با آسیاب پودر شد و از الک ۲۵۰ میکرون عبور داده شد. تا

زمان آزمایش، نمونه‌ها در پلاستیک‌های زیپ‌دار و در دمای ۴ درجه 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 سیپا

کیتوزان با حذف ترکیبات معدنی، پروتئینی و رنگ‌دانه‌ای از پودر اسکلت و در نهایت حذف گروه‌های استیل از روی کیتین 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 دمیترال 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 به دست 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 گروه‌های استیل از روی کیتین و تبدیل کیتین به کیتوزان صورت گرفت (Lee *et al.*, 2013). جهت تهیه کیتوزان با خلوص بیشتر، کیتوزان  $\alpha$  و  $\beta$  به دست آمده 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 درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شد (Yen *et al.*, 2009).

### استخراج کیتوزان از دیواره سلولی قارچ *A. niger*

کشت اولیه قارچ *A. niger* در محیط کشت شیب دار پوتیتو دکستروز آگار در دمای ۲۵ درجه 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 میلی‌لیتر) در

۹۹ میلی‌لیتر محیط کشت مایع پوتیتو دکستروز برات (PDB, Merk Germany) تلفیق و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دور شیکر ۱۸۰ rpm و به مدت ۲۰ روز انکوبه شد. پس از ۲۰ روز، مسلیوم‌های قارچی رشد کرده در محیط مایع، با استفاده از کاغذ صافی صاف شده و پس از خشک کردن در آون، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد وزن آن اندازه‌گیری شد (Antonio et al., 2008). کیتوزان قارچی بر اساس روش Zamani و همکاران (2007) استخراج و مقدار وزنی آن اندازه‌گیری شد. ترکیبات پروتئینی مسلیوم *A. niger* با استفاده از هیدروکسید سدیم سه درصد (۳۰ میلی‌لیتر به ازای هر گرم وزن مسلیوم) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت 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 درجه سانتی‌گراد 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 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

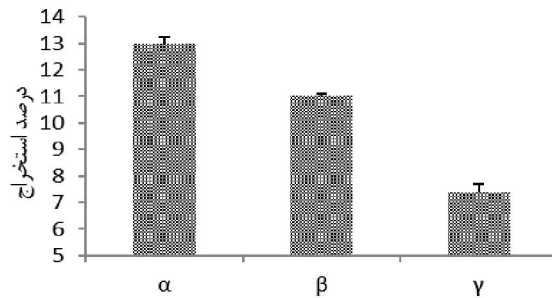
**بررسی خواص فیزیکوشیمیایی انواع کیتوزان**

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 محاسبه درصد پروتئین (DP%) و مواد معدنی (DM%) کیتوزان‌های استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. درصد داستیله شدن (DDA%) کیتوزان‌ها نیز با استفاده از تحلیل Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR) تعیین شد (Yen et al., 2009).

**آزمایش ضد میکروبی**

خواص ضد میکروبی انواع کیتوزان استخراج شده روی نه سویه باکتریایی از جمله *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189)، *Bacillus cereus* (PTCC 1156)، *Bacillus subtilis* (PTCC 1154)، *Escherichia coli* (PTCC 1176)، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1310)، *Proteus mirabilis* (PTCC 1076) و *Serratia marcescens* (PTCC 1621) و همکاران در سال 2009 بین ۷۵-۱۰۰۰ µg/ml اندازه‌گیری شد.

(PTCC 1053) *Klebsiella Pneumonia*، (PTCC 1709) *Salmonella enterica* و ۲ سویه قارچی (PTCC 5223) *A. niger* و (PTCC 5027) *Candida albicans* تحت بررسی قرار گرفت. سویه‌های قارچی و باکتریایی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی (IROST) تهیه شدند. مطالعه ضد میکروبی به روش انتشار دیسک در آگار انجام شد (Chio et al., 2001). با استفاده از کلنی‌های باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی محیط مولر هینتون آگار (Merk, Germany) کشت شده‌اند، سوسپانسیون با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در محیط کشت مایع مولر هینتون برات (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 برات (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 پس از یک شب قرار دادن محلول در دمای محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. مقادیر مشخصی از کیتوزان (۵۰۰ µg/ml) به دیسک‌های بلانک استریل (۶ mm) تلفیق شد. از دیسک‌های آغشته به اسید استیک ۱ درصد و دیسک‌های بلانک به تنهایی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. همچنین دیسک‌های آماده آنتی‌بیوتیک (Amoxicillin 25 µg/disc) به عنوان شاهد مثبت برای باکتری‌های گرم مثبت، دیسک‌های آماده آنتی‌بیوتیک (Penicillin 25 µg/disc) به عنوان شاهد مثبت برای باکتری‌های گرم منفی و دیسک‌های آماده آنتی‌بیوتیک (Nystatin 30 µg/disc) به عنوان شاهد مثبت برای قارچ‌ها استفاده شد. پلیت‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت‌های قارچی به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت. پس از زمان‌های مذکور هاله‌های فقدان رشد باکتریایی و قارچی در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد (Sania et al., 2012). مقادیر MIC و MBC برای انواع کیتوزان بر اساس روش Chellaram و همکاران در سال 2009 بین ۷۵-۱۰۰۰ µg/ml اندازه‌گیری شد.



شکل ۱- درصد کیتوزن به دست آمده از خرچنگ (α)، سیپا (β) و دیواره 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 (سیپا) و γ (دیواره سلولی قارچ).

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

| نوع کیتوزان | محصول (%)   | رطوبت (%)   | خاکستر (%) | حذف ترکیبات معدنی (%) | حذف ترکیبات پروتئینی (%) | داستیل شدن (%) |
|-------------|-------------|-------------|------------|-----------------------|--------------------------|----------------|
| α کیتوزان   | ۱۳ ± ۰.۲۴   | ۷/۴۵ ± ۰.۱  | ۱/۸ ± ۰.۰۶ | ۹۵/۸۸ ± ۴/۹۸          | ۹۲/۴۶ ± ۱/۷۵             | ۷۰-۷۵          |
| β کیتوزان   | ۱۱ ± ۰.۱۱   | ۸/۴ ± ۰.۵۵  | ۳/۹۳ ± ۰.۶ | ۹۳/۲ ± ۰.۱۵           | ۹۰ ± ۰.۲                 | ۷۰-۷۵          |
| γ کیتوزان   | ۷/۳۸ ± ۰.۳۱ | ۵/۰۱ ± ۰.۱۷ | ۴/۵ ± ۰.۱۵ | ۹۰/۹ ± ۰.۲۵           | ۸۸/۱۲ ± ۰.۳۳             | ۷۰-۷۵          |

## نتایج

مقاومت نشان داد. سویه‌های قارچی نسبت به سویه‌های باکتریایی مقاومت بیشتری در برابر هر سه نوع کیتوزان از خود نشان دادند (جدول ۴). نتایج تحلیل MIC و MBC نیز با آزمایش‌های ضد میکروبی هم‌خوانی داشت (جدول ۵). مقادیر MIC و MBC هر سه نوع کیتوزان روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری-های گرم منفی کمتر بود. همچنین، کیتوزان آلفا مقادیر کمتری از غلظت‌های بازدارنده و کشنده 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). با وجود این به خاطر ساختار فشرده کیتوزان آلفا، اخیراً دیگر شکل-های کیتوزان نیز در کانون توجه محققان قرار گرفته است (Tolaimate *et al.*, 2000). همچنین صدف داخلی سرپایان و دیواره سلولی قارچ‌ها نیز مقادیر کمتری کیتوزان در خود دارند که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. مقدار کیتوزان α در این مطالعه ۱۳ ± ۰.۲۴ درصد محاسبه شد که نسبت به کیتوزان α استخراج شده در مطالعه Bolat و همکاران (2010)، Rhazi و همکاران (2000) و Hajji و همکاران (2014) بیشتر است. در برخی

مقدار کیتوزان استخراج شده از خرچنگ (۱۳ ± ۰.۲۴ درصد) بیشتر از کیتوزان سیپا (۱۱ ± ۰.۱۱ درصد) و کیتوزان قارچی (۷/۳۸ ± ۰.۳۱) بود (شکل ۱). نتایج مندرج در جدول ۱ نشان می‌دهد که کیتوزان α به دست آمده دارای خلوص نسبی بیشتری از دیگر انواع کیتوزان است. نتایج آزمایش‌های ضد میکروبی نشان داد که انواع کیتوزان استخراج شده دارای خاصیت بازدارندگی رشد روی اکثر سویه‌های باکتریایی و قارچی مورد استفاده در این مطالعه هستند. رنج هاله عدم رشد بین ۱۱/۵ ± ۰.۲ تا ۱۶/۶۶ ± ۰.۵ میلی‌متر برای کیتوزان α، ۹/۴ ± ۰.۴ تا ۱۳ ± ۰.۶۷ میلی‌متر برای کیتوزان β و ۸/۵ ± ۰.۲ تا ۱۲/۶۶ ± ۱.۵۲ میلی‌متر برای کیتوزان γ اندازه‌گیری شد. همچنین، کیتوزان آلفا بیشترین و کیتوزان گاما کمترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان دادند (جدول ۲ و ۳). فعالیت بازدارندگی رشد هر سه نوع کیتوزان به طور معنی‌داری روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود. شاهدهای منفی فاقد خاصیت ضد میکروبی و فعالیت انواع کیتوزان کمتر از شاهدهای مثبت به دست آمد. بیشترین هاله عدم رشد روی *S. aureus* (۱۶/۶ ± ۰.۵ میلی‌متر) و در برابر کیتوزان α به دست آمد. همچنین کمترین حساسیت نیز از *S. enterica* (۸/۵ ± ۰.۲ میلی‌متر) و *P. mirabilis* (۹/۳ ± ۰.۶ میلی‌متر) در برابر کیتوزان γ مشاهده شد. تنها سویه *A. niger* در برابر هر سه نوع کیتوزان استخراج شده

**جدول ۲-** حالت عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت توسط کیتوزان  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  برحسب میلی‌متر (Mean $\pm$ SD).

**Table 2.** Inhibition of gram positive bacterial growth by  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chitosan (Mean $\pm$ SD).

| نوع کیتوزان                   | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|
| کیتوزان $\alpha$              | ۱۵/۱ $\pm$ ۱۷            | ۱۵/۶ $\pm$ ۲           | ۱۶/۶ $\pm$ ۵                 |
| کیتوزان $\beta$               | ۱۳ $\pm$ ۶۷              | ۱۲/۶ $\pm$ ۲۱          | ۱۱/۵ $\pm$ ۴۴                |
| کیتوزان $\gamma$              | ۱۱/۵ $\pm$ ۲             | ۱۲ $\pm$ ۵             | ۱۲/۶۶ $\pm$ ۱۵۲              |
| Amoxicillin (25 $\mu$ g/disc) | ۲۱/۸ $\pm$ ۷۵            | ۱۷/۸ $\pm$ ۷۶          | ۱۸/۶ $\pm$ ۵۷                |

**جدول ۳-** حالت‌های عدم رشد باکتری‌های گرم منفی توسط کیتوزان  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  برحسب میلی‌متر (Mean $\pm$ SD).

**Table 3.** Inhibition of gram negative bacterial growth by  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chitosan (Mean $\pm$ SD).

| نوع کیتوزان                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Serratia marcescens</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Salmonella enterica</i> |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| کیتوزان $\alpha$           | ۱۲/۹ $\pm$ ۰۸                 | ۱۳/۵ $\pm$ ۲            | ۱۳/۱ $\pm$ ۸                 | ۱۱/۵ $\pm$ ۲               | ۱۲ $\pm$ ۶۸              | ۱۳ $\pm$ ۴                 |
| کیتوزان $\beta$            | ۹/۶ $\pm$ ۵                   | ۱۱/۱ $\pm$ ۲۸           | ۹/۴ $\pm$ ۴                  | -                          | -                        | -                          |
| کیتوزان $\gamma$           | ۱۰ $\pm$ ۵                    | ۱۱ $\pm$ ۱۵             | -                            | ۹/۵ $\pm$ ۶۲               | ۹/۳ $\pm$ ۶              | ۸/۵ $\pm$ ۲                |
| Penicillin (25 $\mu$ g/ml) | ۱۸/۵ $\pm$ ۲                  | ۱۷/۴ $\pm$ ۵            | ۱۹/۳ $\pm$ ۷                 | ۱۸/۵ $\pm$ ۳               | ۲۰/۱ $\pm$ ۵۶            | ۱۸/۵ $\pm$ ۱۶              |

(-) نبود حالت رشد.

**جدول ۴-** حالت عدم رشد قارچی توسط کیتوزان  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  برحسب میلی‌متر (Mean $\pm$ SD).

**Table 4.** Inhibition of fungal growth by  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chitosan (Mean $\pm$ SD).

| نوع کیتوزان                | <i>A. niger</i> | <i>C. albicans</i> |
|----------------------------|-----------------|--------------------|
| کیتوزان $\alpha$           | -               | ۱۳/۳۳ $\pm$ ۳      |
| کیتوزان $\beta$            | -               | ۱۳ $\pm$ ۱۶        |
| کیتوزان $\gamma$           | -               | ۱۲/۵ $\pm$ ۵       |
| Nystatin (30 $\mu$ g/disc) | ۹/۲ $\pm$ ۱۰۵   | ۱۴ $\pm$ ۰۹        |

(-) نبود حالت رشد.

**جدول ۵-** مقادیر MIC و MBC ( $\mu$ g/ml) کیتوزان  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  روی میکروارگانیسم‌های تحت مطالعه.

**Table 5.** MIC and MBC values ( $\mu$ g/ml) of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chitosan on test microorganisms.

| کیتوزان $\gamma$ |      | کیتوزان $\beta$ |      | کیتوزان $\alpha$ |      | میکروارگانیسم                 |
|------------------|------|-----------------|------|------------------|------|-------------------------------|
| MBC              | MIC  | MBC             | MIC  | MBC              | MIC  |                               |
| -                | -    | ۱۰۰۰            | ۵۰۰  | ۱۰۰۰             | ۵۰۰  | <i>Bacillus subtilis</i>      |
| -                | ۱۰۰۰ | -               | ۱۰۰۰ | ۵۰۰              | ۲۵۰  | <i>Bacillus cereus</i>        |
| -                | ۱۰۰۰ | -               | ۱۰۰۰ | ۵۰۰              | ۲۵۰  | <i>Staphylococcus aureus</i>  |
| -                | -    | -               | -    | ۱۰۰۰             | ۵۰۰  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| -                | -    | -               | ۱۰۰۰ | ۱۰۰۰             | ۵۰۰  | <i>Escherichia coli</i>       |
| -                | -    | -               | -    | -                | ۱۰۰۰ | <i>Klebsiella pneumoniae</i>  |
| -                | -    | -               | -    | -                | ۱۰۰۰ | <i>Serratia marcescens</i>    |
| -                | -    | -               | -    | -                | ۱۰۰۰ | <i>Peotus mirabilis</i>       |
| -                | -    | -               | -    | ۱۰۰۰             | ۵۰۰  | <i>Salmonella enterica</i>    |

(1999) فعالیت ضد قارچی کیتوزان  $\alpha$  بیش از فعالیت ضدباکتریایی آن محاسبه شده است.

طبق نتایج این مطالعه، به طور معنی داری 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 دیواره سلولی دانست که آن را از دسترسی ترکیبات ضد میکروبی به ترکیبات و بخش‌های حساس داخلی تا حدودی محافظت می‌کند (Raafat et al., 2008). نتایج مطالعه Ramesh و Sugumar (2010) نشان داد که تمام باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نسبت به کیتوزان  $\alpha$  از خود حساسیت نشان دادند. فعالیت قوی تر کیتوزان  $\alpha$  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. به طور کلی، طبق مطالعات صورت گرفته فعالیت ضد میکروبی کیتوزان روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر است (Tolaimat et al., 2000). اما در مطالعه Varadharajan و Ramesh (2012) حداکثر بازدارندگی رشد کیتوزان  $\alpha$  روی باکتری *E. coli* بود که با نتایج این مطالعه هم خوانی ندارد. تفاوت میزان فعالیت ضد میکروبی کیتوزان بین مطالعات مختلف ممکن است به چهار دلیل باشد: نوع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، ویژگی‌های فیزیوشیمیایی کیتوزان، منبع کیتوزان و وضعیت استخراج (No et al., 2002; Kong et al., 2008).

کیتوزان  $\beta$  به دست آمده 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  $\beta$  استخراج شده از بین دو سویه قارچی تحت مطالعه تنها در برابر *C. albicans* از خود فعالیت نشان داد. اما Patterson و Murugan (2000) فعالیت ضدقارچی مقبولی از کیتوزان  $\beta$  استخراج شده 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 مطالعه آنان فعالیت ضدقارچی کیتوزان  $\beta$  استخراج شده از *S. aculeate* و *S. brevimana* در برابر برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تحت بررسی قرار گرفت. در مطالعه

مطالعات نیز مقادیر بیشتری از کیتوزان  $\alpha$  گزارش شده است (Tipparat & Oryphan, 2008; Sasikala & Chitra, 2009). مقدار کیتوزان  $\beta$  به دست آمده 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  $\beta$  به دست آمده از *Sepia pharaonis* در این مطالعه (۱۱ درصد) بود. در مطالعه Mau و Yen (2007) مقدار کیتوزان از سویه‌های مختلف قارچی بین ۲۱/۸ تا ۲۴ درصد گزارش شده است و این در حالی است که در مطالعه حاضر بیشترین مقدار کیتوزان به دست آمده از قارچ *A. niger* (۷/۵۸٪) محاسبه شد. مقدار کیتوزان  $\gamma$  به دست آمده در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات Natarjan و همکاران (2011) (۱۰٪)، Pochanavanich و Suntomsuk (2002) (۱۱٪)، Nadarjah و همکاران (2001) (۱۱/۲٪) و Tao و همکاران (2005) (۱۱٪) کمتر است. در مطالعه Mau و Yen (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 مطالعه حاضر، فقط *A. niger* در برابر هر سه نوع کیتوزان حساسیتی از خود نشان نداد. خواص ضدقارچی ضعیف‌تر می‌تواند به دلیل تأثیر کمتر ترکیبات ضد میکروبی روی دیواره سلولی محکم قارچ‌ها دانست که شامل کیتین و گلوکان است (Chellaram et al., 2009). 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 مطالعه Lim و Hudson (2003) فعالیت ضدقارچی ضعیفی برای کیتوزان  $\alpha$  گزارش شده است. اما Cuero



## 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 (*Potamon Potamios*, 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 mixture against *Actinobacillus 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., Khaleh, 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, L.J.** 2008. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres 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.

**Nadarajah و همکاران (2001)** سویه‌های *B. cereus*، *S. aureus* و *E. coli* در مقابل کیتوزان  $\beta$  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 مطالعه 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 از لحاظ کمی نیز کیتوزان بیشتری در خود دارند؛ دیگر اینکه خواص ضد میکروبی کیتوزان آلفا با توجه به ساختار آن بیشتر از خواص ضد میکروبی کیتوزان بتا و گاما است.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از دکتر محسن صفایی جهت کمک در تهیه نمونه‌های تحت مطالعه تشکر می‌کنیم.

- 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 Chandkrachang, 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., Bargaen, 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-glucosamine 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 aculeata* (Orbigny, 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, physicochemical 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. Physicochemical 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 (*Penaeus monodon*). – 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 physicochemical 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. Physicochemical 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. Physicochemical 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.



\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Khakshoor, M.S. and Pazooki, J.** 2017. Extraction of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -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  $\alpha$  و  $\beta$  و  $\gamma$  از خرچنگ *Portunus segnis*، سپیا *Sepia pharaonis* و قارچ *Aspergillus niger* و مقایسه خواص ضد میکروبی آنها. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۲۶۳-۲۵۵.