

تولید ترکیب هشدار دهنده عفونت باکتریایی برپایه کیتوزان

سیده راضیه هاشمی، هانیه رستم زاد*، مسعود ستاری

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

چکیده

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰

*نویسنده مسئول:

hroostamzad@guilan.ac.ir

هدف از این مطالعه، تولید و بررسی فیلم هوشمند هشدار دهنده عفونت باکتریایی برپایه کیتوزان می باشد. بدین منظور محلول کیتوزان _ صمغ عربی (۱ به ۲) تهیه شد و غلظت های مختلف آنتوسیانین (۰/۵، ۰/۷۵، ۱ گرم) به محلول اضافه شد و نمونه شاهد بدون افزودن آنتوسیانین در نظر گرفته شد. سپس محلول های تهیه شده در ظروف مورد نظر ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد خشک شدند. جهت بررسی ویژگی های فیزیکی فیلم تولید شده، شاخص های درصد رطوبت، درصد حلالیت، ضخامت و جذب آب فیلم های تولید شده مورد سنجش قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی تغییرات فیلم های تهیه شده در برابر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و پseudomonas آئروژینوزا پرداخته شد. بیوفیلم های کیتوزان/صمغ حاوی غلظت های مختلف آنتوسیانین به اندازه ۱×۱ سانتی متر بریده شدند و به مدت ۶۰ دقیقه بر روی محیط کشت حاوی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و پseudomonas آئروژینوزا قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه رنگ سنج تغییر رنگ فیلم ها بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده، کمترین و بیشترین میزان رطوبت فیلم به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار حاوی ۰/۷۵ درصد آنتوسیانین به دست آمد که با دیگر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری داشتند ($p < 0.05$). همچنین درصد حلالیت در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری داشت و تیمارهای آزمایشی حاوی غلظت های ۰، ۰/۷۵ و ۱ درصد آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد، درصد حلالیت کمتری داشتند و کمترین میزان آن در تیمار ۱ درصد آنتوسیانین مشاهده شد. میزان ضخامت فیلم نیز در بین تیمارهای آزمایشی، اختلاف معنی داری نشان داد به طوریکه بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار ۱ درصد آنتوسیانین مشاهده گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از جذب آب در زمان های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ دقیقه)، کمترین و بیشترین میزان جذب آب مربوط به تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین بود. براساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان تغییر رنگی فیلم ها در محیط کشت حاوی باکتری پseudomonas آئروژینوزا در تیمار حاوی ۰/۵ درصد آنتوسیانین حاصل شد؛ حال آنکه در مورد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین تغییر رنگ ایجاد شده در تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین مشاهده شد. باتوجه به آزمون های انجام شده بهترین فیلم تولید شده از نظر خصوصیات فیزیکی، فیلم ۱ درصد آنتوسیانین، از نظر تغییر رنگ در پاسخ به رشد باکتری پseudomonas آئروژینوزا تیمار ۰/۵ درصد آنتوسیانین و برای پاسخ به رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تیمار ۱ درصد آنتوسیانین گزارش شد.

کلید واژه ها: پانسمان هوشمند، استافیلوکوکوس اورئوس، پseudomonas آئروژینوزا، بیوپلیمر، صمغ عربی، آنتوسیانین

مقدمه

یکی از مهمترین ارگان ها و بیرونی ترین بخش بدن پوست می باشد که همواره در معرض آسیب های فیزیکی و عوامل بیماری زاست. پوست اندامی است که محافظت اصلی در برابر جراحات های ناشی از عوامل خارجی، صدمات سوختگی و نفوذ میکروارگانیسم ها را بر عهده دارد. علاوه بر این، پوست به عنوان عامل کنترل گر، از اتلاف بیش از اندازه مایعات بدن از راه تبخیر جلوگیری می کند. غدد عروقی با افزایش و کاهش میزان تبخیر آب از راه پوست، به تنظیم حرارت بدن کمک می کنند. به تنظیم حرارت بدن کمک می کنند. این غدد همچنین به عنوان اندام ترشحی تکامل نیافته، ترکیباتی چون آب اضافه بدن و مقادیر جزئی سدیم، کلر، کلسترول، آلبومین و اوره را از بدن خارج می کنند. پوست عضوی حسی است که با ایجاد شرایطی برای تشخیص تغییرات فیزیکی و شیمیایی محیط، امکان سازش اندامهای بدن را با محیط ایجاد کرده، بدینوسیله نقش حفاظتی مهمی را ایفا می کند. تاکنون برای پوشانیدن انواع زخم از روش های متنوعی استفاده شده است که هر یک دارای ویژگی هایی بوده اند. برای داشتن یک پوشش مناسب زخم باید

ویژگی هایی را در نظر داشت. از جمله می توان به زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، تسریع کننده روند بهبود و ترمیم زخم، جلوگیری از ایجاد عفونت های ثانویه در زخم، جلوگیری از ایجاد نشانگاه زخم (اسکار) و سایر موارد اشاره نمود^(۳،۴). تهیه زخم پوش از هیدروژل و پلیمرهای حساس به pH در سامانه های رهایش دارو و پانسمان ها، سبب افزایش سرعت بهبود زخم می شود^(۶). از جمله موضوعاتی که پژوهشگران در حال بررسی آن هستند تولید زخم پوش های هوشمند طبیعی است که علاوه بر ویژگی ترمیم زخم، قابلیت هشداردهندگی وجود عفونت را داشته باشند، بطوریکه با تغییر محرک های محیطی (مانند وجود عوامل بیماریزا، گرما، نور، رطوبت، pH و حلال)، تغییرات درخور توجهی در پیکربندی، ابعاد و خواص فیزیکی آنها رخ دهد و این هشدار برای درمان هرچه سریعتر زخم باشد. این مسئله اهمیت و ضرورت این پژوهش را تایید می نماید. لذا باتوجه به کمبود اطلاعات و تحقیقات انجام شده در این مورد در پژوهش حاضر قصد داریم امکان تولید فیلم هوشمند کیتوزان حاوی آنتوسیانین را مورد بررسی قرار دهیم، درصورت موفقیت در این طرح و گسترش آن می توان از آن جهت تشخیص زود هنگام عفونت در انواع زخم ها استفاده نمود. تازه ترین مکانیزم های به کار گرفته شده در این زمینه استفاده از تغییر pH محیط به واسطه ی رشد میکروبی است؛ به گونه ای که بر اثر ایجاد برخی واکنش های شیمیایی و فیزیکی مختلف که بطور همزمان در محیط زخم پوش رخ می دهد، تغییراتی در رنگ و بافت زخم ایجاد می شود که می تواند علامت هشدار دهنده در جهت بروز عفونت زخم باشد. از این رو با طراحی و ساخت یک پلیمر هوشمند حساس به تغییرات pH و بر پایه روش رنگ سنجی، می توان به صورت خودکار این مسأله را پیگیری نمود و از آن برای شناسایی آلودگی های باکتریایی دخیل در عفونت زخم استفاده کرد^(۷). از جمله خصوصیات بارز کیتوزان می توان به سازگاری زیستی بالا، زیست تخریب پذیری قابل قبول در کنار سمیت پایین، همچنین خواص آنتی باکتریال و ضد حساسیت آن اشاره کرد. این خصوصیات منحصر به فرد، موجب شد تا کیتین و کیتوزان توجه زیادی را نه تنها از نظر فراوانی در منابع طبیعی بلکه به دلیل پتانسیل بالا، جهت تهیه مواد کاربردی، به طرف خود معطوف کنند^(۸).

آنتوسیانین از دو کلمه یونانی به معنای گیاه (kianos) و آبی (anthos) مشتق شده است که مهم ترین رنگ دانه گیاهان آوندی و ترکیباتی هستند. آنتوسیانین ها مهم ترین ترکیبات رنگی در بین فلاونوئیدها و مهم ترین گروه از رنگدانه های طبیعی بعد از کلروفیل هستند که غیرسمی و محلول در آب بوده و در سطح وسیعی در مایع سلول های گیاهی وجود دارند. این رنگ دانه های فلاونوئیدی مسئول رنگ های قرمز، آبی و بنفش در بسیاری از میوه ها، سبزی ها و گل ها می باشد^(۱۰-۱۱). پارامترهای مؤثر بر رنگ آنتوسیانین ها به ترکیب شیمیایی آن با گلیکوزیدها، ماهیت و نوع و تعداد قند باند شده به آنتوسیانیدین، طبیعت و تعداد اسیدهای باند شده به قند، واکنش آنتوسیانین با مولکول های دیگر و شرایط شیمیایی و فیزیکی محیط بستگی دارد^(۱۲). ساختار شیمیایی پیگمان ها یکی از فاکتورهایی است که بر رنگ آنتوسیانین اثر می گذارد. تشکیل این ساختارها به درجه اسیدی یا قلیایی بودن محیط بستگی دارد. در pH های مختلف آنتوسیانین ها با ساختار شیمیایی مختلف سازگار می شوند که شامل کاتیون فلاویلوم، پایه کوینودال، کریینول و کالکون می باشد^(۱۳). با توجه به موارد فوق، در تحقیق حاضر اقدام به تولید فیلم کیتوزان/صمغ عربی حاوی آنتوسیانین شد و پس از بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آن، بررسی تغییر رنگ فیلم های تولید شده در برابر باکتریهای عامل عفونت زخم (استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا) نیز صورت گرفت^(۱۴،۱۵،۱۶).

مواد و روش ها

محلول کیتوزان با استفاده از روش شجاعی و همکاران (۲۰۱۴) تهیه شد^(۲۲). ابتدا ۱/۵ گرم کیتوزان به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و سپس روی هیتز مغناطیسی در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و ۰/۵ میلی لیتر اسید سیتریک جهت حل شدن ماده به محلول اضافه گردید. حرارت دهی تا حل شدن کامل به مدت ۱۰ دقیقه ادامه یافت. سپس همزمان با کاهش دما، ۰/۵ میلی لیتر گلیسرول به عنوان نرم کننده به محلول اضافه شد.

به منظور تهیه محلول صمغ عربی، ۳ گرم صمغ، به ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و روی هیتر مغناطیسی در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد تا حل شدن کامل صمغ ها هم زده شد^(۱۷).

به منظور تهیه فیلم کیتوزان/صمغ عربی، محلول کیتوزان و صمغ عربی به نسبت ۱ به ۲ مخلوط شدند^(۱۷) و غلظت های متفاوت آنتوسیانین (۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲ درصد حجمی/حجمی) به محلول اضافه شد. نمونه شاهد بدون افزودن آنتوسیانین در نظر گرفته شد. سپس محلول های تهیه شده در ظروف مورد نظر ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خشک شدند.

ارزیابی خصوصیات فیلم های تولید شده

نمونه های فیلم با وزن مشخص درون پلیت های شیشه ای که از قبل به تعادل رطوبتی رسیده و توزین شده بودند قرار گرفت. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. نمونه ها همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید. محتوای رطوبت روکش ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۱ محاسبه شد^(۱۸):

$$\text{رابطه ۱} \quad (100 \times \text{وزن آب}) / (\text{وزن مرطوب نمونه}) = \text{درصد رطوبت بر پایه وزن مرطوب}$$

وزن اولیه نمونه های فیلم $2/5 \times 2/5$ پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد تعیین شد و سپس نمونه های فیلم در ظروف حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفت. ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. پس از این مدت نمونه ها به وسیله کاغذهای صافی که قبلاً خشک شده بود فیلتر و دوباره در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. میزان حلالیت فیلم ها به کمک رابطه ۲ محاسبه گردید^(۱۹):

$$\text{رابطه ۲} \quad (100 \times \text{وزن ماده خشک اولیه} - \text{وزن فیلم خشک بعد غوطه وری}) / (\text{وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم}) = \text{درصد حلالیت}$$

ضخامت نمونه ها با یک ریزسنج دیجیتالی (۰/۰۰۱ نانومتر) اندازه گیری شد. اندازه گیری ها در پنج نقطه از هر نمونه تکرار شد. میانگین ضخامت محاسبه شده و در تعیین مقاومت کششی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

ارزیابی منحنی جذب آب

محاسبه منحنی جذب رطوبت توسط فیلم به کمک روش توصیف شده توسط لاورگنا و همکاران (۲۰۱۰) صورت گرفت^(۱۸). نمونه های فیلم به صورت قطعات کوچک به ابعاد $2/5 \times 2/5$ سانتی متر برش داده شد و به مدت یک شب در دسیکاتور قرار گرفت. سپس نمونه ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ توزین گردید تا وزن خشک اولیه نمونه ها محاسبه گردد و پس از آن نمونه در ظروف درب دار حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر با pH=۷ و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به منظور تعیین میزان جذب، نمونه ها به صورت دوره ای از ظرف خارج شدند و پس از خشک کردن سطح آن ها به وسیله دستمال کاغذی مجدد توزین شدند و سپس به ظرف آب باز گردانده می شدند. فرایند توزین تا زمان رسیدن نمونه ها به تعادل رطوبتی ادامه یافت. محتوای رطوبت فیلم نسبت به زمان از رابطه ۳ محاسبه گردید^(۱۹):

$$\text{رابطه ۳} \quad (\text{فیلم خشک پس از غوطه وری} - \text{وزن فیلم خشک اولیه}) / (\text{وزن خشک اولیه روکش}) = \text{جذب رطوبت}$$

بررسی تغییر رنگ فیلم های تهیه شده در حضور باکتری های عامل عفونت

بدین منظور ابتدا باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس که عامل عفونت زخم می باشند، تهیه شده و در محیط های کشت اختصاصی خود کشت داده شدند.

ابتدا ۸ گرم از محیط کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا^۱، در ۲۰۰ میلی لیتر آب حل شده و جهت انحلال کامل ماده روی هیتر قرار داده شد. سپس محیط کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا در ۴ عدد پلت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد تا کاملاً به حالت جامد درآید. سپس توسط لوپ، باکتری سودوموناس آئروژینوزا روی محیط کشت به صورت زیراک پاساژ داده شد و محیط موردنظر در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (۳۰).

در ابتدا ۴ عدد محیط کشت آماده‌ی مانیتول سالت آگار^۲، تهیه گردید. سپس با استفاده از لوپ، باکتری مورد نظر برداشته شده و روی محیط کشت به صورت دورانی انتقال داده شد و جهت رشد باکتری ها در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (۳۰). بررسی تاثیر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس بر فیلم تولید شده

به منظور بررسی تاثیر باکتری‌های عامل عفونت بر فیلم تهیه شده از کیتوزان و صمغ عربی حاوی آنتوسیانین، بیوفیلیم‌های کیتوزان/صمغ حاوی غلظت‌های مختلف آنتوسیانین به اندازه ۱×۱ سانتی متر بریده شدند و به مدت ۶۰ دقیقه بر روی محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه رنگ سنج تغییر رنگ فیلم‌ها بررسی شد.

سنجش رنگ سطحی و شفافیت فیلم

سنجش رنگ توسط دستگاه رنگ سنج انجام گرفت. نمونه‌های فیلم به منظور سنجش رنگ روی کاشی استاندارد سفید رنگ قرار داده شد و سه فاکتور a^* ، b^* و L^* (زرد/آبی، قرمز/سبز، روشنایی) نشان داده شده توسط دستگاه رنگ سنج ثبت شد. تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) انجام گرفت. ثبت داده‌ها پس از هر مرحله نمونه‌برداری به وسیله نرم افزار Excel (2013) انجام شد. برای بررسی آماری داده‌ها ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط One Sample Kolmogorov-Smirnov Test ارزیابی شد و در صورت نرمال بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده گردید و اختلاف بین میانگین‌ها بوسیله آزمون چند دامنه Duncan بررسی شد. میزان سطح معنی‌دار بودن در این بررسی $p < 0.05$ بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت.

نتایج

نتایج خواص فیزیکی فیلم‌های تولیدی

نتایج مربوط به میزان رطوبت فیلم، حلالیت و ضخامت فیلم تولیدی در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، کمترین و بیشترین درصد رطوبت فیلم تهیه شده به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار ۳ (حاوی ۰/۷۵ درصد آنتوسیانین) به دست آمد که با دیگر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$). همچنین تمامی تیمارهای آزمایشی حاوی آنتوسیانین، حلالیت کمتری نسبت به تیمار شاهد داشتند ($p < 0.05$). در مقایسه بین تیمارهای حاوی آنتوسیانین، کمترین حلالیت متعلق به تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین بود بطوریکه در تیمار شاهد ۲۱۹ درصد حلالیت و در تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین ۱۲۸ درصد گزارش شده است که این امر می‌تواند به علت ایجاد باندهای جدید بین آنتوسیانین و پلیمر باشد که موجب استحکام بیشتر و حلالیت کمتر فیلم‌ها شد. درمورد میزان ضخامت فیلم نیز در بین تیمارهای آزمایشی، اختلاف معنی‌داری

¹ Psedomonoos Selective Agar

² Mannitol Salt Agar

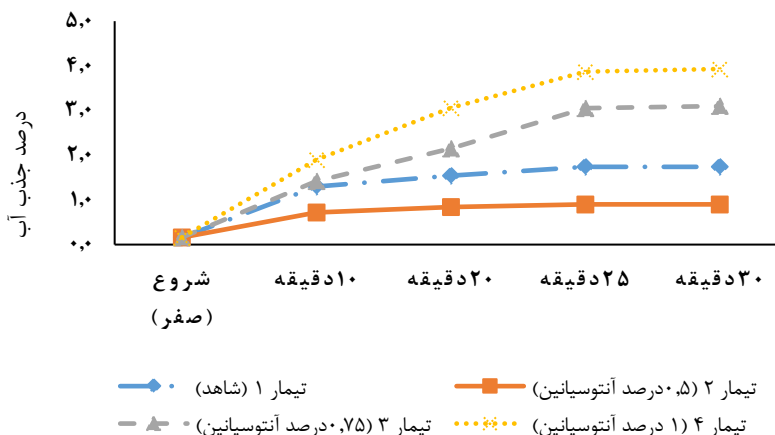
نشان داد ($p < 0.05$) به طوریکه بیشترین مقدار در تیمار شاهد و کمترین میزان در تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین مشاهده گردید که این امر نیز می تواند دلیلی برای ایجاد باندهای بیشتر و محکم تر بین آنتوسیانین و پلیمر باشد که در غلظت بالاتر آنتوسیانین موجب کاهش ضخامت و همچنین کاهش حلالیت فیلم ها شده است.

جدول ۱: نتایج خواص فیزیکی فیلم هوشمند تولیدی

شاخص	درصد رطوبت	ضخامت (میلی متر)
تیمار شاهد	$15/03 \pm 0/01^d$	$0/19 \pm 0/01^a$
تیمار حاوی ۰/۵ درصد آنتوسیانین	$24/46 \pm 0/02^b$	$0/15 \pm 0/02^{ab}$
تیمار حاوی ۰/۷۵ درصد آنتوسیانین	$25/70 \pm 0/02^a$	$0/12 \pm 0/01^c$
تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین	$21/98 \pm 1/25^c$	$0/06 \pm 0/02^d$

نتایج منحنی جذب آب فیلم هوشمند تولیدی

نتایج مربوط به منحنی جذب آب در تیمارهای مختلف در شکل ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از جذب آب در زمان های مختلف (۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰ دقیقه)، کمترین و بیشترین میزان جذب آب به ترتیب مربوط به تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین بود.



شکل ۱: منحنی جذب آب فیلم هوشمند تولیدی

نتایج تغییرات رنگی فیلم تولیدی

هدف اصلی از انجام این بخش، پی بردن به ارتباط بین عفونت باکتریایی و تغییر رنگ فیلم تولیدی بود؛ لذا در اینجا به بررسی تغییرات رنگی ایجاد شده در فیلم در پاسخ به باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته شده است (جدول ۲). براساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان تغییر رنگی فیلم ها در محیط کشت حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در تیمار حاوی ۰/۵ درصد آنتوسیانین حاصل شده

(شکل ۲): حال آنکه درمورد باکتری استفیلوکوکوس اورئوس بیشترین تغییر رنگی ایجاد شده در تیمار حاوی ۱ درصد آنتوسیانین مشاهده شد تغییر رنگ به این صورت بود که فیلم ها از رنگ سرمه ای به رنگ آبی کاربنی و آبی کم رنگ تغییر رنگ دادند (شکل ۳).

جدول ۲- نتایج آزمایش تغییرات رنگی فیلم های تولیدی

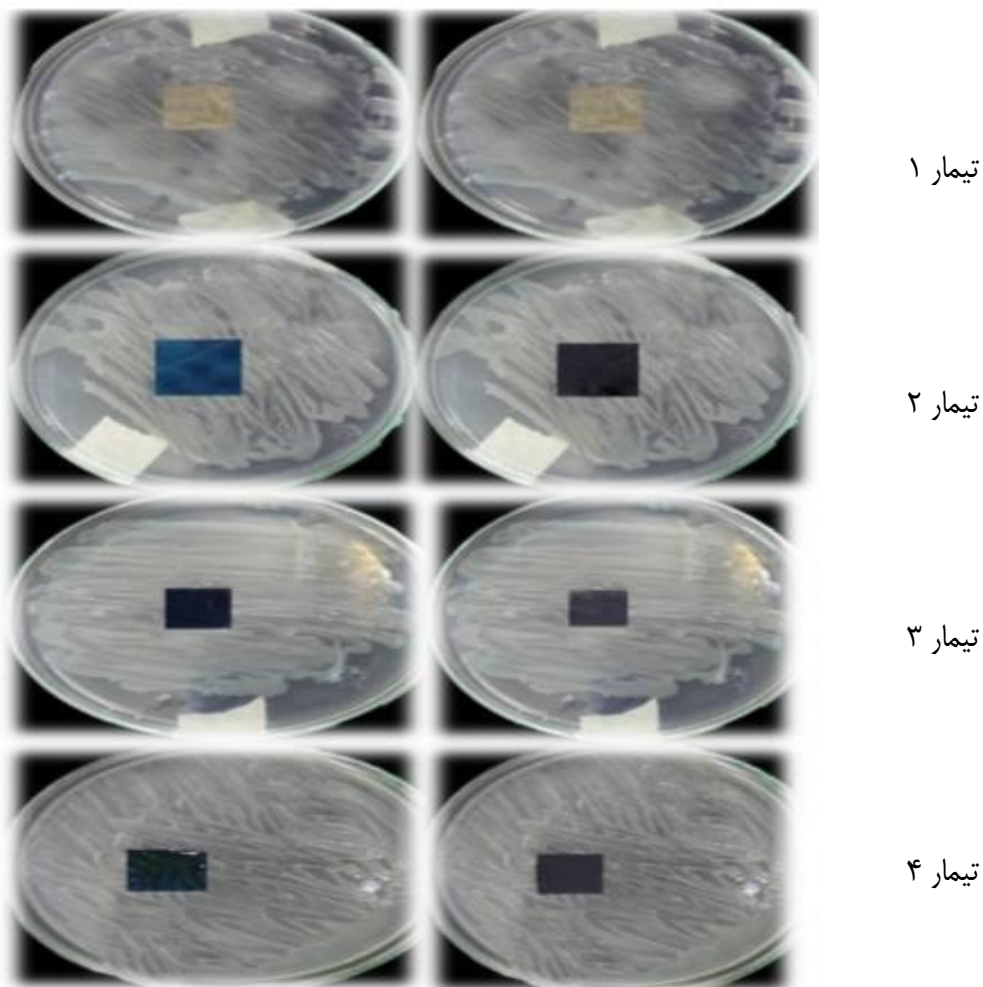
تیمار	زمان	L* (Lighting)	a*(Redness)	b*(Blueness)
تیمار ۱ (شاهد)	مقدار اولیه	60.20 ± 1.71^b	0.180 ± 0.37^a	14.60 ± 0.68^c
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا	58.40 ± 1.29^c	1.00 ± 0.23^b	14.40 ± 0.87^d
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس	58.40 ± 1.29^b	14.40 ± 0.23^d	14.40 ± 0.87^a
تیمار ۲ (۰/۵ درصد)	مقدار اولیه	13.20 ± 1.59^a	0.180 ± 0.37^a	-4.20 ± 0.37^b
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا	27.00 ± 1.17^b	-4.180 ± 0.86^a	-25.40 ± 0.23^a
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس	35.60 ± 1.08^a	-4.40 ± 0.51^a	-27.40 ± 0.51^b
تیمار ۳ (۰/۷۵ درصد)	مقدار اولیه	20.60 ± 0.54^c	1.40 ± 0.51^a	-7.20 ± 0.58^a
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا	8.20 ± 0.06^b	2.180 ± 0.49^b	-15.00 ± 0.89^b
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس	17.40 ± 1.83^b	8.60 ± 0.68^b	-20.40 ± 1.83^d
تیمار ۴ (۱ درصد)	مقدار اولیه	19.60 ± 0.15^c	1.40 ± 0.23^a	-5.00 ± 0.00^b
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا	13.40 ± 0.06^a	2.20 ± 0.68^a	-10.20 ± 2.08^c
	بعد از ۱ ساعت تماس با محیط حاوی باکتری استفیلوکوکوس اورئوس	34.20 ± 0.97^b	6.40 ± 0.23^a	-30.80 ± 0.66^c

*میانگین داده ها $\pm$ خطای استاندارد؛ حروف متفاوت، نشانه وجود اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) بین تیمارهای آزمایشی است.

رنگ فیلم‌ها پس از یک ساعت تماس با

باکتری سودوموناس آئروژینوزا

رنگ فیلم‌ها در ابتدای آزمون

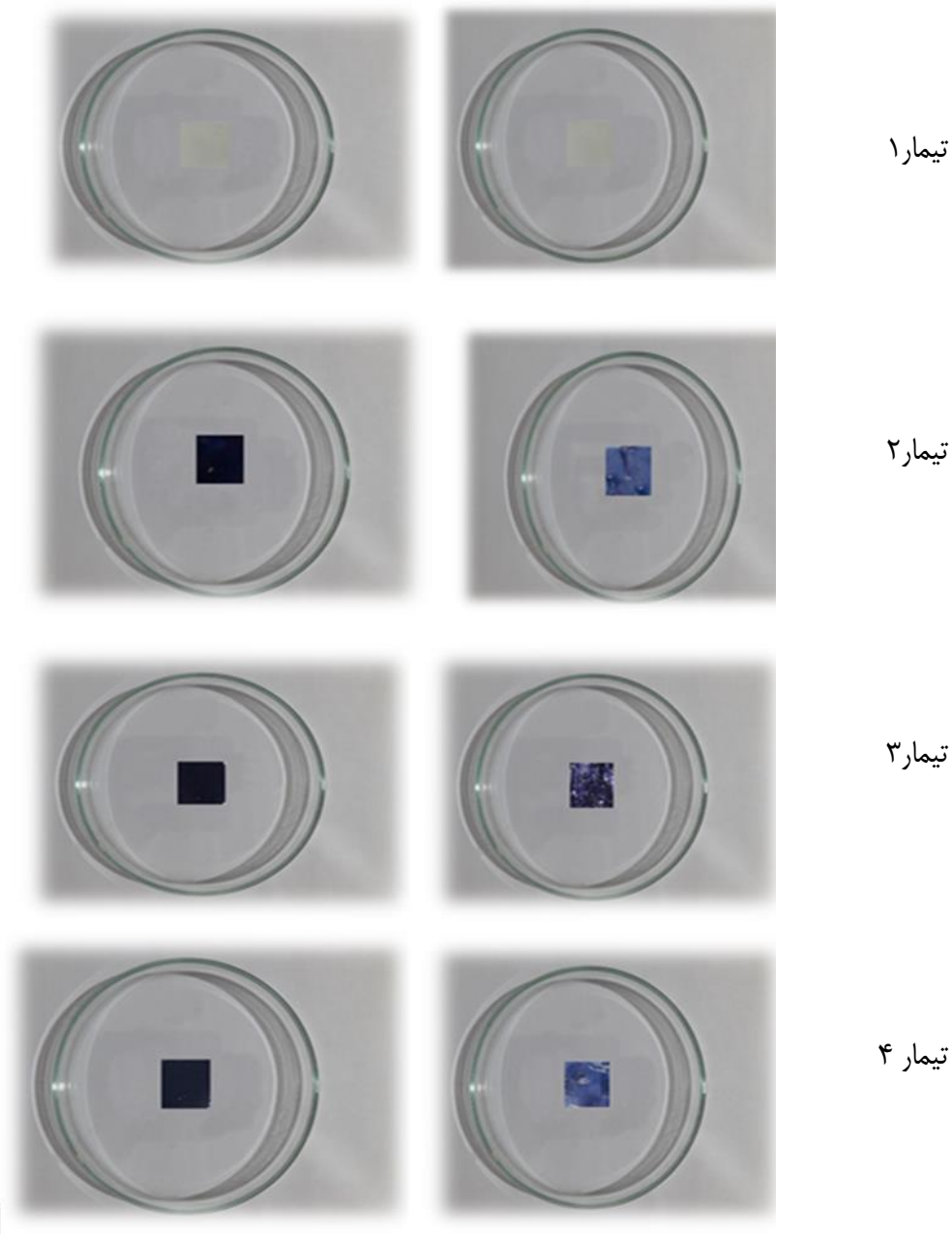


شکل ۲: نمای ظاهری تغییرات رنگی فیلم کیتوزان / صمغ عربی حاوی آنتوسیانین در پاسخ به باکتری سودوموناس آئروژینوزا
تیمار ۱ (شاهد)، تیمار ۲ (۰/۵ درصد آنتوسیانین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ درصد آنتوسیانین)، تیمار ۴ (۱ درصد آنتوسیانین)

رنگ فیلم‌ها پس از یک ساعت تماس با باکتری

استافیلوکوکوس اورئوس

رنگ فیلم‌ها در ابتدای آزمون



شکل ۳: نمای ظاهری تغییرات رنگی فیلم کیتوزان / صمغ عربی حاوی آنتوسیانین در پاسخ به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس
* تیمار ۱ (شاهد)، تیمار ۲ (۰/۵ درصد آنتوسیانین)، تیمار ۳ (۰/۷۵ درصد آنتوسیانین)، تیمار ۴ (۱ درصد آنتوسیانین)

بحث

در خصوص ضخامت فیلم‌های تولید شده در مطالعه حاضر، کمترین و بیشترین میزان ضخامت به ترتیب در تیمارهای حاوی ۱ درصد آنتوسیانین و تیمار شاهد گزارش شد. در مورد این مسئله می‌توان گفت که در محلول مورد استفاده برای تهیه فیلم یک درصد، وجود آنتوسیانین بیشتر سبب کاهش نیروی بینابینی و کشش سطحی پخش شدن بهتر ذرات در فیلم شد و همین شدت بالای پخش ذرات و طرز قرارگیری آن‌ها سبب کاهش ضخامت در فیلم‌های حاوی میزان بیشتر آنتوسیانین شد^(۱۸). که این کاهش می‌تواند مرتبط با تفاوت اندازه مولکولی و ساختار این دو بیوپلیمر باشد^(۱۹). در مطالعه‌ی دیگری که توسط قادرمرزی بر روی اختلاف معنی‌داری بین ضخامت فیلم‌های حاوی پونه کوهی پس از خشک‌شدن و بدون اسانس انجام شد مشاهده گردید که دلیل ضخامت کمتر فیلم حاوی اسانس به دلیل قرار گرفتن اسانس در فضاهای خالی بین زنجیره‌های پلیمر است و بنا به ماهیت آب‌گریزی اسانس می‌تواند در جلوگیری از جذب رطوبت زیاد توسط گلیسرول ترکیب شده با فیلم نیز موثر باشد^(۲۰).

همچنین نتایج نشان داد که درصد رطوبت فیلم‌های حاوی کیتوزان و آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد بالاتر بوده است که می‌توان این پدیده را به علت کاهش تشکیل اتصال کووالانسی بین زنجیره‌های کیتوزان دانست چون که ایجاد این اتصالات باعث کاهش آمین آزاد و گروه‌های هیدروکسیل موجود در شبکه فیلم شده است. از اینرو میزان اتصالات هیدروژنی موجود بین ملکول‌های آب و گروه‌های عاملی زنجیره پلیمری را کاهش یافته است. با کاهش این اتصالات و همچنین افزایش میزان آنتوسیانین، محتوای رطوبت فیلم‌ها افزایش یافت؛ زیرا تخریب شبکه‌ی فیلم منجر به افزایش تعداد ملکول‌های آبی در ساختار فیلم شده و در نتیجه افزایش درصد رطوبت را سبب می‌شود^(۲۱).

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ بر روی فیلم اندیکاتور pH (سلولز به کیتوزان) حاوی آنتوسیانین انجام شد، جذب آب فیلم‌های حاوی آنتوسیانین بیشتر از نمونه شاهد بود. این موضوع از مزایای فیلم‌های هشدار دهنده می‌باشد زیرا جذب رطوبت بیشتر موجب آزادسازی سریع‌تر رنگدانه‌ها می‌شود و فیلم‌های هوشمند توانایی تغییر رنگ بهتر و سریعتری را در زمان تغییر pH محیط دارد. در واقع افزودن آنتوسیانین در فیلم موجب گسستگی در شبکه کیتوزان/صمغ شد. وجود ملکول‌های پلی‌فنول زیاد در آنتوسیانین باعث کاهش اثر کش‌های بین ملکولی و باندهای هیدروژنی در فیلم کیتوزان/صمغ شد که موجب گسستگی شبکه فیلم و در پی آن افزایش جذب آب فیلم شد^(۲۲).

حلالیت فیلم نشان دهنده‌ی هیدروفیل بودن آن است و می‌تواند به‌عنوان شاخص برای اندازه‌گیری یکپارچگی فیلم و مقاومت آب، تجزیه پذیری آن به کار رود^(۲۳). حلالیت از فاکتورهای بسیار مهمی است که قابلیت استفاده از فیلم‌های تولیدی را در شرایط مختلف تعیین می‌کند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، با افزایش میزان آنتوسیانین در ساختار فیلم تولیدی، میزان حلالیت فیلم‌ها کاهش یافته است.

عموماً اثرات افزودنی‌ها روی حلالیت فیلم، به نوع، غلظت و شاخص‌های آب‌گریزی و آبدوستی ترکیبات وابسته است و انتظار می‌رود که ترکیبات آبدوست باعث افزایش حلالیت فیلم و ترکیبات آب‌گریز باعث کاهش آن شود. گفتنی است در مطالعه حاضر کاهش درصد حلالیت فیلم‌های حاوی آنتوسیانین می‌تواند به دلیل کاهش آبدوستی فیلم‌ها در اثر واکنش بین ترکیبات رنگدانه و گروه‌های هیدروکسیل فیلم باشد که می‌تواند دسترسی راحت گروه‌های هیدروکسیل برای واکنش با مولکول‌های آب را کاهش داده و منجر به کاهش حلالیت فیلم‌ها شود^(۲۴). گلیسرول و صمغ‌ها به دلیل محلول‌بودن در آب باعث افزایش میزان حلالیت و لیپیدها به دلیل نامحلول بودن در آب باعث کاهش حلالیت می‌شوند^(۲۴،۲۵).

همچنین در تحقیقی که توسط حسینی و همکاران در سال ۲۰۰۸ روی بررسی خواص ضد میکروبی، مکانیکی و فیزیکی فیلم‌های خوراکی تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس های میخک و آویشن انجام شد به این نتیجه رسیدند که به علت ترکیبات متفاوت اسانس مختلف، با اضافه شدن اسانس آویشن، محتوای رطوبت فیلم‌ها افزایش یافت ولی با افزایش غلظت اسانس دارچین محتوای رطوبت به طور معنی‌داری کاهش را نشان داد (۲۶).

در بررسی تغییرات رنگی فیلم‌های هوشمند، سه پارامتر a^* و b^* بررسی می‌شود که پارامتر L^* مربوط به روشنایی یا تیرگی فیلم، a مربوط به سبز یا قرمز بودن و b^* مربوط به آبی یا زرد بودن فیلم می‌باشد. در مطالعه حاضر افزودن آنتوسیانین به فیلم تولید شده باعث کاهش معنی‌دار میزان L^* در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد (کیتوزان/صمغ عربی) شد و این به این معناست که روشنایی رنگ فیلم‌های حاوی آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است. پارامتر b^* در تیمار شاهد بیشترین میزان را نشان داد و میزان b^* در تیمارهای حاوی آنتوسیانین، مقادیر کمتری را دارا می‌باشد و نشان می‌دهد که رنگ این فیلم به سمت آبی مایل به بنفش رفته است. در مورد میزان پارامتر a^* می‌توان گفت که با افزایش میزان آنتوسیانین در ساختار فیلم، افزایش یافته و به سمت رنگ قرمز گرایش پیدا کرده است. باکتری‌های موجود به دلیل هضم پروتئینی بافت‌ها بر اثر پروتئازهای باکتریایی گروه‌های آمونیومی و ترکیبات آمین‌دار تولید می‌شود که منجر به بالا رفتن pH می‌شود (۲۷).

در مطالعه فیلم‌های تولیدشده فاقد اسانس بنه، روشن‌تر (میزان L^* بالاتر) بوده و افزایش غلظت اسانس از صفر به ۲ درصد، سبب کاهش L^* ، افزایش a^* و b^* گردید که علت آن می‌تواند وجود ترکیبات فنولی موجود در اسانس بنه باشد که در طول موج‌های پایین توانایی جذب نور را دارند (۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱).

در تحقیقی از اصدق قزقاچان و همکاران (۲۰۱۹) که بر روی اثرات عصاره گیاهی زنیان و ترکیب بتاکاروتن بر فیلم تولید شده مشخص شد که مقدار اسانس زنیان اثر معنی‌داری روی روشنایی (L^*) ندارد ولی افزایش میزان بتاکاروتن تا ۰/۱۵ درصد با شدت بیشتری باعث کاهش شفافیت فیلم شد و همچنین مقدار شاخص قرمزی (a^*) تحت تأثیر معنی‌دار اثر خطی و درجه دوم اسانس زنیان و بتاکاروتن قرار گرفت و اسانس زنیان تا ۰/۲۵ درصد باعث کاهش مقدار a^* و بالاتر از ۰/۲۵ باعث افزایش مقدار a^* شد که دلیل آن می‌تواند به پراکندگی نور ناشی از توزیع ذرات چربی در طول فرایند خشک کردن مربوط باشد. مقدار شاخص قرمزی با اضافه شدن بتاکاروتن تا ۰/۱۵ درصد با شیب تندی افزایش پیدا کرد و در بیشتر از این مقدار پارامتر قرمزی ثابت شد و همچنین با افزایش مقدار بتاکاروتن تا ۰/۱۵ مقدار شاخص زردی به سرعت افزایش پیدا کرد ولی با افزایش مقدار بتاکاروتن اثر معکوس ایجاد شد (۳۲). نتایج مطالعه حاضر در خصوص تغییر رنگ فیلم‌ها پس از یک ساعت قرارگیری در معرض باکتری استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که در خصوص باکتری سودوموناس بیشترین میزان تغییر رنگ فیلم‌ها در تیمار ۰/۵ درصد و در خصوص باکتری استافیلوکوک اورئوس تیمار ۱ درصد آنتوسیانین بیشترین تغییر رنگ را نشان داد. گفتنی است عامل pH از فاکتورهای مهم و موثر بر رشد میکروبی است و در همچنین می‌تواند متاثر از فعالیت‌های میکروبیولوژیک باشد (۲۷). تجزیه ترکیبات نیترروژنی موجود در عضلات و ماهیچه‌ها منجر به افزایش pH محیط بدن شده که یک بخش از این افزایش احتمالاً مرتبط با تشکیل آمین‌هایی از قبیل آمونیاک و تری متیل آمین به دلیل تجزیه پروتئینی توسط باکتری‌های عامل فساد و نیز فعالیت‌های آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز باشد که نشانگر رشد باکتری‌ها است. از سویی دیگر، به دلیل اینکه ترکیب فالویلوم در آنتوسیانین‌ها کمبود الکترون دارد، ترکیبات حاوی آنتوسیانین آمادگی شرکت در واکنش‌های تجزیه یا تغییر رنگ را دارا می‌باشند. آنتوسیانین‌ها ترکیباتی بسیار ناپایدار بوده و به راحتی قابل تخریب می‌باشند. همچنین پایداری آنتوسیانین‌ها تحت تأثیر pH اکسیژن، نور، حضور آنزیم‌ها، دمای

نگهداری، غلظت آنتوسیانین، دی‌اکسید گوگرد، یون‌های فلزی، کوپینگمان‌ها، ساختمان و حضور ترکیبات دیگر همچون مواد معدنی و غیره قرار دارد. گفتنی است تجزیه آنتوسیانین‌ها در pH های بالاتر، بیشتر صورت می‌گیرد و بسیاری از آن‌ها در شرایط اسیدی، قرمز رنگ هستند و هر چه اسیدیته کمتر شود، به رنگ آبی مایل به بنفش نزدیکتر می‌گردند.

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی کمالی و همکاران (۱۳۹۶) نشان دهنده‌ی این است که پارامتر b^* در pH ۶/۶۱، بیشترین مقدار خود را دارد و این بیانگر آن است که در این لحظه و زمان مقدار رنگ زرد در فیلم از زمان‌های دیگر زیادتر است. همچنین میزان پارامتر b^* در pH ۶/۸۹ در کمترین حد خود قرار دارد، یعنی رنگ آبی مایل به بنفش در این زمان به طور مشخص قابل مشاهده است. این شیوه حتی با مشاهدات سطحی نیز ثابت شد زیرا مطابق با مشاهدات در pH ۶/۸۹، رنگ فیلم به یکباره به رنگ آبی متمایل به بنفش درآمد و در این زمان مرزی بین رنگ‌های پدید آمده در فیلم، ایجاد شد و بعد از این زمان دیگر محصول بسته‌بندی شده قابلیت مصرف خود را از دست داد (۳۰).

در مطالعه‌ی دیگری رنگ حسگر فساد و شاخص های L^* ، a^* و b^* متناسب با جذب گازهای حاصل از فساد درون بسته توسط حسگرها تغییر می‌کند و با افزایش فساد، رهائش گازها به درون بسته بیشتر می‌شود و این امر می‌تواند سبب تغییر رنگ حسگرها شود. همچنین شاخص روشنایی L^* در حسگرهای برموفنول آبی بر پایه کاغذ صافی و بر پایه فیلم کیتوزان در طول نگهداری گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی روند کاهشی نشان داده است که می‌توان آن را به جذب گازهای حاصل از فساد توسط حسگرها و تغییر pH نسبت داد اما این شاخص در برموکروزول سبز روند مرتبی نشان نداد. شاخص a^* نیز در حسگرهای برموفنول آبی در طول نگهداری گوشت چرخ شده ماهی روند کاهشی نشان داد در حالی که این شاخص در حسگر برموکروزول سبز روند افزایشی نشان داد که این اتفاق به ماهیت این شناساگر بازمی‌گردد زیرا این حسگر در محیط‌های قلیایی بدین‌گونه عمل می‌کند. شاخص b^* در طول دوره نگهداری در تمامی حسگرها روند کاهشی نشان داده که نشان دهنده قلیایی شدن تمام حسگرها می‌باشد و تغییرات رنگی ایجادشده در تمام حسگر به تولید ترکیبات حاصل از فساد باکتریایی، اکسیداسیونی و شیمیایی بازمی‌گردد (۳۱،۳۲).

در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که استفاده از آنتوسیانین‌های طبیعی گیاه دارویی چای ترش در ساختار فیلم‌های نشانگر هوشمند می‌تواند به خوبی با بسترهای مختلف تشکیل فیلم سازگار باشند و بر اساس نتایج SEM، عصاره آنتوسیانین چای ترش تأثیر معنی داری بر ریزساختار فیلم کامپوزیت داشته و سازگاری خوبی با ماتریس پلی‌وینیل الکل/نشاسته دارد و دارای بهترین میزان ثبات رنگ است. بنابراین این فیلم SPR می‌تواند در تحقیقات روی تازگی گوشت خوک مورد استفاده قرار گیرد. در این آزمایش، هنگامی که مدت زمان ذخیره گوشت به ۳۶ ساعت رسید، مقدار TVB-N ۱۵/۶۹ میلی گرم در ۱۰۰ گرم بود. در بیشتر این مقادیر، رنگ فیلم از قرمز به آبی تغییر یافته و نمونه گوشت خوک شروع به فساد می‌کند. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که آنتوسیانین‌های چای ترش می‌توانند یک ماده اولیه مناسب برای فیلم‌های نشانگر هوشمند و نشانگر تازگی محصولات گوشتی باشند (۳۳).

مطالعه روی نشانگر سلولز / کیتوزان همراه با آنتوسیانین هویج و حساس به pH برای بسته بندی مواد غذایی هوشمند حاکی از این بود که رنگ محلول ABC (هویج سیاه) در pH 2-6 بنفش و در pH 7 صورتی رنگ شده و با افزایش pH از ۸ به ۱۰، رنگ آن به سمت رنگ آبی روشن رفته و در pH ۱۱ به رنگ خاکستری درآمده است. تغییر رنگ ABC به ساختار آنتوسیانین‌ها مربوط می‌شود که کاتیون‌های فلاویلیوم سبب ایجاد رنگ قرمز در شرایط اسیدی و رنگ بنفش و آبی تیره در محیط بازی و خنثی می‌شود. بالاترین مقدار برای پارامتر (L^*) در pH ۲ مشاهده شد که به معنای وجود شدت بالای رنگ قرمز و شفافیت بیشتر در این pH است. درمورد پارامتر a^* (سبز - قرمز) با افزایش pH روند کاهشی نشان داد و روند مشابهی نیز برای پارامتر b^* مشاهده شد که مقادیر آن نشان

دهنده‌ی تمایل رنگ فیلم به رنگ‌های آبی، بنفش و زرد بود. آنتوسیانین‌های اصلی هویج سیاه ترکیبات مبتنی بر سیانیدین استیل‌ه هستند و ۲۵-۵۰ درصد از ترکیبات فنلی کل را تشکیل می‌دهند. آنتوسیانین‌های گیاهی با گروه‌های آمینه نسبت به دما و pH پایدارتر هستند^(۳۴). در مطالعه دیگری عملکرد فیلم نشانگر حساس به pH حاوی آنتوسیانین‌های هویج سیاه و نشاسته برای نظارت بر تازگی یا فساد شیر پاستوریزه نشان دهنده‌ی این بود که تغییر رنگ نشان دهنده ارتباط بالای بین تغییرات فیزیوشیمیایی و میکروبی شیر در طول فرآیند فساد است و این شاخص توانایی تشخیص شیر تازه و فاسد شده را دارد^(۳۴،۳۵،۳۶).

نتیجه گیری

با توجه به رشد روزافزون تکنولوژی، امروزه مبحث تولید زخم‌پوش‌های هوشمند طبیعی خصوصاً انواعی از زخم پوش‌ها که قابلیت هشدار ایجاد عفونت در زخم را داشته باشد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. لذا در مطالعه حاضر اقدام به تولید فیلم زخم پوش هوشمند هشداردهنده حاوی کیتوزان، آنتوسیانین و صمغ عربی شد. پس از تولید فیلم‌های زیست تخریب پذیر با غلظت‌های مختلف آنتوسیانین، به منظور بررسی قابلیت هشداردهندگی فیلم‌ها، تغییرات آنها در پاسخ به رشد دو باکتری استافیلوکوکوس و سودوموناس آئروژینوزا، که از باکتریهای شایع در عفونت زخم‌ها می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت مشخص شد که بهترین فیلم تولید شده از نظر خصوصیات فیزیکی، فیلم ۱ درصد و از نظر تغییر رنگ در پاسخ به رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا تیمار حاوی ۰/۵ درصد آنتوسیانین و در پاسخ به رشد باکتری استافیلوکوک تیمار حاوی یک درصد آنتوسیانین می‌باشد. لذا استفاده از آنها در تولید زخم پوش‌های هوشمند توصیه می‌شود.

منابع:

- 1- Alipour, H., Koosha, M., Sarraf Shirazi, M., Jabali, A. 2016. A review of modern commercial wound dressings and the introduction of several new wound healing dressings. Scientific-Extension Quarterly. 4: 65-80. (in Persian).
- 2- Mohammadi, F., Mousavi, S.M., Rezaie, A., 2012. Histopathological study of parasitic infestation of skin and gill on Oscar (*Astronotus ocellatus*) and discus (*Symphysodon discus*). Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation 5, 88-93.
- 3- Hosseini, H., Sadri, M., Fassihi, M., Ranjbar, R. 2012. Preparation of chitosan / PEO polymer nanofibers and mupirocin additive using electrostatic method for use in superficial wound dressing. Iranian Journal of Medical Microbiology. 3: 31-36 (in Persian).
- 4- Bhattarai, N., Ramay, H.R., Gunn, J., Matsen, F.A., Zhang, M., 2005. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. Journal of Controlled Release 103, 609-624.
- 5 Sattari, M., Shahsoni, D., Shafiee, Sh. 2007. Fisheries 2. Haghshenas Publications. 502 pages. (in Persian)
- 6- Hu, K., Feng, L., Jiang, W., Liu, Y., Jiang, J., Li, S., Zhou, X., 2014. Oxidative damage repair by glutamine in fish enterocytes. Fish physiology and biochemistry 40, 1437-1445.
- 7- Rajaei, K., Taziki, M., Rabiee, M., Graili, P. 2007. The effect of dressing on wound infection rate in clean surgeries. Scientific Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 9 (2): 35-38. (in Persian)
- 8-Tuyserkani, H., Sedaghat, F. 1391. Chitin and chitosan: structure, properties and applications. Journal of Aquatic Ecology. 2 (3): 40-26. (in Persian).
- 9- Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., Tamura, H., 2007. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. International journal of biological macromolecules 40, 175-181.
- 10- Lee, J.H., Lim, J.D., Choung, M.-G., 2013. Studies on the anthocyanin profile and biological properties from the fruits of *Acanthopanax senticosus* (*Siberian Ginseng*). Journal of Functional Foods 5, 380-388
- 11- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M., Raghavarao, K., 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. Food and bioproducts processing 90, 615-623.
- 12- Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64, 923-933

- 13- Zozio, S., Pallet, D., Dornier, M., 2011. Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus Benth.*), açai (*Euterpe oleracea Mart.*) and black carrot (*Daucus carota L.*). *Fruits* 66, 203-215.
- 14- Francois, P., Hochmann, A., Huyghe, A., Bonetti, E.-J., Renzi, G., Harbarth, S., Klingenberg, C., Pittet, D., Schrenzel, J., 2008. Rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolates by automated multilocus variable-number of tandem repeats: a tool for real-time epidemiology. *Journal of microbiological methods* 72, 296-305.
- 15- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S., 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 59, 282-289.
- 16- Palleroni, N.J., 2010. The pseudomonas story. *Environmental microbiology* 12, 1377-1383.
- 17- Xu T., Gao C., Feng X., Yang Y., Shen X., Tang X., 2019. Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International journal of biological macromolecules* 134, 230-236.
- 18- Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P. and Buonocore, G. 2010. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82: 291–298.
- 19- Bourtoom, T., Chinnan, M., Jantawat, P. and Sanguandeeikul, R. 2006. Effect of select parameters on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water. *LWT*, 39: 405–418.
- 20- Norajit, K., Kim, K.M., Ryu, G.H., 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering* 98, 377-384.
- 21- Piermaria, J. A., Mariano, L., & Abraham, A. G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520-1527.
- 22- Tirtashi, F., Moradi, M., Tajik, H., Forough, M., Ezati, P., Kuswandi, B. 2019. Cellulose/chitosan pH-responsive indicator incorporated with carrot anthocyanins for intelligent food packaging. *International journal of biological macromolecules*. 136, 920-926.
- 23- Ghadermazi, R., Keramat, J., Goli, A. 2015. Effect of Oregano Essential Oil on Properties of Hydroxypropylmethylcellulose-Based Edible Film. *Innovative Food Technologist (IFT)*. 7,61-74.
- 24- Kavoosi, G., Dadfar, S.M.M., Purfard, A.M., 2013. Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *Journal of Food Science* 78, E244-E250.
- 25- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M.A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S.M., Khaksar, R., 2014. Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers* 101, 582-591.
- 26- Hosseini, M.H., Razavi, H., Ebrahimzadeh Mousavi, M. 2008. Investigation of antimicrobial, physical and mechanical properties of edible films produced from chitosan containing thyme and clove essential oils. *Iranian Food Science and Technology*. 5 (17): 41-50. (in Persian).
- 27- Song, X., Zuo, G., & Chen, F. (2018). Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1302-1309.
- 28- Flores, C., Lopez, M., Tabary, N., Neut, C., Chai, F., Betbeder, D., Herkt, C., Cazaux, F., Gaucher, V., Martel, B., 2017. Preparation and characterization of novel chitosan and β -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydrate polymers* 173, 535-546.
- 29- Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S.O., Jafari, S.H., Supaphol, P., 2010. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies* 21, 77-95.
- 30- Kuswandi, B., Restyana, A., Abdullah, A., Heng, L.Y., Ahmad, M., 2012. A novel colorimetric food package label for fish spoilage based on polyaniline film. *Food control* 25, 184-189.
- 31- Alizade, V., Barzegar, h., Nasehi, B., Samavati, v. 2017. Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing *Pistacia atlantica* gum essence. *Iranian Food Science and Technology research journal*. 13(4), 584-593. (in Persian).
- 32- Asdagh A, pirs S, KhosroshahiAsl A. 2019. Preparation of Antioxidant and Antimicrobial Color Pectin Film Containing Carumopticum Essence and Beta-Carotene Pigment and Investigation its properties. *Journal of food science and technology (Iran)*.16 (86) :235-249. (in Persian).
- 33- Kamali Sabet1, N., Rostamzad, H., Babakhani, A. 2018. Production and evaluation of smart biodegradable film based on carrageenan for fish fillet packaging. *Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources*. 72(1), 85-95. (in Persian).

- 34- Naghdi, SH., Rezaei, M., Abdollahi, M. 2021. A starch-based pH-sensing and ammonia detector film containing betacyanin of paperflower for application in intelligent packaging of fish. International journal of biological macromolecules. 191, 161-170.
- 35- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S., 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control 59, 282-289.
- 36- Moazami Goodarzi, A., Darvish Sarvestani, A., and Hadipour, A. 2020. Iranian Journal of Oil & Gas Science and Technology. 9(1), 33-46.

Production of chitosan-based smart composite against bacterial infection

Seyyede Razie Hashemi, Haniyeh Rostamzad*, Masoud Sattari

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Gilan, Soamesara, Iran.

ABSTRACT

This study aimed to produce a smart infection warning film based on chitosan and gum arabic containing anthocyanin (0.5, 0.75, and 1 g) as a wound infection warning. Chitosan/gum film was prepared in a ratio of 1:2 with different doses of anthocyanin pigment (0.5, 0.75, and 1 g), and the control sample was considered without anthocyanin. The prepared film was evaluated on *Pseudomonas* and Mannitol salt agar media. To evaluate the functional properties of the prepared film, the amount of moisture, solubility, thickness, and water absorption of the treatments were measured. The lowest and highest film moisture content were in the control treatment, and the treatment contained 0.75% anthocyanins, respectively. As the percentage of anthocyanin increased, the thickness and solubility of the samples decreased significantly. Regarding the water absorption test, the highest amount was related to the treatment containing 1% anthocyanin, and the lowest amount belonged to the control treatment. To evaluate the effect of chitosan or gum film containing anthocyanin on the culture medium when the bacteria were well grown, chitosan or gum biofilms containing different concentrations of anthocyanin were cut to 1.1 cm and cut into It was placed on the culture medium for 60 minutes, and the color change of the films was checked with a colorimeter. The highest rate of color change of films in culture medium containing *Pseudomonas aeruginosa* was obtained in the treatment containing 0.5%; however, in the case of *Pseudomonas aureus*, the highest color change was observed in the treatment containing 1%. Finally, the best film in terms of physical characteristics is the 1% treatment, and in terms of color change in response to the growth of *Pseudomonas*, it is 0.5%, and for *Staphylococcus aureus*, it is 1%.

KEYWORDS: Smart wound, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Biopolymer, Arabic Gum, Anthocyanin.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 27 Jan 2023

Accepted: 4 June 2024

ePublished: 9 June
2024

* Corresponding Author:

Email address: hroostamzad@guilan.ac.ir

Tel: 09113432511

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513