



**Extraction and evaluation of gelatin from
yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) skin and
prospect as an alternative to mammalian gelatin**

Item Type	thesis
Authors	Sadeghi, H.
Publisher	Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
Download date	06/09/2023 23:55:42
Link to Item	http://hdl.handle.net/1834/40430

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



معاونت پژوهش و فن آوری

به نام خدا

منشور اخلاق پژوهش

یادری از خداوند جهان و اعتقاد به این که عالم محضر خداست و همواره ناظر بر اعمال انسان و به منظور پاس داشت مقام بلند دانش و پژوهش و نظریه آیهت مبایدا و دانشگاه و اعتقادی فرهنگ و تمدن بشری، مادیان و انجمن و اصناف به است علمی

و اصنافی دانشگاه آزاد اسلامی متعهد می گردیم اصول زیر را در انجام فعالیت های پژوهشی مد نظر قرار داده و از آن تعقیب کنیم:

- ۱- اصل حقیقت جویی: تلاش در راستای پی جویی حقیقت و وفاداری به آن و دوری از حرکت به نفع سازی حقیقت.
- ۲- اصل رعایت حقوق: التزام به رعایت کامل حقوق پژوهشگران و پرسیدگان (انسان، حیوان و نبات) و سایر مساجد حق.
- ۳- اصل مالکیت مادی و معنوی: تعهد به رعایت کامل حقوق مادی و معنوی دانشگاه و دیگر به کاران پژوهش.
- ۴- اصل منفعت ملی: تعهد به رعایت مصالح ملی و در نظر داشتن و پیشبرد توسعه کشور و دیگر مراحل پژوهش.
- ۵- اصل رعایت انصاف و امانت: تعهد به اجتناب از حرکت به جانب داری غیر علمی و حفاظت از اموال، تجهیزات و منابع در اختیار.
- ۶- اصل رازداری: تعهد به صیانت از اسرار و اطلاعات محرمانه افراد، سازمان ها و کشور و دیگر افراد و نهادهای مرتبط با تحقیق.
- ۷- اصل احترام: تعهد به رعایت حریم با حرمت با انجام تحقیقات و رعایت جانب تعد و خودداری از حرکت به حرمت شکنی.
- ۸- اصل ترویج: تعهد به رواج دانش و اشتهار نتایج تحقیقات و انتقال آن به به کاران علمی و دانشجویان به غیر از مولودی که منع قانونی دارد.
- ۹- اصل برکت: التزام به برکت جویی از حرکت به رفتار غیر حرفه ای و اعلام موضع نسبت به کسانی که حوزه علم و پژوهش را به نفع های غیر علمی آلوده.



واحد علوم تحقیقات

تعهد نامه اصالت رساله یا پایان نامه

اینجانب هما صادقی دانش آموخته مقطع دکتری تخصصی در رشته زیست شناسی دریا که در تاریخ ۹۵/۶/۱۷ از پایان نامه خود تحت عنوان " بررسی اثرات آنتی باکتریال نانوذراتین تولید شده از تون ماهی زرد باله-گیدر (*Thunnus albacares*) " با کسب نمره ۱۸/۷۵ و درجه بسیار خوب دفاع نموده ام. بدین وسیله متعهد میشوم:

- ۱) این پایان نامه / رساله حاصل تحقیق و پژوهش انجام شده توسط اینجانب بوده و در مواردی که از اعم از پایان نامه، کتاب، مقاله و ... استفاده نموده ام، مطابق ضوابط دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران (و رویه موجود، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در فهرست مربوطه ذکر و درج کرده ام.
- ۲) این پایان نامه قبلاً برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پائین ریا بالاتر) در سایر دانشگاه ها و موسسات آموزشی عالی ارائه نشده است.
- ۳) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده و هرگونه بهره برداری اعم از چاپ کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان نامه داشته باشم، از حوزه معاونت پژوهشی واحد مجوزهای مربوطه را اخذ نمایم.
- ۴) چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را میپذیرم و واحد دانشگاهی مجاز است با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت ابطال مدرک تحصیلی ام هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

هما صادقی

۹۵/۱۲/۵



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته زیست شناسی دریا گرایش جانوران دریا (Ph.D)

عنوان:

بررسی اثرات آنتی باکتریال نانوذراتین تولید شده از تون ماهی زرد باله-گیدر

(*Thunnus albacares*)

استادان راهنما:

دکتر شهلا جمیلی

دکترسید مهدی رضایت

استادان مشاور:

دکتر حسین عطار

دکتر فرهاد کی مرام

نگارش:

هما صادقی

سال تحصیلی ۱۳۹۵-۱۳۹۴

سپاسگزاری

از خانم دکتر جمیلی که در این راه طولانی مرا یاری دادند تا این پایان نامه را به انجام برسد.
از آقای دکتر رضایت که با این همه مسوولیت، با دلسوزی به من کمک کردند.
از آقای دکتر حسین عطار و آقای دکتر فرهاد کی مرام که راهنمایی های ارزنده ایی در طول انجام کار برای من داشتند.

از کارشناسان آزمایشگاه آقایان محسنیان، عصاره و آقای دکتر مختارپور کمال تشکر را دارم.

و خانم سلیمی که خواهرانه در کنار من بود تا سر منزل مقصود برسم.

تقدیم به

مادرم که بدون او من هیچ گاه قادر انجام این پایان نامه نبودم.
همسرم، خواهرم و پدرم که هر کدام سهم ارزنده ایی در کمک به من داشتند و
پسر نازنینم، داتیس عزیزم که همیشه با خنده هایش مرا به ادامه تشویق می کرد.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	چکیده.....
۳	فصل اول کلیات تحقیق.....
۴	مقدمه.....
۵	فرضیه های تحقیق.....
۵	اهداف.....
۶	اهمیت و ارزش تحقیق.....
۶	۱-۱-ژلاتین.....
۶	۱-۱-۱-کلاژن و ساختار آن.....
۹	۲-۱-ژلاتین ماهی.....
۱۰	۳-۱-زیست شناسی ماهیان تون.....
۱۲	۴-۱-مصرف و تولید آبزیان در ایران و جهان.....
۱۲	۴-۱-۱-افزایش مصرف آبزیان.....
۱۵	۵-۱-خواص شیمیایی و ساختاری ژلاتین ماهی.....
۱۶	۶-۱-خواص رئولوژیکی.....
۱۶	۷-۱-خواص حسی.....
۱۶	۸-۱-کاربردهای ژلاتین ماهی.....
۲۱	۹-۱-ترکیب ژلاتین.....
۲۲	۱۰-۱-ویژگیهای ظاهری.....
۲۲	۱۱-۱-ویسکوزیته ژلاتین.....
۲۳	۱۲-۱-فعالیت سطحی.....
۲۳	۱۳-۱-خواص ژل.....

۱۴-۱-فاکتورهای موثر بر خواص ژل ژلاتین عبارتند از:	۲۵
۱۵-۱-نانو تکنولوژی	۲۵
۱۵-۱-تعریف فناوری نانو	۲۶
۱۶-۱-انواع حاملین	۲۶
۱۶-۱-ویژگی حاملین دارو	۲۷
۱۷-۱-اثرات ضد باکتری	۲۹
۱۷-۱-مبارزه آنتی بیوتیک ها با باکتری ها	۳۰
فصل دوم مروری بر ادبیات تحقیق و پیشینه تحقیق	۳۴
۱-۲- تاریخچه استفاده از ضایعات ماهی برای تولید ژلاتین	۳۵
۲-۲- تاریخچه نانو	۳۸
فصل سوم (روش اجرای تحقیق)	۴۳
۱-۳- وسایل مورد نیاز	۴۴
۲-۳- مواد مورد نیاز	۴۴
۳-۳- روش کار	۴۴
۱-۳-۳- روش استخراج ژلاتین	۴۴
۲-۳-۳- مشخصات کیفی ژلاتین	۴۶
۳-۳-۳- تعیین رنگ	۴۶
۴-۳-۳- تعیین pH	۴۶
۵-۳-۳- تعیین رطوبت	۴۷
۶-۳-۳- تعیین قدرت بستن ژلاتین	۴۷
۷-۳-۳- تعیین دما و زمان باز شدن	۴۸
۸-۳-۳- تعیین اسیدهای آمینه	۴۸
۹-۳-۳- الکتروفورز	۵۱
۱۰-۳-۳- طیف سنجی مادون قرمز FTIR	۵۱

۵۲	۳-۴-تهیه نانو ذرات ژلاتین.....
۵۲	۳-۴-۱-اندازه گیری ذرات
۵۲	۳-۴-۲-اندازه گیری زتا.....
۵۲	۳-۴-۳-مشاهده ذرات
۵۳	۳-۵-سنجش آنتی باکتریال.....
۵۷	فصل چهارم_تجربه و تحلیل داده ها (یافته ها)
۵۸	۴-۱-۱-مشخصات کیفی ژلاتین.....
۵۹	۴-۱-۱-۱-ترکیبات اسیدهای آمینه
۶۰	۴-۱-۳-طیف سنجی مادون قرمز ژلاتین
۶۱	۴-۲-۲-ذرات نانو ژلاتین.....
۶۹	۴-۳-۳-خاصیت ضد باکتری.....
۷۰	۴-۳-۱-ارتباط بین اندازه نانو ذرات ژلاتین و فعالیت ضد باکتری.....
۷۱	۴-۴-۴-نتایج آماری.....
۸۰	فصل پنجم_نتیجه گیری و پیشنهادات.....
۸۱	نتیجه گیری.....
۸۸	پیشنهادهات.....
۹۰	منابع فارسی.....
۹۲	منابع انگلیسی.....
۱۰۵	چکیده انگلیسی.....

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول (۱-۱) آماری از صید ماهی تون زرد باله از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۹۴ از شیلات ایران نشان می‌دهد که ماهی تون زرد باله یکی از بیشترین صید ها را در بین گونه های ماهیان تون شامل میشود (دفتر آمار و بودجه سازمان شیلات، ۱۳۹۵).....	۱۴
جدول (۲-۱) - میانگین کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی پستانداران (گاو) (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵).....	۱۸
جدول (۱-۴): مشخصات کیفی ژلاتین استخراج شده از ماهی تون زردباله	۵۸
جدول (۲-۴): ترکیب اسیدهای آمینه از ماهی تون زردباله.....	۵۹
جدول (۳-۴): تاثیر pH های مختلف، میزان سرعت اضافه کردن استون، میزان دفعات استفاده از فیلتر و درصد گلوتر آلدهید بر روی اندازه ذرات و زتا پتانسیل	۶۴
جدول ۴-۴: MIC و MBC (ماکرو لیتر بر میلی لیتر) شاهد منفی (آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین)	۷۰
جدول ۴-۵: ارتباط بین اندازه نانوذرات ژلاتین و وجود (+) یا عدم (-) وجود فعالیت ضد باکتری	۷۱
جدول (۱-۵): اختلاف بین فاکتورهای ماهی تون زرد باله با استاندارد (Gelatin manufactures insutitute of America,2003).....	۸۱
جدول (۲-۵): مقایسه بعضی از فاکتورهای ژلاتین ماهی تون زردباله با ژلاتین پستانداران (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵).....	۸۲
جدول (۳-۵): مقایسه بین اسیدهای آمینه ژلاتین پوست خوک و گاوی (Wainwright,1977) ، تیلاپا (Songchotikupan et al.,2008) و ماهی تون زردباله	۸۳

۱۱	شکل (۱-۱) نمای ظاهری و وضعیت باله ها در ماهیان تون (Nelson, 1994).
۱۳	شکل (۲-۱): نمایی از ماهی تون زردباله
۴۵	شکل (۱-۳): ماهی تون زرد باله - گیدر
۴۵	شکل (۲-۳): مراحل تهیه ژلاتین
۴۶	شکل (۳-۳): تعیین رنگ ژلاتین
۴۶	شکل (۴-۳): مراحل تعیین pH
۴۷	شکل (۵-۳): پلیت حاوی ژلاتین در آون جهت تعیین رطوبت
۴۷	شکل (۶-۳): مراحل قدرت بستن ژلاتین
۵۰	شکل (۷-۳): انجام کروماتوگرافی ژلاتین (Games, 1987).
۵۱	شکل (۸-۳): انجام الکتروفورز
۵۲	شکل (۹-۳): تهیه نانو ذرات ژلاتین
۵۴	شکل (۱۰-۳): باکتری های لیوفیلیزه با ATCC مشخص و دیسک خالی و دیسکهای سیپروفلوکساسین جهت کنترل
۵۵	شکل (۱۱-۳): کشت های باکتری ها و تهیه غلظت نیم مکفارلند
۵۵	شکل (۱۲-۳): تهیه رقت برای تعیین MIC و MBC ژلاتین با روش دیسک
۵۵	شکل (۱۳-۳): گذاشتن دیسک ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار
۵۵	شکل (۱۴-۳): تهیه رقت برای تعیین MIC و MBC نانوژلاتین به روش توریدیمتری
۵۸	شکل (۱-۴): نمایی از ژلاتین ماهی تون زردباله
۶۰	شکل (۲-۴): طیف سنجی مادون قرمز از ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تون زردباله میباشد.
۶۱	شکل (۳-۴): ژل SDS-PAGE در ماهی تون زردباله (Y) و گاوی (B) و لدر (C) جهت تعیین وزن مولکولی (۲۵۰ و ۱۳۰ کیلو دالتون) میباشد.
۶۲	شکل (۴-۴): نمودار نانو ذرات ژلاتین که به وسیله DLS و دستگاه (Brookhaven) اندازه گیری شده است.
۶۲	شکل (۵-۴): نتایج DLS با Brookhaven (پراکنش ذرات با میزان آنها) میباشد.
۶۲	شکل (۶-۴): نتایج DLS در دستگاه (Brookhaven زتا پتانسیل) میباشد.
۶۳	شکل (۷-۴): میکروسکپ الکترونی (SEM) ذرات نانوژلاتین را به صورت کره های نرم نشان میدهد.
۶۶	شکل (۸-۴): ارتباط بین مقدار pH و اندازه نانو ذرات و شاخص پراکندگی ذرات
۶۶	شکل (۹-۴): ارتباط بین pH و میزان زتا پتانسیل
۶۷	شکل (۱۰-۴): ارتباط بین سرعت اضافه کردن استون در مرحله دوم و کیفیت اندازه نانو ذرات.
۶۸	شکل (۱۱-۴): ارتباط بین میزان درصد گلوترآلدهید و کیفیت اندازه نانو ذرات
۶۹	شکل ۱۲-۴: هاله ضد باکتری ماهی تون زردباله به قطر ۳ میلیمتر بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا

شکل ۴-۱۳: MBC, MIC ژلاتین بر روی باکتری سودوموناس به ترتیب در رقت های ۵ و ۴ و غلظت های ۶۲ و ۱۲۵ (ماکرولیتر بر میلی لیتر) و ایجاد هاله هایی به قطر ۱ و ۰/۵ میلی متر ۶۹

شکل ۴-۱۴: (الف) نشان دهنده عدم کدورت (عدم فعالیت ضد باکتری در نانو ذرات ژلاتین) و شکل (ب) نشان دهنده کدورت (فعالیت ضد باکتری در نانو ذرات ژلاتین) در استافیلوکوکوس آرنوس و سودوموناس آئروژینوزا ۷۰

شکل ۴-۱۵: ایجاد هاله هایی به قطر ۳۱،۳۵،۳۴ میلی متر در سیپروفلوکساسین (به عنوان شاهد منفی) به ترتیب بر روی باکتری های الف) سودوموناس آئروژینوزا، ب) استافیلوکوکوس آرنوس و ج) اشیشیاکلی ۷۰

چکیده

ژلاتین یکی از با ارزش ترین هیدروکلوئیدها بوده و پرکاربردترین ماده در زمینه داروسازی، پزشکی، غذایی و صنعت محسوب می شود. به خصوص ژلاتین ماهیان نزدیک آب گرم شبیه ژلاتین پستانداران می باشد. با توجه به صید بالای ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) و مصرف در کارخانه ها از استخراج ژلاتین از پوست این ماهی می توان بهره برد. آنالیز انجام شده بر روی ژلاتین به روش قلیایی استخراج شده از پوست ماهی تون زردباله استخراج شد. تست های فیزیکی و شیمیایی و رئولوژی که شامل آنالیز اسیدهای آمینه با روش HPLC، الکتروفورز و طیف سنجی با اشعه مادون قرمز، pH، تعیین رطوبت، دمای بستن و باز شدن ژل با روش های سنجش استاندارد ملی ایران انجام گرفت. نانوذرات ژلاتین به روش دی سالویشن تهیه شدند. سنجش اندازه نانوذرات، زتا پتانسیل، شاخص پراکندگی و بررسی شکل آنها بر روی نانوذرات بررسی شد. سپس سنجش اثرات آنتی باکتریال بر روی باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس آئروس و اشریشیاکلی انجام شد و این سنجش به روش Disc diffusion و تعیین کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی برای ژلاتین به روش Serial dilution و برای نانوذرات ژلاتین به روش توریدیمتری بود. آنالیز آماری آن رگرسیون خطی و مدل سازی مدل پیش بینی بودند. همچنین اثرات ضد باکتری ژلاتین و نانوذرات نیز باهم مقایسه گردند. از هر گرم پوست ماهی تون زرد باله ۰/۳۴ گرم ژلاتین استخراج شد. ژلاتین ماهی تون زردباله دارای پرولین و هیدروکسی پرولین بالاتر و باندهای موجود در الکتروفورز ژلاتین این ماهی دارای باندهای آلفا، بتا و گاما (مانند پستانداران) بودند. طیف مادون قرمز آن هم مانند ژلاتین پستانداران می باشد. فاکتورهای سنجیده شده آن pH (۶/۱)، رطوبت (۸/۵ درصد) دما و زمان بستن آن به ترتیب (۴ درجه سانتی گراد و ۶۰ ثانیه) و دما و زمان باز شدن آن (۴۵ درجه سانتی گراد و ۵۰ ثانیه) می باشد. رنگ ژلاتین شفاف و با توجه به داده ها می تواند جایگزین ژلاتین پستانداران شود. میانگین اندازه نانوذرات تهیه شده ۱۳۲ نانومتر، زتا پتانسیل ۳۱ میلی ولت، شاخص پراکندگی ۰/۲۴۸ و شکل آن کروی دید شد. بر اساس مدل رگرسیون خطی متغیر های مستقل (معرف دی سالوینگ، استفاده از فیلتر، pH، درصد گلوتر آلدئید) بر روی متغیر وابسته (اندازه ذره و زتا پتانسیل) اثر معنی داری میگذارد و $P < 0.05$ می باشد. نانو ذرات ژلاتین بر روی باکتری های سودوموناس و استافیلوکوکوس اثر ضدباکتری داشت. نانوذرات ژلاتین دارای خاصیت آنتی باکتریال علیه باکتری سودوموناس می باشد و زمانی که اندازه آن از ۶۵۹ نانومتر کمتر تا ۱۳۲ نانومتر باشد به باکتری استافیلوکوکوس هم خاصیت ضد باکتری نشان میدهد. با کاهش اندازه ذرات اثر ضد باکتری افزایش می یابد. در حالی که ژلاتین بر روی باکتری سودوموناس اثر ضد باکتری داشت. نانوذرات ژلاتین MIC, MBC (کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی) بالاتری نسبت ژلاتین را نشان داد. سنجش ضد باکتری جهت بالا بردن مزایای نانوذرات ژلاتین به عنوان کاربرد احتمالی

حامل دارو و ژلاتین برای بسته بندی مواد غذایی میباشد. از این ژلاتین به دلیل حلال بودن آن و با توجه شباهت آن به ژلاتین پستانداران به صورت تجاری میتوان از آن بهره برد. با خواص ضد باکتری بیشتر نانوذرات ژلاتین ریزتر از کارایی تجاری و دارویی (به طور احتمالی) بهره برد.

کلمات کلیدی:

Thunnus albacares - ماهی تون زردباله - ژلاتین - نانوذرات ژلاتین - MIC MBC, (کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی) - دی سالویشن

فصل اول

کلیات

مقدمه

ژلاتین، پروتئینی است که از هیدرولیز کلاژن موجود در پوست، استخوان و بافت پیوندی حیوانات از جمله دام، طیور و آبزیان به دست می‌آید. ژلاتین در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و عکاسی کاربرد دارد (Cho et al., 2005). ژلاتین در زمینه صنعت، شیرینی سازی و در غذاهای کم کالری رژیمی و محصولات گوشتی کاربرد دارد. ژلاتین می‌تواند در صنعت داروسازی جهت تولید محصولاتی مانند کپسول های نرم و سخت استفاده گردد. از آنجایی که دارای کالری کم می‌باشد به صورت غذای رژیمی استفاده می‌شود. همچنین به دلیل کم بودن سطوح کربوهیدرات در ساختار غذاهایی برای بیماران دیابتی استفاده می‌شود. دو نوع فرایند جهت تولید ژلاتین وجود دارد، ژلاتین A که به روش اسیدی است (pH آن ۵ می‌باشد) و ژلاتین B (pH آن ۶-۹ می‌باشد). ژلاتین آبزیان میتواند جایگزین مناسبی برای پستانداران خشکی (خوک و گاو) شود (Wasswa, et al., 2007); (Rustad, 2003); (Kim and Mendis, 2006). ژلاتین آبزیان، این منبع ارزشمند، از لحاظ اینکه خطر اسفنجی شدن نداشته و مانند پلاکت عمل نکرده و سبب انعقاد خون نمی‌شود، دارای اهمیت ویژه ای است. همچنین به دلیل وجود اسید آمینه گلیسین کمتر، خطر ابتلا به بیماریهای مشترک انسان و دام (جنون گاوی) را کاهش داده و به مغز و نخاع آسیبی نمی‌رساند که از مزیت های آن به حساب می‌آید. ژلاتین از هیدرولیز ساختمان پروتئینی کلاژن به دست می‌آید که در بافت استخوانی و پوست وجود دارد. همچنین ژلاتین آبزیان بر خلاف ژلاتین خوکی در دین اسلام و یهودیت منعی ندارد و می‌تواند جایگزین مناسب ژلاتین خوک باشد (Jamilah and Harvinder, 2002). بسیاری از ویژگی های فیزیکوشیمیایی و رئولوژی ژلاتین ماهیان تون شبیه به پستانداران خشکی می‌باشد. ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) که جز ماهیان گرم آبی می‌باشد، با توجه به صید بالای سالانه که در بین ماهیان و حتی در بین ماهیان تون می‌تواند جایگزین ژلاتین پستانداران خشکی شود. یکی از در فرایندهای پیشرفته در تهیه نانوذرات فرایند رهایش دارو (drug delivery) می‌باشد. در ۱۰ سال گذشته فرایند تولید ترکیبی و طبیعی برای نانوذرات انجام گرفته است. وجود نانوذرات بر پایه پلیمر (شیمیایی)، طبیعی (بیوپلیمر) ماکرومولکول هایی مانند سدیم آلژینات (Rajaonarivony et al., 1993) آلبومین (Kreuter, 1978) کلاژن (Lee et al., 2001) -ژلاتین که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید- نانوذرات را می‌توان از آنها تهیه کرد. به وسیله موادی ثابت کننده (مانند گلوترآلدهید) که دارای گروه های آمینی هستند باعث ثبات نانوذرات شوند و تغییر شکل ندهند، در این صورت از آن می‌توان بهره مند شد. همچنین می‌توانند به عنوان ابزار تست های تشخیصی و به طور احتمالی حامل دارو کار روند (Langer et al., 2003); (Hiedi and Villiers, 2009) در توزیع بدنی این ذرات دارای دو ویژگی فیزیکی و شیمیایی خاص هستند که شامل اندازه ذرات و ویژگی سطحی آنها می‌باشند. اندازه ذرات باید به اندازه کافی کوچک باشد

تا بعد از تزریق رگی در مکانیسم فیلتراسیون ساده، از بدنه مویرگی حذف نشوند. به همین دلیل، ذرات در محدوده بین ۱۴۸ تا ۲۵۰ نانومتر تهیه می‌شوند (Langer et al., 2003). مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌ها با پیشرفت تکنولوژی پزشکی و افزایش آنتی بیوتیک‌ها به طور چشمگیری بالا رفته است. با توجه به اینکه استفاده از نانوذرات ضد میکروبی احتیاج به شرایط خاص ندارد، بنابراین برای حل این مشکل نیاز به پیدا کردن نانوذره‌های ضد میکروبی احساس می‌شود که خاصیت منحصر به فردی را نشان دهند. فعالیت ضد باکتری نانوذرات ژلاتین در مقابل باکتری‌های پاتوژنی همچون اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس آئوس و سودوموناس، آئروژینورا به وسیله محاسبه حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) ارزیابی می‌شود.

در این تحقیق پس از استخراج ژلاتین از پوست ماهی تون زردباله، نانوذرات ژلاتین تهیه گردید و اثرات ضد باکتری آن بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس آئوس و سودوموناس آئروژینورا سنجیده شد و همچنین کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین غلظت کشندگی تعیین گردید. و همچنین تاثیر اندازه نانوذرات ژلاتین و اثرات ضد باکتری بررسی گردید.

فرضیه های تحقیق

نانوذرات ژلاتین تهیه شده از ژلاتین ماهی تون زرد باله خاصیت ضد باکتری است.

خاصیت ضد باکتری با تغییر اندازه ذرات نانوذرات ژلاتین تغییر میکند.

اهداف

هدف آرمانی

تعیین خاصیت ضد باکتری با توجه به تغییر اندازه ذرات نانو ژلاتین.

به دست آوردن سایز ۱۵۰ تا ۲۸۰ نانومتر در نانوذرات ژلاتین جهت استفاده احتمالی آن در حامل دارو.

هدف کاربردی

استخراج ژلاتین از پوست ماهی تون زردباله.

ساخت نانوذرات ژلاتین از ژلاتین ماهی تون زردباله.

اثبات خاصیت ضد باکتری نانو ژلاتین پوست ماهی تون زردباله.

اهمیت و ارزش تحقیق

به دلیل عدم حلیت ژلاتین تولید شده از خوک، بیماری جنون گاوی (که به دلیل اسیدآمین گلايسین بالا) حاصل از ژلاتین گاو همچنین بهره مندی از ضایعات کارخانه ماهی تون زرد باله، تهیه نانوذرات ژلاتین از ژلاتین جهت استفاده احتمالی به عنوان حامل دارو و بهره گیری از اثرات آنتی باکتریال نانوذرات ژلاتین و ژلاتین در بسته بندی های مواد غذایی میباشد.

۱-۱-ژلاتین

هیدروکلوئید ها به دسته ایی از پلی ساکاریدها و پروتین ها اطلاق میشود که به عنوان غلیظ کننده، عامل ایجاد ژل، پایدار کننده کف و امولسیون، عامل ممانعت کننده از رشد و گسترش یخ در مواد منجمد و عامل ممانعت کننده از رشد کریستال های قندی در صنایع مورد استفاده قرار میگیرد.

ژلاتین یکی از مهمترین هیدروکلوئیدهای غذایی می باشد که قابلیت های زیادی از جمله توانایی اتصال به آب، تشکیل ژل، افزایش گرانروی (ویسکوزیته)، تشکیل لفاف (فیلم) و نقش امولسیون کنندگی دارد. حالت دو خصلتی (آمفوتریک) ژلاتین و همچنین نواحی هیدروفوبیک آن در روی زنجیره پپتیدی آن را به صورت یک عامل امولسیون کننده و کف کننده قوی درآورده و همچنین ثابت شده است که ژلاتین توانایی تشکیل یک لایه جذب شده قوی، در سطح مشترک، برای ممانعت از فروریختن حبابهای هوا دارد (Cheng, 2008).

مصرف کامل ماهی بدون ضایعات و دورریز هدفی است که بسیاری از کشورهای پیشرفته صنعتی جهان در بخش صنایع شیلاتی خود دنبال میکنند و به طور معمول بیش از نیمی از وزن تولیدات آبزیان را زایدات و فراورده های جانبی آبزیان مانند پوست، مو، امعا و احشاء استخوان و باله ها تشکیل میدهد. این مقدار در کشور ما از لحاظ وزنی بالغ به ۲۸۰ هزار تن در سال بوده که حدود ۹۵۶۰۰ تن آن را پوست و استخوان تشکیل میدهد. یکی از راههای استفاده از این زائدات که عمدتاً از پروتئینهای بافت همبند تشکیل شده، تولید ژلاتین می باشد.

۱-۱-۱-کلاژن و ساختار آن

کلاژن نوعی پروتئین ساختاری خارج سلولی است که در موجود در استخوانها تاندون ها، پوست و بافتهای پیوندی موجود بوده و ژلاتین از آن تولید میشود. ساختار مولکولی کلاژن به صورت هلیکس سه تایی و دارای ویژگیهای منحصر به فردی میباشد. که عمده آنها عبارتند از:

میزان بالای اسید آمینه گلیسین ۳۳ درصد، میزان بالای اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین (حدود ۲۲ درصد)، اسیدهای آمینه قطبی و غیرقطبی در ساختار کلاژن در نواحی ویژه اتم در زنجیره قرار گرفته محل های هیدروفیل و هیدروفوب را ایجاد کرده و سبب خواص فعال سطحی منحصر به فرد کلاژن میشود (فرحناکی و همکاران، ۱۳۸۸). تا کنون ۲۷ نوع مختلف کلاژن شناسایی شده است میزان بالای اسید آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین اسیدهای آمینه های فعلی در ساختار کلاژن در نواحی ویژه به طوری قرار گرفته که خاصیت هیدروفیل و هیدروفوب را ایجاد کرده و سبب خواص فعال سطحی منحصر به فرد کلاژن میشود (فرحناکی و همکاران، ۱۳۸۸). حداقل ۱۰ نوع کلاژن در دهه ۹۰ میلادی شناسایی شده اند. کلاژن نوع یک، دو، سه و چهار به صورت زنجیره سه تایی پیوسته و ممتدیافت میشود، ولی زنجیره های سه تایی کلاژن های نوع چهار و انواع شش تا نه در بعضی قسمت ها شامل بخش های خطی میباشد که زنجیره های سه تایی را به هم متصل کرده اند. در صنعت تولید ژلاتین از منابعی استفاده میشود که دارای کلاژن نوع یک و سه هستند و اغلب ژلاتین های تجاری از این دو نوع تهیه میشوند.

شناسایی انواع کلاژن: کلاژن نوع ۱: در بسیاری موارد اصولاً در بافتهای رابط مانند پوست، استخوان و تاندونها وجود دارد. کلاژن نوع ۲: این نوع کلاژن منحصرأ در بافتهای غضروفی حضور دارد. کلاژن نوع ۳: این نوع شدیداً وابسته به کلاژن در پوستهای خیلی جوان بوده میتواند ۳۰۰ کیلو باشد اما در انواع بالاتر کاهش یافته بین ۸ تا ۱۰ کیلو دالتون است. انواع دیگر: دیگر انواع کلاژن تنها در مقادیر کم و در بافتهای خاصی یافت میشود. مولکولهای کلاژن متشکل از سه زنجیره B در هم آمیخته میباشد و اصطلاحاً به آن مارپیچ تشکیل شده است (Triple helix). تاکنون برخی از ۲۷ نوع مختلف کلاژن شناسایی شده است و بسته بندی ساده آن نشان داده شده است (آقا زاده و ایوبی، ۱۳۸۱). استواری ساختار مولکول توسط پیوندهای هیدروژنی تأمین می شود. هر زنجیره مارپیچ در خلاف عقربه های ساعت پیچ خورده است. مارپیچ سه گانه تقریباً ۳۰۰ نانومتر طول و وزن مولکولی تقریباً ۱۰۵ کیلو دالتون میباشد (Regenestein and Boren, 2000). شکسته شدن کلاژن به دلیل جدایی جزئی یا کلی زنجیرها به دلیل شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی است که شکل مارپیچ خود را از دست داده و پلیمر از حالت حلقوی به مارپیچی تغییر شکل میدهد. ژلاتین صنعتی مخلوطی از ترکیبات مختلف است، زنجیره α (یک زنجیره پلیمر)، زنجیره β (دو زنجیره α با پیوند کووالانسی) و زنجیره γ (سه زنجیره با پیوند کووالانسی) میباشد (payon et al., 2007). ترکیب آمینو اسیدها در تمام کلاژن های به دست آمده از منابع مختلف تفاوتی وجود است. اما اشکال مشخصی دارد که به طور واحد خصوصیت همه کلاژنها مشترک میباشد. فقط پروتئین پستانداران مقدار زیادی از هیدروکسی پرولین و را شامل میشود (آقازاده و ایوبی، ۱۳۸۹). الف) زنجیره ای با وزن مولکولی پایین (با وزن کوچکتر از ۵۰ کیلو دالتون) و زنجیرههایی که بین ۵۰ تا ۸۰ کیلو

دالتون وزن دارد که شامل هیدرولیز ژلاتین می باشد. ب) زنجیره α (وزن بین ۸۰ تا ۱۲۵ کیلو دالتون) برابر بازنجیره که از تروپوکلاژن مشتق شده اند. ج) زنجیره β (که بین ۱۲۵ تا ۲۳۰ کیلو دالتون وزن دارد. برابر با دو زنجیره α میباشد که به عنوان زنجیره β شناخته شده است. د) زنجیره γ (که بین ۲۳۰ تا ۳۴۰ کیلو دالتون وزن دارد) برابر با ۴ زنجیره α میباشد که به عنوان زنجیره γ میباشد. د) زنجیره ϵ (که بین ۳۴۰ تا ۷۰۰ کیلو دالتون وزن دارد) برابر با ۲ زنجیره γ میباشد. ذ) زنجیره ζ (که بین ۷۰۰ تا ۱۰۰۰ کیلو دالتون وزن دارد) برابر با ۳ زنجیره γ میباشد. ط) زنجیره δ (که بین ۱۰۰۰ تا ۱۸۰۰ کیلو دالتون وزن دارد) برابر با ۴ زنجیره γ با درجه بالایی از ثابت کننده ها میباشد. ظ) میکروژل (کوچکتر از ۱۸۰۰ کیلو دالتون وزن دارد) برابر با چندین زنجیره γ می باشد. ترکیب امینو اسید در ژلاتین خیلی نزدیک به کلاژن مادر (کلاژن منشأ) می باشد و توسط تکرار توالی سه تایی مشخص میشوند که در اینجا (x-y-Gly) اغلب پرولین (X) و عمدتاً Y هیدروکسی پرولین میباشد (Eatoe and Leach, 1977). ژلاتین های اوسئین از منابع استخوانی تولید می شوند که منحصراً از کلاژن نوع یک تشکیل شده اند. ژلاتین های تولید شده از بافت های سر گاو و پوست دامها از کلاژنهایی حاصل می شوند که دارای مقادیر کمی کلاژن نوع سه نیز می باشند در اغلب بافت های پوستی مقدار کلاژن نوع سه حدود ۲۰ - ۱۰ درصد میباشد و در بسیاری از مصارف اهمیت چندانی برای مصرف کننده ندارد. تحقیقات نشان داده است که رشته های کلاژن موجود در استخوان با اتصالات عرضی به هم متصل شده اند تا بتوانند یک شبکه سه بعدی را تشکیل دهند، در حالیکه کلاژن منابع پوستی تمایل به تشکیل ساختار دو بعدی دارند. این واقعیت میتواند روی انتخاب دمای پیش فرآیند، در استخراج ژلاتین و در نتیجه خصوصیات فیزیکی ژلاتین تولیدی تأثیر زیادی بگذارد. اگر چه زنجیره های آلفا در کلاژن خیلی مشابه هستند ولی تفاوت های کوچک اما مهمی در ترکیب شیمیایی آنها دیده می شود. در فرآیندهای استخراج اسیدی و قلیایی در تولید ژلاتین، شرایط دمایی، pH و زمان استخراج کلاژن، روی ساختار شیمیایی و ترکیب اسید آمینه ژلاتین تولیدی اثر میگذارد. به عنوان مثال پیش فرآیند طولانی، میتواند به حذف بعضی از اسیدهای آمینه مثل سیستئین منجر شود که این امر می تواند اهمیت زیادی در کیفیت ژلاتین تولیدی برای مصارف عکاسی داشته باشد.

تبدیل ماده کلاژن محتوی بافت پیوندی (پوست و استخوان) به یک ماده تشکیل دهنده ژل و محلول که به عنوان ماده غذایی یا چسب مصرف می گردد. ژلاتین یکی از پرمصرف ترین مواد پروتئینی کلوئیدی در صنایع غذایی، دارویی، صنعتی، پزشکی و نظامی است که به صورت چهار نوع متفاوت، خوراکی، دارویی، صنعتی و فتوگرافی تولید می شود (آبرومند، ۱۳۶۸). ژلاتین را می توان از منابع گوناگون کلاژن تولید کرد. استخوان گاو، پوست گاو و پوست خوک منابع اصلی تجاری هستند (Wasswa, 2007). ژلاتین از طریق هیدرولیز جزئی کلاژن تولید می شود. در طول تولید ژلاتین، ماده خام حیوان با رقیق کردن اسیدی و بازی

عمل آوری و در نتیجه بخشی از آن گسسته می شود کلاژن شکسته در آب گرم، قابل حل شده و ژلاتین تشکیل میشود (Arnesen and Gildberge, 2007). گزارشات حاکی از این است که مصرف سالانه ژلاتین در سال ۲۰۰۷ گزارشات حاکی از این است که مصرف سالانه ژلاتین در سال ۲۰۰۷ حدود ۳۲۶۰۰۰ تن بوده، که حدود ۴۶ درصد از پوست خوک، ۲۹/۴ درصد از پوست، ۲۳/۱ درصد از استخوان گاو و ۲/۵ درصد از منابع متفرقه تأمین شده است.

اما با وجود خواص بسیار مطلوب ژلاتین به دلیل محدودیتهای مذهبی (ژلاتین خوک در اسلام و یهود حرام است و گاو تنها در صورت ذبح شرعی قابل استفاده می باشد)، شیوههای خاص زندگی مانند گیاه خواری سبب شیوع بیماری CID و مرگ بسیاری از مبتلایان شد و محدودیت هایی برای مصرف هیدرئکلوئید در بین مصرف کنندگان وجود دارد و خطر آلودگی ژلاتین پستانداران (گاو و خوک) به ویروسها و پریونها در دهه ۱۹۸۰ سبب شیوع کنندگان وجود دارد. از این رو تلاش برای یافتن جایگزینهای مناسب ژلاتین برای محصولات غذایی رو به رشد است.

۱-۲- ژلاتین ماهی

ماهی صید شده به طور عمده برای مصرف بشر و دیگر استفاده های کم مانند تولید آرد و طعمه برای قلاب ماهیگیری بکار میرود. ماهی مصرفی یا عنوان غذای بشر حدود ۷۸ درصد از کل ماهی در کشورهای توسعه یافته در حال توسعه را شامل می شود و ۲۱ درصد برای استفادههای غیر غذایی بکار میرود روند عمل به سمت تولید مقدار زیادی از بیوماس ضایعات ماهی (مانند پوست، استخوان باله) پیش می رود که عموماً به دور انداخته میشوند (Cho et al., 2005). به تبع آن، تحقیق برای بررسی و کاربرد کلاژن ضایعات ماهی برای تولید ژلاتین آغاز شده است (Wasswa et al., 2007); (Nagai et al., 2000). هرچند ژلاتین ماهی از سال ۱۹۵۰ میلادی مورد مطالعه قرار گرفته است. اما بیشتر مطالعات به سمت ژلاتین پستانداران بود و فقط در سال های اخیر مطالعات در مورد ژلاتین استخراج شده از ماهی آغاز شد و در نشریات منتشر شد. بنابراین پوست ماهی یکی از محصولات فرعی و صنعت فرآوری ماهی به دلیل بی مصرف بودن و آلودگی آن میباشد که میتواند به منظور منبع با ارزش ژلاتین استفاده شود. پوست ماهی مقدار زیادی از کلاژن را شامل می شود. در سال ۱۹۶۰ ژلاتین ماهی به صورت تجاری در نوااسکاتیا استخراج شده ماده خام پوست ماهیان عمق زی مانند کاد و پولاک بود و از ضایعات ماهیان منجمد فرآوری شده و محور شده به دست آمده بود (ابدالی و معتمدزادگان ۱۳۹۰). تهیه ژلاتین از پوست ماهی در سطح جهانی در بندر سالسون اسکاتلند انجام می شود (مرتضوی وهمکاران، ۱۳۸۷).

ژلاتین ماهی به ویژه با خصوصیتی مانند دمای ذوب پایین تر، حل شدن سریع تر در دهان و عدم ایجاد حالت لاستیکی یکی از مناسب ترین جایگزین ژلاتین پستانداران محسوب شده و به عنوان غذایی حلال پذیرفته می باشد. اگرچه تولید ژلاتین ماهی هنوز در مراحل ابتدای توسعه خود قرار داشته و تنها حدود ۱ درصد تولید سالیانه را در بر می گیرد. اما میزان ضایعات سالیانه حاصل از فرآوری ماهی حدود ۷/۳ میلیون تن بوده که می تواند به عنوان منبع غنی و ارزشمندی برای تولید ژلاتین ماهی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از این ضایعات هم سبب کاهش هزینه های دفع و از بین بردن ضایعات کارخانجات فرآوری ماهی و هم ایجاد ارزش اقتصادی برای آنها می شود. تاکنون ژلاتین در شرایط مختلف از پوست سوف نیل (Muyonga et al., 2004)، پوست پولاک آلاسکا (Zhang et al., 2007)، غضروف کوسه

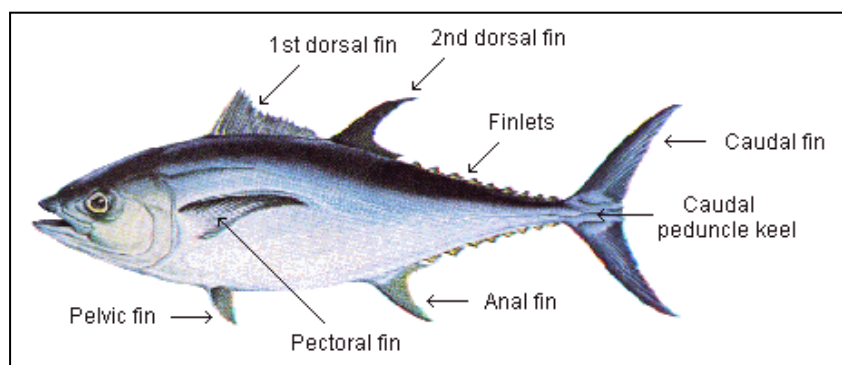
(Cho et al., 2005)، پوست تون زرد باله (Cho et al., 2005)، پوست سالمون آتلانتیک (Arnsen and Gldberg, 2006)، پوست کپور نقره ای (Regenstoein, 2007) و پوست قزل آلی رنگین کمان استخراج شده است.

مدت ها شناخته شده بود که ژلاتین حاصل از پوست و استخوان ماهی که در آزمایشگاه ساخته شده بود. قدرت ژله ای شدن مانند ژلاتین های حاصل از پوست و استخوان پستانداران را ندارد. در مقابل، کلاژن ماهیان غضروفی، ژلاتین با قدرت ژله ای شدن بهتری دارد (Janus et al., 1989)، (Piez, 1997). استفاده از ژلاتین ماهی به دلیل خواص رئولوژیکی ضعیف و پایداری کمتر آن در مقایسه با ژلاتین پستانداران با محدودیت هایی همراه است. که این محدودیت ها عمدتاً به دلیل میزان کمتر آمینواسیدها (پرولین و هیدروکسی پرولین). شرایط محیطی و نژاد ماهی عوامل تعیین کننده ای در کیفیت ژلاتین تولید شده، میباشد. به طوری که ژلاتین ماهیهای ساکن آبهای گرم دارای نقطه ذوب بالاتر، پیوندهای هیدروژنی و میزان پرولین و هیدروکسی پرولین بیشتری نسبت به ژلاتین ماهیهای ساکن آب سرد میباشد.

۳-۱- زیست شناسی ماهیان تون

ماهیان تون گروهی از ماهیان با ارزش اقتصادی هستند که با توجه به اهمیت آنها از دیر باز مورد توجه انسان بوده است. این ماهیان دارای بدنی کشیده و دوکی شکل و تا حدی فشرده بوده و شاخص آبهای مناطق حاره و نیمه حاره می باشند. ماهیان تون و شبه ماهیان تون از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت بوده و یک منبع غذایی قابل توجه در دنیا محسوب می شوند. مطابق شکل (۱-۱) پوزه نوک تیز و دهان در آنها بزرگ، آرواره ها قوی و بر حسب نوع غذای مصرفی شکل آن متفاوت است. دهان دارای دندانهای تیز می باشد و ممکن است در سطح زبان نیز دندان دیده شود. دوباله پستی مجزا دارند، تعداد ۱۲-۵ عدد finlet بعد از باله پستی دوم و باله مخرجی تا دم قرار گرفته است (Nelson, 1994). اولین باله پستی دارای ۲۷-۹

شعاع می باشد. باله سینه ای در بخش بالای بدن قرار گرفته، باله های شکمی متوسط یا کوچک اند و دارای ۶ شعاع می باشد. باله دمی کاملاً دوشاخه بوده و دارای شعاعهای دمی است که کاملاً به صفحه انتهایی ستون مهره ها متصل است. حداقل دو تیغه دمی کوچک (Keel) در هر طرف ساقه دمی قرار گرفته است، در بیشتر گونه ها یک تیغه بزرگتر در وسط ساقه دمی نیز قرار دارد. خط جانبی ساده و منفرد و گاه شاخه دار است (Nelson, 1994).



شکل ۱-۱ نمای ظاهری و وضعیت باله ها در ماهیان تون (Nelson, 1994).

تعداد مهره ها در آنها ۳۱-۶۶ عدد می باشد. برخی از گونه ها فاقد کیسه شنا هستند. بخشهایی از پشت سر و اطراف باله سینه ای با فلسهای نازک و بزرگتر پوشیده شده است بقیه قسمت های بدن فلسها کوچک و یا متوسط هستند و ممکن کروی یا شانه ای باشند (Nelson, 1994). گروهی از ماهیان تون دارای شبکه رگی خاصی در بدن خود می باشند که باعث می شود بدن آنها گرمتر از محیط باشد. برخی از آنها مانند ماکرلها پلانکتون خوار بوده و دارای خارهای آبششی بزرگتری می باشند. ماکرل اسپانیایی، تون و bonitos طعمه های بزرگتری مانند ماهیان کوچک، سخت پوستان و اسکوئیدها را می خورند. جنس ها مجزا بوده و معمولاً جنسهای نر و ماده تفاوت ظاهری مشخصی ندارند. در بسیاری از گونه ها ماده ها از نرها بزرگترند (Nelson, 1994).

تخم ریزی اغلب در آبهای نزدیک ساحل مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری انجام می شود. تخمها پلاژیک بوده و لاروهای جوان شناور (plankton) می باشند. دو زیر خانواده Scombrinae و Gasterochismatinae تقسیم می شوند (Collette., 2006). اندازه آنها از کمتر از ۵۰ سانتیمتر در جنس *Auxis* تا تون باله آبی بزرگ *Thunnus thynnus* که بیش از ۳ متر دراز دارد متغیر است. صید ماهیان تون توسط تورهای گوشگیر، رشته قلابهای طویل، قلاب خزننده و تورهای گردان پیاله ای انجام می گیرد (Collette, 2006).

ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) یکی از گونه های خانواده تون است که پراکنش آن در مناطق نزدیک گرما بوده و دارای بدن کشیده و دوکی شکل و تا حدی فشرده و در بعضی از جنس ها می باشد و در آب های جنوب ایران حضور دارد. ژلاتین به واسطه حضور اسید آمینه هیدروکسی پرولین دارای خاصیت آنتی باکتریال می باشد. در این تحقیق از پوست این ماهی جهت استخراج ژلاتین استفاده خواهد شد. ژلاتین تون ماهیان دارای سه اسید آمینه اصلی شامل گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین می باشد. گلیسین جهت استحکام ژل و دارای نقطه ذوب پایینی است که این خصوصیت جهت کاربرد ژل در صنعت غذا و دارو حائز اهمیت است. ویسکوزیته ژلاتین ماهی بیشتر از ویسکوزیته ژلاتین پستانداران می باشد. استحکام ژلاتین به ترکیبات اسیدهای آمینه بستگی دارد. هر چه اسیدهای آمینه بیشتر باشند، ساختمان ژلاتین پایدارتر و وزن مولکولی آن بالاتر می رود. ویژگی رئولوژی (نقطه ذوب و ژلی شدن) ژلاتین تون ماهیان شبیه به پستانداران می باشد. ژلاتین تون ماهیان از نظر ظاهر، رنگ، شفافیت و شکل تفاوتی با پستانداران ندارد (Cho et al., 2005).

این منبع ارزشمند به دلیل اینکه خطر اسفنجی شدن ندارد و در نتیجه مانند پلاکت عمل نمی کند و سبب انعقاد خون نمی شود، دارای اهمیت ویژه ای است. همچنین به دلیل وجود گلیسین کمتر، خطر ابتلا به بیماری های مشترک انسان و دام (جنون گاوی) را کاهش داده و این منبع ارزان تر بوده و از تمام ضایعات آن نیز می توان بهره برداری کرد (Cho et al., 2005).

با توجه به اینکه ماهیان تون دماهای مختلفی را تحمل می کنند در آب های مختلف دنیا پراکنش یافته اند و بدلیل بهره برداری با روش های صید متفاوت، تمایزی بین تون های معتدله و گرمسیری ایجاد شده است. تون های نزدیک گرمسیری در آب های با دمای بالاتر از ۱۸ درجه سانتی گراد یافت می شوند (اگرچه در آب های سردتر نیز مشاهده می شوند) درحالی که تون های معتدله بیشتر در آب های با درجه حرارت ۱۰ درجه سانتی گراد دیده می شوند، دلیل انتخاب این ماهی در این تحقیق می باشد. صید بالای سالانه سطح زیان درشت ۲۷۰۰۰۰ تن است که ۴۲۰۰۰ تن متعلق به ماهی تون زردباله می باشد (دفتر آمار و بودجه سازمان شیلات، ۱۳۹۵).

۴-۱- مصرف و تولید آبزیان در ایران و جهان

۴-۱-۱- افزایش مصرف آبزیان

بر اساس آماری که از سوی سازمان خواربار جهانی (FAO) در سال ۱۳۹۱ منتشر شده سالانه ۱۴۵ میلیون تن ماهی در جهان تولید می شود که سهم ایران از این تولید در سال ۱۳۹۱، ۸۰۰ هزار تن بوده است، هرچند که انسان ما از گذشته های دور نیز به پرورش ماهی اقدام می کردند، ولی چینی ها به عنوان نخستین پرورش -

دهندگان ماهی از ۲ هزار سال قبل از میلاد بچه ماهی را از رودخانه صید کرده و پرورش می‌دادند این فعالیت در ایران نیز از سال ۱۳۵۰ شروع شده است که استان گیلان اولین مرکز پرورش ماهی در آن زمان را راه‌انداز کرده بود.



شکل (۱-۲): نمایی از ماهی تون زردباله

جدول (۱-۱) آماری از صید ماهی تون زرد باله از سال ۱۳۸۱ تا ۱۳۹۴ از شیلات ایران نشان می‌دهد که ماهی تون زرد باله یکی از بیشترین صید ها را در بین گونه های ماهیان تون شامل میشود (دفتر آمار وبودجه سازمان شیلات، ۱۳۹۵).

انواع گونه های ماهیان تون	۱۳۸۱	۱۳۸۲	۱۳۸۳	۱۳۸۴	۱۳۸۵	۱۳۸۶	۱۳۸۷
هوور مسقطی	۲۹۸۵۰	۳۶۰۳۲	۵۳۶۴۶	۸۰۶۵۱	۱۰۲۶۹	۵۳۶۴۶	۴۲۴۱۱
هوور	۲۹۸۵۳	۳۰۲۸۴	۱۹۵۲۸	۱۸۵۲۸	۲۵۱۴۲	۱۹۵۲۸	۳۴۱۰۹
گیدر	۲۴۰۷۰	۳۷۷۲۲	۵۱۶۰۱	۴۳۵۷۲	۴۰۵۰	۵۱۶۰۱	۱۹۴۸۲
شیر	۸۵۵۷	۸۱۴۵	۷۰۷۹	۶۱۶۴	۸۷۷۸	۷۰۷۹	۱۰۲۹۲
زرده	۱۶۳۶۱	۱۴۰۶۶	۱۱۶۴۵	۱۱۸۰۳	۱۲۵۹۵	۱۱۶۴۵	۲۰۴۳۰
طلال	۱۴۸۴	۲۳۱۷	۲۹۳۰	۲۲۴۰	۲۰۷۷	۲۹۳۰	۱۰۰۷
قباد	۴۰۳۱	۳۶۹۵	۴۲۷۹	۳۰۸۷	۴۰۵۰	۳۷۹۷	۴۰۷۸
تون منقوش	۶۱۱	۱۱۴۴	۱۴۶۰	۱۶۱۶	۲۴۴۴	۵۳۰۸	۷۱۶۴

انواع گونه های ماهیان تون	۱۳۸۸	۱۳۸۹	۱۳۹۰	۱۳۹۱	۱۳۹۲	۱۳۹۳	۱۳۹۴
هوور مسقطی	۴۴۸۱۹	۲۲۲۸۵	۲۲۲۸۵	۲۷۰۵۱	۳۳۵۹۶	۳۹۶۹۹	۳۸۷۲۱
هوور	۵۹۴۶۳	۶۴۴۵۰	۶۴۴۵۰	۷۶۲۹۷	۶۶۶۰۴	۶۵۶۱۱	۵۹۶۶۶
گیدر	۲۲۵۹۶	۳۱۴۸۵	۳۱۴۸۵	۳۵۱۱۰	۳۲۵۷۱	۴۶۲۱۴	۴۲۵۹۸
شیر	۷۶۹۱	۱۰۸۸۴	۱۰۸۸۴	۱۶۵۱۰	۲۰۱۳۷	۲۳۸۶۴	۲۲۹۶۹
زرده	۱۷۸۲۷	۱۶۳۳۶	۱۶۳۳۶	۲۶۲۴۹	۲۸۸۳۴	۲۹۴۲۷	۲۸۴۲۹
طلال	۱۵۳۹	۱۱۱۶	۱۱۱۶	۲۲۷۲	۱۹۱۲	۲۲۷۴	۲۰۴۴
قباد	۲۶۶۹	۳۱۷۰	۳۱۷۰	۵۵۳۷	۵۸۶۳	۷۰۳۸	۷۴۴۷
تون منقوش	۵۱۷۸	۶۱۷۲	۶۱۷۲	۸۲۱۸	۶۸۸۰	۱۳۵۰۸	۱۰۸۱۸

با توجه به صید بالای ماهی تون زردباله میتوان از پوست آن که به عنوان ضایعات محسوب میشود، با استفاده از ژلاتین استخراج شده بهره کافی را برد. به همین دلیل در این تحقیق این گونه از ماهیان تون را انتخاب شده است.

۱-۵- خواص شیمیایی و ساختاری ژلاتین ماهی

عموما کلاژن ماهی دارای میزان بالای آمینو اسید (پرولین و هیدروکسی پرولین که سبب پایداری شبکه ژل می شوند) و میزان کمتری از کلاژن پستانداران است. به این دلیل دمای دناتوره شدن، دمای تشکیل و ذوب ژل کمتری از کلاژن پستانداران دارا میباشند. ژلاتین ماهی های آب سرد مانند salmon (ماهی آزاد) دارای دمای تشکیل ژل (عموما کمتر از ۸ درجه) و دمای ذوب شدن ژل بسیار پایین تری در مقایسه با ماهی های آب گرم و پستانداران هستند. آلاسکاپولاک *Gadus chalcogrammus*، متعلق به خانواده Gadidae، از ماهیان آب سرد هستند. در حالی که تیلاپیا نمونه ایی از ماهی های آب گرم می باشند. همان طور که مشاهده می شود میزان کمتر هیدروکسی پرولین و پرولین در کلاژن پوست ماهی با سرین و تریونین جبران می شود. به طور متوسط پستانداران دارای ۳۰ درصد پرولین و هیدروکسی پرولین هستند، در حالی که این میزان در ماهیان گرم آبی ۲۲ - ۲۵ درصد و در ماهیان سرد آبی ۱۷ درصد می باشد. علاوه بر میزان امینواسیدها عامل مهم دیگر در تعیین خواص ساختاری ژلاتین به پراکندگی وزن مولکولی، ساختار و ترکیب واحدهای تشکیل دهنده آن است. در طی تولید ژلاتین، تبدیل کلاژن به ژلاتین جرم مولکول های تولیدی متنوع می باشد که به دلیل گسسته شدن پیوندهای کووالانسی عرضی و شکسته شدن نامطلوب اتصالات بین پپتیدها است. در نتیجه ژلاتین تولیدی دارای وزن مولکولی کمتری از کلاژن بوده شامل مخلوطی از قطعات با وزن مولکولی متفاوت در محدوده ۸۰ تا ۲۵۰ کیلو دالتون می باشد.

ژلاتین ماهی قابلیت نفوذ بخار آب (WVP) کمتری نسبت به ژلاتین کاوی دارد بطور مثال، فیلم های ژلاتین تهیه شده از پوست ماهی که با گلیسرول نرم شده بود، WVP کمتری نسبت به ژلاتین خوک از خود نشان داد گروه هیدروکسیل در اسید آمینه هیدروکسی پرولین، توسط پیوندهای هیدروژنی با آب پیوند برقرار می کنند و به همین علت ژلاتین ماهی، به خاطر مقادیر پرولین و هیدروکسی پرولین کمتر، آبگریزی بیشتری دارد. با توجه به WVP پایین در فیلم های ژلاتین ماهی، پیشنهاد شده است که آن ها می توانند مخصوصا برای کاربردهای مرتبط با کاهش هدر روی آب از داروهای کپسوله شده و سیستم های غذایی منجمد یا سرد شده به عنوان پوشش مورد استفاده قرار گیرد (آقازاده و ایوبی، ۱۳۸۹).

۱-۶- خواص رئولوژیکی

ژلاتین ماهی یک ژل فیزیکی است، به این معنی که پیوندها با باندهای بین زنجیره‌ای مرتب کننده مواد تولید ژل‌های برگشت پذیر تحت تأثیر دما ایجاد کند. قدرت و نقطه ذوب ژل از مهم‌ترین خصوصیات فیزیکی ژل‌های ژلاتینی بوده و توسط اندازه مولکولی و واکنش‌های چند قسمتی که توسط ترکیب آمینواسیدی و نسبت زنجیره‌های α و β موجود در ژلاتین تعیین می‌شود کنترل می‌گردد. وجود میزان پپنیدها با وزن مولکولی بالاتر یا پایین‌تر از زنجیره‌های α ممکن است سبب کاهش قدرت ژل شود. ژلاتین ماهی دارای درجه بلوم بین ۰ تا ۲۷۰ است، که در مقایسه با درجه بلوم ژلاتین خوک یا گاو (۲۰۰ تا ۲۴۰) می‌باشد، هرچند درجه بلوم ۴۲۶ برای ماهی تون باله زرد گزارش شده است. برخی از گونه‌های گروه درجه بلوم بالایی نزدیک به بلوم ژلاتین خوک هستند ژلاتین تون یا تیلایا نقطه ذوب بین ۲۷ درجه سانتیگراد دارد و بنابراین این ژلاتین‌ها برای محصولاتی که در دماهای پایین اتاق نگهداری می‌شود مناسب هستند. این ژلاتین‌ها شباهت نزدیکی با ژلاتین خوک یا گاوی دارند (ذوب ژلاتین خوک یا گاو ۳۲ درجه سانتیگراد است). بنابراین ژلاتین ماهیان گرمایی می‌تواند به راحتی در بازارهای تجاری ژلاتین رقابت بیشتری داشته باشد (آقازاده و ایوبی ۱۳۸۹).

۱-۷- خواص حسی

گزارش شده که دسرهای طعم‌دار ژلاتین ماهی میزان طعم و بوی بد کمتر از انواع محصولات دارای ژلاتین خوک با قدرت ژل مشابه دارد، همچنین میزان طعم و بوی مطلوب این فرآورده‌های بیشتر است. به نظر می‌رسد دمای ذوب کمتر ژلاتین ماهی به آزاد شدن آرومای میوه، طعم میوه و شیرینی کمک می‌کند. به دلیل اینکه ژلاتین خوک در دهان آهسته‌تر از ژلاتین ماهی ذوب می‌شود. انتظار می‌رود ویسکوزیته قابل درک ژلاتین خوک در شرایط یکسان بیشتر از ژلاتین ماهی باشد.

۱-۸- کاربردهای ژلاتین ماهی

خواص کاربردی ژلاتین به دو بخش تقسیم می‌شود، گروه وابسته به تشکیل ژل می‌باشد، مانند: قدرت ژل، مدت زمان تشکیل ژل، دمای بستن و ذوب شدن ژل، ویسکوزیته، قوام دهندگی، بهبود بافت و میزان نگهداری آب، خواص ثانویه مربوط به خواص سطحی ژلاتین می‌باشند مانند تشکیل امولسیون، پایدارکنندگی، پایدار کردن کلوئیدها، تشکیل و پایداری کف مانند مارشمالو نوعی پاستیل خوراکی) و تشکیل فیلم. ژلاتین تولید شده از ماهی‌های آب سرد دمای تشکیل ژلی کمتر از ۸-۱۰ درجه سانتیگراد دارند. در نتیجه این نوع ژلاتین عموماً در محصولاتی که نیاز چندانی به قدرت ژل بالا نداشته و بیشتر بر

سایل خواص ژلاتین مانند جلوگیری از سینرژیس و ایجاد بافت مناسب تأکید دارد استفاده می‌شود. می‌توان ژلاتین ماهی‌های سردآبی را در محصولات یخچالی یا منجمد بلافاصله پس از خروج از یخچال مصرف می‌شوند استفاده کرد. همچنین ژلاتین‌های با نقطه ذوب پایین می‌توانند در محصولات خشک استفاده نمود. میکرواینکپسوله کردن در صنایع غذایی برای حفظ طعم مواد غذایی به وسیله ژلاتین ماهی‌های گرم آبی انجام می‌شود مانند انکپسوله کردن روغن‌های حیوانی، روغن لیمو، طعم سیر، طعم سیب و یا طعم فلفل سیاه. ژلاتین یک پروتئین کم کالری بوده و به دلیل ذوب شدن سریع، حالتی شبیه چربی در دهان ایجاد می‌کند و برای تولید غذاهای کم کالری بسیار مناسب می‌باشد. بررسی‌های حسی به عمل آمده از دسرهای حاوی پلاتین ماهی نشان داده که به دلیل نقطه ذوب کمتر ژلاتین با منشأ دریایی در دهان، آزاد شدن آروما بهتر صورت گرفته و طعم قوی‌تری احساس می‌شود. با افزایش غلظت ژلاتین با استفاده از مخلوط چند نوع ژلاتین بافت دسرهای تولید شده با ژلاتین ماهی می‌تواند شبیه به دسرهای تولید شده از ژلاتین خوک با درجه بلوم بالا گردد. مشاهدات نشان داده است که اتصالات عرضی ژل‌های ماهی در طی حرارت‌دهی در حمام آب گرم از بین نمی‌روند، در نتیجه در صورت عدم تخریب ساختار ژلاتین ماهی در اثر حرارت‌های بالا، از ژلاتین ماهی می‌توان در محصولات استریل نیز استفاده کرد (کریم، ۱۳۸۸). همچنین ژلاتین می‌تواند در مواد غذایی به عنوان شفاف‌کننده نوشیدنی‌ها، تصفیه شراب سفید، شفاف‌سازی آب جو، شفاف‌سازی میوه‌ها و سبزیجات (مخصوصاً در آب سیب و هلو)، پوشش گوشت، در تولید کپسول‌ها (ویتامین‌های مکمل)، شیرینی‌ها، سوپ‌های آماده، تولید فیلم‌های خوراکی و به عنوان پایدار کننده در بستنی مورد استفاده قرار گیرد. بازده استخراج ژلاتین از پوست‌ها تقریباً از ۵٫۵ درصد تا ۲۱ درصد از وزن اولیه مواد خام رتبه‌بندی شده است. این اختلاف بستگی به تفاوت ترکیب تقریبی پوست‌ها و مقداری از اجزای قابل حل پوست‌ها می‌باشد، به طوریکه این خصوصیات با گونه و سن ماهی‌ها تفاوت دارد. به علاوه، تنوع در روش‌های استخراج می‌تواند به تفاوت‌های موجود در محتوای کلاژن ماده خام نسبت داده شود، هرچند این اطلاعات اغلب در نشریات در دسترس نیست. در ایران تحقیقاتی پیرامون کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی منابعی مانند دام، طیور و برخی از گونه‌های ماهی صورت گرفته است که نتایج این پژوهش‌ها در جدول (۲-۱) آورده شده است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵).

جدول (۱-۲) - میانگین کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی پستانداران (گاو) (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵).

ویژگی ها/ژلاتین	ژلاتین اسیدی پستانداران	ژلاتین قلیایی پستانداران
قدرت ژلی (گرم)	۷۵-۳۰۰	۲۷۵-۷۵
ویسکوزیته cp	۲-۷/۵	۵/۷-۲
درصد خاکستر	۰/۳-۲	۰/۰۵-۲
دمای بستن	۱۵-۲۹	۲۹-۱۵
دمای باز شدن	۲۷-۳۲	۳۲-۲۷
pH	۳/۸-۶	۴/۷-۵

کاربردهای متعدد ژلاتین مدیون خواص منحصر به فرد آن می باشد که عبارتند از: ۱. محلولهای ژلاتین ژلهای منحصر به فردی را تشکیل میدهند که در دمای محیط به صورت ژل بوده و در دهان ذوب شده که خواص حسی مناسبی دارد. ۲. در حضور ژلاتین و غلظت های بالای شکر ژله های الاستیکی می توان تهیه نمود که طرفداران فراوانی دارد. ۳. قدرت امولسیفایری و پایدارکنندگی در محیطهای غیر قابل امتزاج مایع - مایع، مایع - گاز، مایع - جامد ژلاتین بالا است. ۴. ژلاتین قادر است فعالیت پلی الکترولیتی در محلول های رقیق داشته باشد. ۵. قدرت ژلاتین به عنوان عامل اتصال دهنده و نگهدارنده بافت در مخلوط های پودری (مثلا در ساختار قرصها در داروسازی)

مشتقات ژلاتین

در چند دهه اخیر پیشرفت های قابل توجهی در تولید مشتقات ژلاتین با کاربردهای غذایی صورت گرفته است. مهم ترین مشتقات ژلاتین عبارتند از:

۱) **ژلاتین محلول در آب سرد یا ژلاتین فوری:** علی رغم تعداد قابل توجه اختراعات ثبت شده در مورد تولید ژلاتین های محلول در آب سرد تنها سه نوع آن در بازار یافت می شود. دلیل آن این است که مشکلات عملی متعددی در تولید اقتصادی ژلاتین های محلول در آب سرد وجود دارد که تولید آنها را تحت تاثیر قرار می دهد. اساس همه روش های تولید ژلاتین های محلول در آب سرد بر این اصل استوار است که اگر ژلاتین حل شده در آب گرم را به گونه ای خشک نمود که از مرحله ژل شدن عبور نکند (ژل نبندد) آنگاه مولکول های ژلاتین خشک شده در حالت بی شکل و غیر کریستاله خواهند بود.

۲) **در صنایع تولید الکل و آب میوه:** از ژلاتین های هیدرولیز شده به عنوان عامل شفاف کننده و عامل بهم چسباننده مواد معلق استفاده می شود. ژلاتین هیدرولیز شده غیر از خاصیت تشکیل ژل و تا حدی قوام

دهندگی بقیه خواص یک ژلاتین معمولی مثل پایدار کننده امولسیون‌ها، حفظ و نگهداری کلوئیدها و کف کنندگی را دارا است. به علت حلالیت بالای ژلاتین هیدرولیز شده می‌توان آن را در محصولاتی که نیاز به ایجاد یک محصول کنسانتره پروتئینی کاملاً شفاف باشد به کار گرفت. از استفاده‌های دیگر آن می‌توان به صنعت گوشت اشاره نمود که تا غلظت‌های ۳ درصد آن به عنوان نگهدارنده آب و امولسیفایر چربی استفاده می‌شود. از کاربردهای دیگر ژلاتین هیدرولیز شده می‌توان به کاربرد آن در مواد آرایشی و بهداشتی مثل شامپوها و لوسیون‌ها اشاره نمود که از خاصیت جذب آن از طریق پوست و مو استفاده می‌شود.

۳) استفاده‌های پزشکی و دارویی ژلاتین: در داروسازی از ژلاتین هیدرولیز شده می‌توان به عنوان اتصال دهنده سایر اجزاء در قرص‌ها استفاده نمود. در مقایسه با ژلاتین معمولی استفاده از این ژلاتین باعث افزایش سرعت حل شدن قرص و از هم پاشیدن آنها در داخل بدن انسان می‌شود.

کپسول‌های سخت و نرم^۱: صنعت داروسازی مصرف حدود ۶/۵ درصد کل تولید ژلاتین دنیا را به خود اختصاص داده است که در این میان بیشترین مصرف آن در تولید پوشش‌های کپسول می‌باشد و از زمان اختراع کپسول‌ها توسط داروساز معروف فرانسوی، موتز^۲ در حدود یکصد و پنجاه سال پیش این صنعت همواره در حال پیشرفت بوده است.

الف) در تهیه قرص‌ها: ژلاتین به عنوان یک عامل اتصال دهنده اجزاء مختلف در تولید قرص‌ها به کار می‌رود. معمولاً اجزاء فعال قرص‌ها در یک محلول ژلاتین مخلوط شده و مخلوط حاصل خشک و سپس آسیاب می‌شود که پس از آن تحت فشار به قرص تبدیل می‌شود. در بعضی حالات یک لایه نازک ژلاتین بر روی قرص‌ها کشیده می‌شود تا به صورت یک ماده حافظ مواد فعال قرص و پوشاننده مزه نامطلوب مواد محتوی آن در هنگام مصرف عمل کند.

ب) چسب‌های پزشکی: در بسیاری از حالات در صورت وجود حساسیت بیمار به چسب‌ها و باندازه‌های معمولی، چسب‌ها و باندازه‌هایی که در ساختار آنها از ژلاتین به عنوان ماده چسباننده استفاده می‌شود به کار گرفته می‌شود.

ج) اسفنج‌های ژلاتین: اسفنج‌های ژلاتین از زدن یک محلول ژلاتین و ایجاد کف و نامحلول کردن آن توسط فرمالدئید و خشک کردن آن حاصل می‌شود. اسفنج‌های تولید شده به اندازه‌ها و ابعاد مختلف بریده شده و پس از استریل شدن در جراحی‌های مختلف به عنوان عامل جذب کننده ترشحات بافتی و خون عمل می‌کند. برای بند آمدن خونریزی گاهی اسفنج‌های ژلاتین بر روی بافت‌های در حال خونریزی باقی گذاشته می‌شود که به دلیل ساختار آن، آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌توانند به تدریج به صورت کامل اسفنج ژلاتین را

1. Soft and hard capsule

2. Mothe

هضم نمایند. بنابراین به دلیل ساختار خاص خود این اسفنج‌ها می‌توانند در محل زخم باقی بمانند تا به تدریج با بهبود زخم هضم شوند. از اسفنج‌های ژلاتین می‌توان برای کمک به جاگذاری مواد دارویی و آنتی-بیوتیک‌ها در محل‌های خاص استفاده نمود. از این طریق همچنین می‌توان آزاد شدن کنترل شده و تدریجی دارو را ایجاد نمود.

(د) **پودر جراحی:** بعد از فرآیند ژلاتین در 124°C (به مدت یک روز) ژلاتین tockiness خود را از دست می‌دهد و در این صورت می‌تواند به صورت یک پودر استریل در دستکش‌های جراحی به کار گرفته شود که در صورت تماس با زخم‌های باز با افزایش سرعت بهبود بافت باعث تسریع بهبود زخم می‌شود.

(۴) **استفاده از ژلاتین به عنوان امولسیون کننده:** بسیاری از محصولات آرایشی و بهداشتی به صورت امولسیون‌های نسبتاً پایدار تهیه می‌شوند که در این میان ژلاتین از پتانسیل قابل توجهی برای استفاده به عنوان امولسیون کننده برخوردار است و در بسیاری از محصولات از آن استفاده می‌شود. در هنگام استفاده از ژلاتین در امولسیون‌ها توجه به pH و بار الکتریکی سایر هیدروکلوئیدها و سایر مواد موجود در مخلوط الزامی و قابل اهمیت است. لازم به ذکر است که ژلاتین دارای انواعی است (A و B) که هر یک دارای خواص متفاوت و به تبع آن کاربردهای مختلفی هستند. این دو ژلاتین دارای نقطه ایزوالکتریک مختلف هستند و به همین دلیل در pH های اسیدی و بازی دارای بارهای متفاوت خواهند بود که این امر اهمیت انتخاب مناسب ژلاتین را نشان می‌دهد. خاصیت امولسیون کنندگی ژلاتین همچنین تحت تاثیر وجود سایر ناخالصی‌ها در ژلاتین و یا در فاز روغن قرار می‌گیرد.

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که پس از ۱۵۰ سال تولید و استفاده، ژلاتین هنوز مهمترین هیدروکلوئید مورد استفاده در صنایع غذایی، دارویی و عکاسی می‌باشد. در مواد غذایی از ژلاتین کمتر برای ایجاد قوام استفاده می‌شود. مهمترین خواص کاربردی آن در مواد غذایی و دارویی عبارت از عامل امولسیفایر، ایجاد ژل تشکیل کف، اتصال دهنده و تولید فیلم می‌باشند و ژلاتین را می‌بایست یک هیدروکلوئید چند منظوره^۱ محسوب کرد. در صنایع داروسازی و پزشکی به عنوان ماتریس القاء کننده‌ها، در داروهای قابل تزریق برای تحویل میکروکپسول‌ها و نیز در تزریق‌های وریدی بکار می‌رود (Block et al., 1992). گزارشاتی وجود دارد مبنی بر ضعیف کردن واکسن‌های ویروسی برای ایمن‌سازی در برابر سرخک، گوشک، سرخجه، ورم مغز ژاپنی، هاری، دیفتری و سم کزاز که ژلاتین به عنوان پایدار کننده عمل می‌کند (Burke et al., 1999). همچنین در تهیه محیط کشت باکتری‌ها استفاده می‌شود (آبرومند، ۱۳۸۳).

در درمان کم‌خونی (آنمی) چون هیستیدین دارد که به عنوان عامل بازگرداننده هموگلوبین خون (همراه با سایر مواد مانند آهن) عمل می‌کند. در انعقاد خون به علت ایجاد لخته مصنوعی و قدرت جذب خون، از

خونریزی جلوگیری می‌کند. به عنوان جانشین سرم خون تجویز می‌گردد، چون محلول رقیق‌تر از ۸٪ آن به علت خاصیت نگهداری آب و جذب تدریجی آن به عمل خونسازی تدریجی کمک می‌نماید. ژلاتین لایه داخلی معده و روده را می‌پوشاند، معمولاً همراه با سایر داروها در درمان اولسر معده و روده تجویز می‌گردد (آبرومند، ۱۳۸۳).

۵) مصارف خانگی: عمده ژلاتین در شیرینی‌پزی (برای پایداری کف و بهبود بافت)، تولید محصولات رژیمی (برای ایجاد حالت خامه‌ای، کاهش میزان چربی و بهبود مزه)، صنایع لبنی (برای ایجاد پایداری و بهبود بافت). محصولات نانوائی (برای امولسیون سازی، ایجاد ژل و پایداری) و در صنایع گوشتی (برای جلوگیری از آب انداختن محصول) است (ابدالی و معتمدزادگان، ۱۳۹۰).

۶) صنعت سینما و عکاسی: ژلاتین نقش مهمی در توسعه سریع صنعت سینما و صنایع فتوگرافی بازی میکند و امولسیون‌های از نمک‌های نقره می‌سازد که در مقابل نور بسیار حساس می‌باشد. ژلاتین در صنایع دیگر مثل نساجی و تهیه چسب و کبریت سازی و مرک چاپ و کاغذ پلی کپی و کارتن سازی و نیز در ساخت فیلتر لامپ‌های جیوه‌ای و همچنین به عنوان شفاف کننده اجسام بکار می‌رود (آبرومند، ۱۳۸۳).

۱-۹- ترکیب ژلاتین

مواد متشکله پروتئینی ژلاتین حدوداً به قرار زیر است:

کربن (۵۰/۵ درصد)، ازت (۱۷/۹ درصد)، هیدروژن (۶/۷ درصد)، گوگرد (۰/۶ درصد)، اکسیژن (۲۴/۳ درصد) (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵). توانایی تشکیل کف ویژگی مهم ژلاتین برای کاربردهای رایج غذایی نظیر مارشمالوها (یک نوع پاستیل خوراکی) می‌باشد. تطبیق‌پذیری ویژگی‌های امولسیون کنندگی و کف-کنندگی ژلاتین به طور ویژه در محصولاتی نظیر پودرهای امولسیفیه شده ارزیابی می‌شود. در این قبیل محصولات، ویژگی‌های فعال سطحی و تشکیل فیلم به طور موفقیت‌آمیزی در طی فرآیند امولسیفیه شدن استفاده می‌شوند. در مارشمالوها ویژگی‌های تشکیل ژل ژلاتین در تثبیت کف به محض خنک‌سازی به کار می‌رود. در بیشتر کاربردها، ژلاتین فقط به علت ویژگی‌های فعال سطحی انتخاب نمی‌شود بلکه ترجیحاً به خاطر ترکیب منحصر به فرد خصوصیات فعال سطحی، شیمیایی، رئولوژیکی و ژله‌ای شدن انتخاب می‌شود برای مثال در بستنی‌ها رفتار منحصر به فرد ذوب شدن ژل در محدوده ۳۰-۱۰ درجه منجر به ذوب شدن ژل ژلاتین در دهان می‌شود (Wilesmith et al., 1991).

۱-۱۰- ویژگی های ظاهری

ژلاتین به رنگ سفید تا زرد کمرنگ بوده و به فرم ورقه های شفاف، تکه، دانه و یا پودر یا ذرات ریز عرضه می گردد. ژلاتین باید دارای بو و طعم خاص ژلاتین بوده و عاری از هرگونه بوی نامطلوب خارجی باشد. ژلاتین در هوای خشک مقاوم بوده اما در هوای مرطوب و یا به حالت محلول در معرض تجزیه میکروبی قرار می گیرد ژلاتین در آب سرد نامحلول ولی پس از غوطه وری در آب متورم و نرم شده و به تدریج ۵ تا ۱۰ برابر وزن خود آب جذب می کند. ژلاتین در آب داغ، مخلوط آب داغ و گلیسرین و در اسید استیک ۵ نرمال محلول است. ژلاتین در الکل اتبلیک ۹۵ درصد، در کلروفوم، حلال اتری و روغن های فرار و غیر فرار محلول است (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۳)

۱-۱۱- ویسکوزیته ژلاتین

حل کردن ژلاتین در آب باعث افزایش ویسکوزیته آن می شود که میزان افزایش ویسکوزیته متناسب با غلظت ژلاتین، وزن مولکولی، دما، pH و قدرت یونی ژلاتین می باشد. رابطه ویسکوزیته با غلظت، خطی ساده نمی باشد بلکه تقریباً لگاریمی است. رابطه بین لگاریتم ویسکوزیته با غلظت، خطی ساده نمی باشد بلکه تقریباً لگاریتمی است. رابطه بین لگاریتم ویسکوزیته و عکس دمای مطلق (کلوین)، خطی گزارش شده است. ویسکوزیته ویژه^۱ محلول های ژلاتین با استفاده از ویسکومتر نوع U شکل تعیین می شود. صحت و دقت مناسب و بالای ویسکومترهای U شکل براساس آنالیز منحنی های تنش و سرعت برشی با دما با استفاده از ویسکومترهای بروکفیلد^۲ به اثبات رسیده است. در بسیاری از دماها محلول های ژلاتین رفتار نیوتنی از خود نشان می دهند، اگر چه در دمای نزدیک به دمای ژل شدن (تبدیل شدن محلول ژلاتین به ژل ژلاتین) ویسکوزیته به عنوان تابعی از زمان تغییر خواهد کرد که به علت بهم پیوستن مولکول های ژلاتین می باشد. غلظت های بالای ژلاتین و وزن مولکولی بالای آن باعث تسریع بهم پیوستن مولکول های ژلاتین می شود. همانطور که انتظار می رود تاثیر pH بر ویسکوزیته محلول های ژلاتین به قدرت یونی محلول ژلاتین بستگی دارد. این امر در محلول های غلیظ ژلاتین قابل توجه نمی باشد اما در محلول های رقیق قابل توجه است و منحنی ویسکوزیته در مقابل pH تحت تاثیر قدرت یونی تغییر می کند. دلیل این امر تاثیر دافعه درون و بین زنجیره ای^۳ مولکول های ژلاتین می باشد. ویسکوزیته یک محلول ژلاتین همیشه در pH معادل pH ایزوالکتریک ژلاتین، به حداقل می رسد و با دور شدن pH از نقطه ایزوالکتریک و افزایش بار روی مولکول ها افزایش پیدا می کند. کاهش ویسکوزیته محلول های ژلاتین تحت تاثیر حرارت بر خلاف کاهش

1. Specific viscosity

2. Brookfield

3. Inter and intra chain repulsion

قدرت ژل که عمدتاً به دلیل گرم شدن می باشد. کاهش ویسکوزیته در طی فرآیند معمولاً به دلیل تأثیر دما و مدت زمان اعمال حرارت و pH می باشد. کاهش ویسکوزیته به علت حرارت دادن یک محلول ژلاتین به دلیل شکسته شدن مولکول های ژلاتین می باشد.

۱-۱۲-فعالیت سطحی

در اغلب موارد از ژلاتین به علت خواص مربوط به فعالیت سطحی آن که باعث کنترل رشد کریستال ها در محلول های فوق اشباع می شود، استفاده می شود. به یکی دیگر از دلایل کاربرد ژلاتین استفاده از آن بعنوان یک پلی الکترولیت می باشد. از این جنبه محلول های ژلاتین استفاده های وسیعی دارند به عنوان مثال برای شفاف سازی آب میوه ها (مثل آب سیب) و محلول های الکلی، برای جداسازی مخمرهای معلق، تانن ها و سایر پلی ساکاریدهای تشکیل شده در طی عملیات تخمیر از ژلاتین استفاده می شود.

۱-۱۳-خواص ژل

پس از کارهای با ارزش مخققان هرینگتن، رائو و فینر^۱ در دهه هشتاد میلادی، مقالات مروری با ارزشی چاپ شده است که مکانیسم تشکیل ژل محلول های ژلاتین را بررسی نموده اند. اجزاء اصلی در تشکیل ژل ژلاتین زنجیره های آلفا و گاما و سایر الیگومرهای بزرگتر آنها، پپتیدهای مربوطه به علاوه اجزاء خیل بزرگ مولکولی مثل جزء Q^۲ می باشند. پایداری کلاژن متناسب با میزان کل پیرپیرولیدین (پرولین و هیدروکسی پرولین) است. تحقیقات متعدد انجام شده در این زمینه روی ژلاتین های مختلف نیز نشان داده است که این موضوع در خواص ژل ژلاتین نیز صحت دارد. در ژل های ژلاتین، قدرت نهایی ژل به میزان کل پیرولیدین آن بستگی دارد. ژل های حاصل از ژلاتین تولید شده از کلاژن ماهی ضعیف بوده و نسبت به ژلاتین حاصل از کلاژن پستانداران دارای نقطه ذوب پایین تری می باشد (کلاژن پستانداران دارای میزان پرولین و هیدروکسی پرولین بالاتری می باشد). بنابراین میزان پیرولیدین در مکانیسم تشکیل ژل موثر است، محلهایی که در تشکیل محلهای به هم پیوستن بین مولکول ها یا نقاط اتصال^۳ دخالت دارند به احتمال زیاد محلهایی هستند که میزان آمینو اسید پیرولیدین^۴ در آن مناطق بالا باشد. مطالعه مکانیسم تشکیل ژل در ژل ژلاتین، با استفاده از چرخش نوری^۵ نشان داده است که بعد از بستن اولیه ژل، فرآیند تشکیل نقاط اتصال ادامه یافته و یک فرآیند پیوسته می باشد. قدرت ژل رابطه مستقیمی با میزان تشکیل این اتصالات دارد. در محلول های

1. Harrington, rao and finer
2. Q-fraction
3. Junction zones
4. Pyrolidine imino acids
5. Optical rotation

رقیق ژلاتین (غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد) مولکول‌های ژلاتین به صورت مجزا در تشکیل ژل شرکت می‌کنند ولی در محلول‌های غلیظ شرکت مولکول‌های ژلاتین در تشکیل ژل دوتایی یا چند تایی می‌باشد. در تشکیل ژل کل یا قسمتی از هلیکس ساختار طبیعی مولکول کلاژن بازسازی می‌شود. مولکول‌های ژلاتین در محلول، ساختار رشته‌ای نامنظم دارند ولی کلاژن داری یک ساختار نیمه کریستاله منظم است. از آنجائیکه در ژلاتین در نقاط اتصال، گروه‌های سه تایی (گلیسین - پرولین - هیدروکسی پرولین) فراوانند، انتظار می‌رود که ساختاری مشابه آنچه در ساختمان هلیکسی کلاژن دیده می‌شود و تشکیل پیوند‌های هیدروژنی به پایداری آن کمک می‌کند وجود داشته باشد. در این سیستم پیوندهای هیدروژنی بین آمینواسیدها و گروه‌های C-H مجاور آنها مثل گلیسین تشکیل می‌شود. عواملی که باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی می‌شوند مثل اوره و تیوسیانات می‌توانند از فرآیند تشکیل ژل جلوگیری کنند. در محلول‌های ژلاتین تشکیل و شکسته شدن نقاط اتصال به عنوان یک فرآیند دینامیک همزمان و پیوسته در حال انجام می‌باشد و با سرد شدن محلول ژلاتین و نزدیک شدن دمای محلول به دمای بستن ژل، تشکیل نقاط اتصال بیشتر منجر به تشکیل ژل می‌شود. تحت این شرایط مولکول‌های زنجیره آلفا کرده که منجر به تشکیل مولکول‌های بزرگتر می‌شود. برگشت پذیری فرآیند ژل در ژلاتین یک ویژگی مهم و قابل توجه در هیدروکلوئید ژلاتین می‌باشد و به علت شکسته شدن نقاط اتصال تحت تاثیر حرارت صورت می‌گیرد. جزء بزرگ Q تاثیر مهمی روی سرعت بهم پیوستن اولیه مولکول‌های دارد بنابراین تاثیر تعیین کننده‌ای بر زمان تشکیل ژل دارد اما تاثیر خاصی روی قدرت ژل بعد از شروع فرآیند بستن ژل ندارد. ویسکوزیته محلول ژلاتین تاثیر مهمی روی خواص ژل در هنگام شروع ژل شدن دارد. دمای ذوب ژل ژلاتین، دما و زمان بستن ژل در دمای نزدیک نقطه ذوب به میزان مولکول‌های زیاد (بزرگ) ژلاتین بستگی دارد. اگر ژلاتین‌های دارای قدرت ژل یکسان (عدد بلوم مشابه) مقایسه شوند، آنهایی که دارای ویسکوزیته بالاتر (مقادیر بالای مولکول‌های با وزن مولکولی بالا) باشند در دماهای بالای 10°C قدرت ژل بالاتری خواهند داشت. اما در دماهای پایین‌تر از 10°C ژلاتین‌های با ویسکوزیته کمتر، قدرت ژل بالاتری خواهند داشت. این امر به علت شرکت مقدار زیاد پپتیدهای کوچکتر در تشکیل ژل می‌باشد. عوامل متعددی روی نسبت بین قدرت ژل و توزیع وزن مولکولی ژلاتین تاثیر می‌گذارد. در گذشته به این عوامل پرامترهای سختی^۱ ژل گفته می‌شد و تا مدتی ناشناخته بودند. از جمله این عوامل می‌توان به تعداد و توزیع گروه‌های دست نخورده پیرولیدین در طول زنجیره اشاره نمود. عامل دیگر نسبت زنجیره‌های آلفا-۱ به آلفا-۲ می‌باشد. زنجیره‌های آلفا-۳ تمایل کمتری نسبت به تشکیل ژل دارند. در هنگام تشکیل ژل و بعد از آن هرچه مقدار زنجیره‌هایی که بتوانند خودشان را به نحوی بچرخانند که در کنار سایر مولکول‌ها قرار گیرند بیشتر باشد تعداد بیشتری نقاط اتصال

تشکیل خواهد شد. اگر تشکیل ژل در طی یک فرآیند سرد کردن سریع صورت گیرد قدرت ژل آن تا حد زیادی کاهش خواهد یافت. در یک فرآیند تشکیل ژل اگر محلول ژلاتین به تدریج سرد شود یا در دمایی که چند درجه بالاتر از دمای تشکیل ژل نگه داشته شود قدرت ژل آن افزایش خواهد یافت. به طور کلی در یک محلول ژلاتین مولکول‌های ژلاتین ساختار رشته‌ای نامنظم دارند و در طی تشکیل ژل با ایجاد نقاط اتصال درون و بین مولکولی ساختار نیمه منظمی شبیه کلاژن اولیه ایجاد می‌شود.

۱-۱۴- فاکتورهای موثر بر خواص ژل ژلاتین عبارتند از:

خواص یک ژل ژلاتین تاثیر غلظت ژلاتین، pH محلول، زمان و دمای تشکیل ژل و نوع ژلاتین قرار می‌گیرد. نقطه ذوب ژلاتین تحت تاثیر دما و زمان بستن ژل، نوع ژلاتین و غلظت ژلاتین در محلول می‌باشد. به علاوه وجود سایر هیدروکلوئیدها در محیط نیز می‌تواند خواص محلول و ژل ژلاتین را تحت تاثیر قرار دهد. به طوری که وجود سایر هیدروکلوئیدها می‌تواند به صورت عامل مثبت یا منفی عمل نماید. وجود قندهای ساده مثل گلوکز و فروکتوز در غلظت‌های بالای ۱۰٪ نیز می‌تواند در افزایش قدرت و بهبود خواص ژل ژلاتین تاثیر مهمی داشته باشد.

۱-۱۵- نانو تکنولوژی

شامل برشی از مواد در سطح ایمنی می‌باشد که به منظور دستیابی به ویژگی‌های خاص آن ماده می‌باشد که به طور مناسبی می‌توان از کاربردهای دلخواه آن بهره برد. همچنین بیشتر پروسه‌های طبیعی در اندازه‌های نانو اتفاق می‌افتد. بنابراین پیوند بین نانو تکنولوژی و بیولوژی می‌تواند راه حل بسیاری از مشکلات درمانی باشد و می‌تواند انقلابی را در زمینه سلامتی و درمانی ایجاد کند. اکنون نانو تکنولوژی به عنوان ابزاری انقلابی در جهت حل مشکلات علم پزشکی گام برداشته است این محصولات شامل حسگرها با هدف حامل دارو، سیستم‌های حاملین ژن و می‌باشد از این رو نانو ذرات تهیه شده با غشاء آلی و غیر آلی در جهت، افزایش کاربردهای پزشکی می‌باشد این کاربرد به دلیل احساس مسئولیتی است که در عملکردهای زیستی وجود دارد. پایه افزایش اثرگذاری با وجود رده جدیدی از داروهای نانو ذره‌ای از پلیمرها، فلزات و سرامیک می‌باشند که می‌توانند در شرایطی مانند سرطان و مبارزه بدن با عوامل آسیب‌زا مانند باکتری‌ها خود را نشان دهند (Cho et al., 2005).

۱-۱۵-۱- تعریف فناوری نانو

نانومتر یک واحد طول در سیستم متریک است و بر یک میلیاردیم متر یا یک هزارم میکرون دلالت دارد. در حالی که "میکرو" هر چیز کوچک شده را به یاد می‌آورد، "نانو" معلوماً به عنوان یک صفت برای توصیف اشیاء، سیستم‌ها یا پدیده‌ها با ویژگی‌های ناشی شده از ساختار نانو مقیاس استفاده می‌شود. هرچند برخی نمونه‌های استثنا نیز وجود دارد؛ اما بیشتر خواص موجود نانو از سیستم‌هایی با اندازه‌های ۱ تا ۱۰۰ نانو متر آغاز می‌شود (Kreuter et al., 2003).

۱-۱۶-۱- انواع حاملین

لیپوزوم‌ها^۱، سیستم‌های متحدالمرکز و احاطه شده به وسیله دو لایه فسفولیپیدی هستند که از طریق آب پوشی فسفولیپیدهای خشک شکل می‌گیرند شامل وزیکول‌های چند لایه و تک لایه می‌باشد. میسل‌ها نیز مانند لیپوزوم‌ها سیستم‌هایی بوده که از طریق آب پوشی مولکول‌های فسفولیپیدی (و یا سورفاکتانت) شکل می‌گیرند ولی برخلاف لیپوزوم‌ها فقط متشکل از یک تک لایه می‌باشند. نانو ذرات لیپیدی جامد^۲، حامل‌های لیپیدی با پایه کلئیدی و با اندازه‌های کمتر از میکرومتراند و برای اولین بار در سال ۱۹۹۰ برای مصارف درمانی برای جایگزینی لیپوزوم‌ها و امولسیون‌ها طراحی شدند. نانو ذرات فلزی که مانند نانوذرات طلا و نقره می‌باشد (Prabha et al., 2004). نانو ذرات پلیمری^۳ غالباً زیست سازگار و زیست تخریب پذیرند و به عنوان یک ابزار ممتاز برای دارو رسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Prabha et al., 2004). پلیمرهای به کار رفته در نانو ذرات مورد استفاده در پزشکی می‌توانند از جنس پلی‌لاکتیک اسید (PLA)، پلی‌گلیکولیک اسید (PGA)، کوپلیمر پلی-لاکتیک و گلیکولیک اسید (PLGA)، پلی‌الکیل سیانوآکریلات (PACA)، پلی‌اتیل متاآکریلات (PMMA)، پلی‌بوتیل سیانو آکریلات (PBCA)، کیتوزان، ژلاتین و سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر باشند (Alyautdin et al., 1997); (Kreuter et al., 2003).

از سطح چنین نانو ذراتی می‌توان برای دارو رسانی هدفمند با اتصال عوامل شیمیایی خاص استفاده کرد. به طوری که ورود این ذرات را فقط در سلول‌های بافت هدف ممکن سازد. این ذرات پلیمری به علت خصوصیات زیست تخریب پذیری خود جهت دارو رسانی در بیماری‌های مزمن نسبت به نانو ذرات معدنی بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند (Prabha et al., 2004); (Murakami et al., 1999). دندریمرها، نانو پوسته‌ها استفاده به عنوان حامل‌های دارویی در بدن هستند (lee et al., 2005). نقاط کوانتومی و نانوبلورها

-
1. Liposomes
 2. Solid lipid nanoparticles
 3. Polymeric nanoparticles

به منظور تصویر برداری بیولوژیکی استفاده می شوند (Chan and Nie, 1998)، (Jain and Stroh, 2004) نانو حفرات و نانوذرات اکسید آهن، نانو ذرات سیلیکا، نانو ذرات فسفات کلسیم، نانو سیم‌ها، نانو امولسیونها و نانو فیبرها از اینگونه نانوذرات هستند. این وسیله یکی از ساده ترین ابزارهای نانو فناوری پزشکی است، که می‌توان از آن برای درمان بیماری‌ها استفاده کرد (Jain and Stroh, 2004).

۱-۱۶-۱-ویژگی حاملین دارو

اصولاً توزیع بدنی سیستم‌های دارویی تحت تأثیر دو عامل فیزیکی و شیمیایی می‌باشد که شامل اندازه ذره باید چنان باشد که آنقدر کوچک نباشد که با مکانیسم فیلتری ساده در بدنه مویرگی بعد از تزریق سیاهرگی حذف شود. خصوصیات سطحی آن بر روی اندازه ذره اثر مستقیم دارد. ویژگی سطحی بر روی جذب سطحی پروتئین در مایع بیولوژیک هم تأثیر دارد و باعث بهبود تداخل ذرات با گیرنده های غشایی پلاسمایی خاص می شود بنابراین منجر به هدایت آن جهت حذف ذرات از چرخه گردش سیستمیک شود این مکانیسم اتصال ذرات به پوشش سطحی پروتئین (بر روی پروتئین پوشش‌هایی وجود دارد که جهت شناسایی آنها به کار می‌رود) با مونوسیت ها و ماکروفاژها می باشد. این فرآیند را opsonization می نامند. این فرایند تحت تأثیر خمیدگی سطحی در سیستم حمل کننده می باشد. حامل‌های کوچکتر هدایت کننده به منظور کاهش جذب سطحی پروتئین و opsonin به طرف جذب به وسیله سلول های فاگوسیتوز تغییر مسیر میدهند (Harashima *et al.*, 1994). مشاهدات نشان داده اند که جذب کاهش موقعیت برای opsonization، اندازه ذرات باید بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر باشد. زمانی که اندازه نانو ذرات زیر ۲۰۰ نانومتر باشد درصد opsonization افزایش می یابد ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر (حاملین) که با تزریق سیاهرگی وارد می شوند، قادر هستند از دیواره سینوسی اپیتلیومی کبد عبور کنند و در همان جا انباشته شوند، به جای آنکه در سیستم کلونیدی به گردش در بیایند. حتی سیستم‌هایی مانند لیپوزوم‌ها می شوند و تقریباً در حدود ۴۰۰ نانومتر قطر دارند ساختمان این لیپوزوم ها تغییر پذیر هستند و قادر به عبور از دیواره کبد می باشند. در حقیقت سیستم‌های سختی از اقطاری که شبیه به هم نیستند را تشکیل می دهند (Romero *et al.*, 1999). از آنجایی که نانو ذرات به عنوان ماتریکس ذرات جامد مشخص می شوند چرخش آنها در یک سیستم بزرگ تنها با اندازه ذرات ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر مقدور می باشد. بنابر نتایج منطقی طرز تهیه نانو ذرات بر روی اندازه آنها و همگن بودنشان تأثیر مهمی دارد.

نه تنها اندازه ذرات ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر مقدور میباشد. بنابر نتایج منطقی، طرز تهیه نانوذرات بر روی اندازه های آنها و همگن بودنشان تأثیر مهمی دارد. نه تنها اندازه ذرات در داروهای کلونیدی نقش مهمی را ایفا می کند بلکه پایه پروتئین نیز بسیار مهم است. به طور اساسی سه روش برای آماده سازی نانوذرات وجود دارد.

۱- امولسیون^۱، ۲- دی سالویشن^۲ و ۳- کوسرویشن^۳ می باشد به روش امولسیون سرم آلبومین (از منابع مختلف) و ژلاتین به خوبی آماده سازی می شوند. دراین تکنیک HSA یا (سرم آلبومین انسانی)^۲ که تحت تأثیر پروتئین آن است، آماده شدن آن تحت تأثیر زمان، سرعت چرخش استیرر و دما (حین آماده سازی) می باشد، و نوع فاز بدون آب آن توسط Gallo و همکاران در سال ۱۹۸۴ کار شده است.

از معایب این روش به کارگیری حلال‌های طبیعی جهت حذف باقی مانده‌های روغنی می باشد که طی مراحل آماده‌سازی به وجود آمده‌اند و مواد فرار در سطح آن احتیاج به تعادل امولسیون دارند.

حلال طبیعی مانند روغن کنجد، کلروفرم، تولوئن یا ایزوپروپیل‌امیت می باشد در این روش از سورفاکتانت‌ها که دارای سطحی فعال هستند، استفاده نمی‌شود. همچنین این روش بازده خوبی نداشته و شاخص پراکندگی آن نیز بالاست و پروسه خالص‌سازی آن بسیار پیچیده و خسته کننده می‌باشد و گاهی اوقات برای رهایی از فاز سمی و امولسیون کننده باید مراحل پیچیده‌ای را طی کرد. در نهایت این روش انرژی زیادی مانند اولتراسونیک، سرعت بالا جهت هموژن ساختن آن و رسیدن به اندازه مطلوب می طلبد.

بنابراین روش دیگری که جایگزین این روش شده است، دی سالویشن مشتق شده از روش کوسرویشن می باشد (Lin *et al.*, 1993). Lin نانو ذراتی را با اندازه ۱۰۰ نانومتر را تهیه کرد. این ذرات با استفاده از اضافه کردن قطره قطره استون یه محلول HSA تولید شدند و pH بین ۷ تا ۹ بود و گلوتر آلدهید به عنوان ثابت کننده عمل کرد. او هر چه pH بالاتر برد، ذرات با اندازه کوچکتری به دست آورد همچنین بر روی دفع ذرات و تجمع آنها اثر گذار خواهد بود. با کنترل بین pH و اضافه کردن استون به این نتیجه رسید که نانو ذرات ژلاتین را به وسیله سدیم یا سولفات آمونیوم به عنوان نمک شاخص یا اتانول به عنوان غیر حلال استفاده شدند.

این روش جهت آماده‌سازی نانو ذراتی می باشد که پایه آنها پروتئین با وزن مولکولی معلوم شده مانند آلبومین می‌باشد. برای استفاده با حجم بالای ژلاتین که وزن مولکولی بالایی دارند، قدرت خود را از دست می دهد و شاخص پراکندگی آن را کم می کند. با توجه به آنچه گفته شد، ظاهراً برای ژلاتین باید شرایط متفاوتی را باید مهیا ساخت و حتی مقدار کمی اتانول به عنوان معرف، منجر به متراکم شدن و ته نشین نانو ذرات می شود علاوه بر آن شاخص پراکندگی آن به صورت قابل توجهی بالا می‌رود (Farrugia and Groves, 1999).

1. Desolvation

2. Coacervation

3. Human Serum albumin

پس بلاجبار که با وجود این مسئله، باید اتانول را به عنوان معرف جهت آماده‌سازی نانو ذرات ژلاتین حذف کرد. یک مرحله مهم نزدیک جهت رفع این روش دی سالوشن دو مرحله‌ای می باشد قسمت وزن مولکولی بالا از وزن مولکولی پایین در مرحله اول جدا می شود. قبل از اینکه ذرات برای مرحله دوم آماده شوند. این پروتکل جدید قادر می باشد که تولید ذرات کلئیدی هموژن کروی شکلی را کند (Coester *et al.*, 2000).

این نانو ذراتی که با این روش تولید می‌شوند قادر هستند به عنوان حامل دارو به کار روند و قابلیت تهیه آن را در این اندازه دارد که به صورت تجاری به کار رود، اولین بررسی را جهت آماده سازی این نانو ذرات انجام داد که منجر به فهم بهتر از پیچیدگی این پروسه و نتیجه تهیه نانوذرات شد (Ciester *et al.*, 2000). در این تکنیک، مهیا سازی شرایط و در نتیجه تولید نانو ذراتی است که به دقت بعد از تهیه نانوذرات ژلاتین، آنها با ابزار آنالیز خواهد شد و دیدگاه جدیدی را خواهد داد. در نهایت نانوذرات تهیه شده، در نتیجه چندین پارامتر دخیل در حین آماده سازی خواهد بود که بررسی خواهد شد. در طول پروسه استخراج ژلاتین از کلاژن، باندهای درون مولکولی (Intermolecular) و بین مولکولی (Intramolecular) که مسئول تعادل و عدم حلالیت آن می باشد را تحمل می کند (در نتیجه تروپوکلاژن باعث به هم ریختن ساختار آن (با باندهای هیدروژنی و آب گریز که تعادل و ساختار تریپل هلیکس می باشد) می شود (Flory and Weaver, 1960). به جای تولید ماده‌ای با ترکیب هموژن، ماده‌ای پروتئین هتروژنوس را تولید می‌کند و همچنین ردیفی از مولکول‌هایی که وزن مولکولی متفاوت دارند را ایجاد می‌کند. از آن جایی که بعضی از باندهای پپتیدی مسئول پایداری هستند و بقیه به خصوص گلاسن نسبتاً ناپایدار هستند. به علاوه بازسازی دوباره ژلاتین بستگی به فاکتورهای خارجی مانند pH یا دما در حین آماده‌سازی دارد. مولکول‌های هتروژنوس ژلاتین میتوانند به وسیله زنجیره‌هایی با وزن مولکولی مختلف توصیف می شوند (Farrugia and Groves, 1999).

هرگز تولید نانوذرات ژلاتین همانند نانوالبومین به دلیل ساختار پروتئین آن نخواهد بود. زمانی که نانو ذرات ژلاتین به عنوان حامل دارو استفاده شوند، قادر خواهند بود داروی کمتری را حمل کنند. دارو به این وسیله اثرات جانبی کمتری را از خودشان دهد. ارزان‌تر بوده و در دسترس بوده و همچنین این حامل در موضع مورد هدف به صورت یکنواخت شده و قابلیت حلالیت دارو در حالت آبی آن بیشتر است و پتانسیل گرفتن دارو به وسیله سلول‌ها افزایش می دهد (Hiedi and Villiers, 2009).

۱-۱۷- اثرات ضد باکتری

با پیشرفت تکنولوژی پزشکی و افزایش آنتی‌بیوتیک‌ها به طور چشمگیری مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌ها بالا رفته است. و رشد میکروبی در حضور آنتی بیوتیک‌ها با کمترین غلظتهای درمانی وجود دارد.

این مقاومت یا به علت عدم نفوذ آنتی بیوتیک در جداره میکروبی (مانع نفوذپذیری) یا با تغییر هدف در سلول به نحوی که سلول نسبت به آنتی بیوتیک غیرحساس میشود، یا خیلی مهمتر از طریق غیر فعال شدن آنتی بیوتیک به علت اثر آنزیمی باکتری، به وجود می آید (شفیعی وقنبرپور، ۱۳۷۱). با توجه به اینکه استفاده از نانو ذره‌های ضد میکروبی احتیاج به شرایط خاص ندارد، پس برای حل این مشکل نیاز به پیدا کردن نانو ذره‌های آنتی باکتریال وجود دارد (Mei et al., 2009).

بررسی‌ها نشان داده است که هرچه اندازه نانو ذرات کوچک‌تر باشد، خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت‌تری از خود نشان می دهند. این ویژگی‌ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانو مواد بسیار سریع گسترش پیدا کند به طوری که در تمام ابعاد زندگی همچون سیستم الکتریکی، مبارزه با میکروب‌ها، تشخیص و درمان بیماری‌ها کاربرد آن شناخته شود. از گذشته نانو ذرات در دو بخش فلزی و غیر فلزی مورد بحث قرار می گرفته‌اند. نانو ذرات فلزی در حشره‌کش‌ها و باکتری کش‌ها سال‌هاست مورد استفاده قرار می گیرند. نانو مواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را نشان داده‌اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که نانو ذراتی چون Zn, Ti, Ag, Cr و اکسید آنها خاصیت باکتری کشی بالایی دارند (Mei et al., 2009).

در گذشته، آنتی بیوتیک به ماده شیمیایی گفته می شد که به وسیله گونه های مختلف میکرواورگانیزم تولید شده، با غلظت کم قادر به مهار رشد میکرواورگانیزم دیگر می بود. ولی پیشرفت در روش های صنعتی ایجاد آنتی بیوتیک، باعث ایجاد تغییراتی در این تعریف شده است. اکنون، آنتی بیوتیک به ماده ایی گفته میشود که به وسیله میکرواورگانیزم (باکتری، قارچ) تولید میشود (پنی سیلین) و یا ماده مشابهی که تمامی یا قسمتی از آن از طریق صناعی (سنتر شیمیایی) به دست می آید (سولفونامیدها) و با غلظت های کم، رشد دیگر میکرواورگانیزم ها را متوقف نموده، یا منجر به مرگ آنها میشود (رجب نیا، ۱۳۹۲).

۱-۱۷-۱- مبارزه آنتی بیوتیک ها با باکتری ها

جلوگیری از ساخت دیواره سلولی باکتری شامل گروه بتالاکتامها (پنی سیلین، سفالوسپورینه کارباپنمها و...) و سایکلو سرین، و نکوما یسین و باسیتراسین. این دسته با ایجاد تغییراتی در غشاء سلولی باعث افزایش نفوذپذیری و در نتیجه تخریب غشاء می‌شوند. شامل: دترژانت‌هایی همچون پلی میکسین، عوامل ضد قارچ پلی‌ان (نیستاتین و آمفوتریسین بی) و داپتوما یسین. هر ماده ضد میکروبی که از سنتز پپتیدوگلیکان (ساختار اصلی دیواره سلولی باکتری) ممانعت کند، باکتری را در برابر تغییرات فشار اسمزی حساس میکند.

از آنجایی که این لایه در سلول های انسانی وجود ندارد، بنابراین این آنتی بیوتیک ها بسیار اختصاصی عمل کرده، بر روی سلول های انسان تاثیری ندارد، لذا سمیت آنها کم و ناچیز می باشد (رجب نیا، ۱۳۹۲). اتصال این ذرات به پروتئین های حاوی گوگرد در سطح غشای باکتری ها، امکان ورود و تغییر در مورفولوژی و زنجیره تنفسی باکتری را فراهم می کند و در نهایت با اثرگذاری بر فرآیند مرگ سلولی منجر به مرگ عامل بیگانه می شود (Ahmadi et al., 2013). نکته حائز اهمیت آن است که باکتری ها نسبت به این ذرات مقاومت پیدا نمی کنند بنابراین اثرگذاری بر طیف وسیعی از باکتری ها میسر خواهد بود. به علاوه این ذرات پس از اثر در نقطه هدف بر میکروارگانیسم های دیگر نیز تاثیر می گذارند (Rai et al., 2009) نانوذرات نقره علاوه بر باکتری ها، با اتصال به گلیکوپروتئین های سطح ویروس مانع از اتصال آن ها به سلول های میزبان و در نهایت مرگ ویروس می شود. عده ای از محققین بر این باورند که عدم سمیت و ضدکتریایی بودن نانوذرات میتواند سهم گسترده ایی در درمان بیماری ها داشته باشد.

مهار پروتئین سازی: این دسته با اتصال به اجزا ۳۰S و ۵۰S ریبوزوم باکتری باعث مهار برگشت پذیر ساخت پروتئین می شوند، که بیشتر باکتریواستاتیک هستند. شامل، کلرامفنیکل، تتراسایکلینها، اریترومايسين، کلیندامایسین، استرپتومايسين و لینزولید. گروه دیگر از این دسته با اتصال به جزء ۳۰S ریبوزوم باعث مهار دائمی پروتئین سازی شده و باکتریوسید هستند همچون آمینوگلیکوزیدها.

جلوگیری از ساخت اسید نوکلئیک: شامل ریفامایسینها (ریفامپین و ریفابوتین) که باعث تغییر متابولیسم اسید نوکلئیک می شوند و کینولونها که با مهار توپوایزومراز باعث مهار RNA سازی می شوند. آنتی متابولیتها: شامل تری متوپریمو سولفونامیدها که سنتز فولات را مهار می کنند. مکانیسم های اثر بعضی از آنتی بیوتیکها ناشناخته است. عملکرد بتالاکتامها به طور خلاصه به این صورت است:

۱. اتصال به پروتئین هایی در دیواره سلولی باکتری به نام پروتئین متصل شونده به پنی سیلین (PBP).
 ۲. مهار ترانس پپتیدازها می شوند در نتیجه ترانس پپتیداسیون که به معنی ایجاد اتصال متقاطع در ساخت پپتیدو گلیکانهای دیواره سلولی باکتری است مختل می شود.
 ۳. در نهایت آنزیم های اتولیتیک که هیدرولازی مورین نام دارند، (مورین مترداف پپتید و گلیکان می باشد) و در باکتری هایی که در معرض پنی سیلین قرار گرفته اند فعال شده و موجب تخریب پپتید و گلیکان می شوند. نتیجه این فرایند تخریب دیواره باکتری و از بین رفتن سلول باکتری است.
- هدف هر گونه مطالعه در تولید بیولوژیکی این است که روشی برقرار گردد تا توسط آن یک ماده ای که در طبیعت وجود دارد بیوسنتز شود. این نوع آنتی بیوتیک ها متابولیت های ثانویه موجودات ذره بینی هستند که تولید بیولوژیکی آنان به طور قابل ملاحظه ای مسیر سنتز متابولیت های اولیه را طی می کند. یک آنتی

بیوتیک بر خلاف متابولیت اولیه بلافاصله تغییر بیشتری نمی کند و در نتیجه جمع شده و غلظتی را تولید می کند که می توان آن را نسبتاً به سهولت جدا کرد. تشکیل متابولیت ثانویه به این ترتیب است که یک سوپسترا مصرف شده و از طریق مکانیسم واکنش معمول به یک محصول بینابینی متابولیسم عمومی تبدیل می شود که مجموعه ای از محصولات متابولیکی بینابینی به طریق غیرمعمولی که باز به نوبه خود همان مکانیسم متابولیکی عمومی هستند و فقط چند مرحله ای برای سنتز متابولیت ثانویه باشد علی القاعده تنها یک چنین ترکیبی را نمی سازد بلکه سری کاملی را تولید می کند. واحدهای سازنده آنتی بیوتیک را می توان به چند گروه تقسیم کرد که عبارتند از اسیدآمینه، قند و متابولیسم اسید چرب (استات و پروپیونات) مشتق می شود (شفیعی و قنبرپور، ۱۳۷۱).

ژلاتین ماهی تون زرد باله با وزن ۱ تا ۱۰ کیلو دالتون دارای خاصیت ضد باکتری بر علیه ۱۸ گونه از باکتریهای گرم مثبت و منفی مانند *Schewanella putrefaciens*، *Lactobacillus acidophilus* و *Photobacterium phosphoreum* می باشد (Guillen et al., 2011). وجود اسیدهای آمینه خاص، فاکتورهایی در ژلاتین ایجاد می کند که باعث ایجاد تقابلاتی در غشای باکتری ها می شود. صفت هیدروفوبی و بار مثبت اسید های آمینه باعث ورود پپتیدها به غشای باکتریها (با بار منفی) می شود. ترادف پپتیدها و ترکیبات غشای باکتریها می تواند بر روی این تقابلات اثر گذار باشد. ژلاتین ماهیان تون به دلیل ترادف خاص اسیدآمینه که دارد که شامل Phe – His – cys – Trip – Tyr- Met می باشد، که دارای دی پپتیدهایی بوده که دارای بخشهای کاتیونی هستند. ویسکوزیته بیشتر منجر به طول ژلاتین بلندتر میشود. بنابراین توالی بیشتر میزان هیدروکسی پرولین را خواهیم داشت و با تعداد هیدروکسی پرولین بالاتر تعداد واحدهای آنتی باکتریال بالا می رود. ویسکوزیته ژلاتین ماهی بیشتر از ویسکوزیته ژلاتین پستانداران می باشد (Cho et al., 2005).

تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنشهای احتمالی بین نانو ذرات با ماکرومولکولهای موجودات زنده انجام گرفته است. اختلافات بین بار منفی میکرواورگانسیم و بار مثبت نانو ذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانو ذره عمل کرده و باعث اتصال نانو ذره به سطح سلول شده و در نتیجه می تواند باعث مرگ سلول شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماسها منجر به اکسید شدن مولکولهای سطحی میکروبها و مرگ سریع آنها می شود. احتمال داده می شود یونهای آزاد شده از نانو مواد با گروههای تیول (SH-) پروتئینهای سطحی سلولهای باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئینهای غشاء سلولهای باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند، که نانو مواد با اثر بر روی این پروتئین باعث غیرفعال شدن و نفوذ ناپذیری غشاء می شوند. غیرفعال شدن تراوایی غشاء در نهایت باعث مرگ سلول می شود. همچنین نانو مواد، چسبیدن سلول باکتری و تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می اندازد که این

عمل باعث می شود گروهی از باکتری‌ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند که لازم است^۱ MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) (حداقل غلظتی از آنتی بیوتیک است که پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون از رشد قابل مشاهده باکتری جلوگیری کند و MBC (حداقل غلظت باکتری کشی)^۲ (حداقل غلظتی از آنتی بیوتیک است که پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون، باعث مرگ ۹۹/۹۹٪ باکتری شود) (رضایت و موسوی، ۱۳۹۵).

از آنجایی که کاربرد ژلاتین و نانوذراتین به ترتیب در بسته بندی مواد غذایی و احتمالاً کاربرد دارویی جهت استفاده بالینی میباشد. شاخص های مورد بررسی باکتری های زیر با مشخصات آن میباشد. اشریشیاکلی از باکتری های گرم منفی، میله ایی شکل، بدون هاگ، هوازی و بی هوازی اختیاری که قادرند لاکتوز را در عرض ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷-۳۲ سانتیگراد تخمیر و تولید گاز نمایند. استافیلوکوکوس آرنوس کوکسی گرم مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که مهمترین گونه در جنس (سرده) استافیلوکوک از نظر پزشکی محسوب می‌شود. گاهی اوقات به این باکتری، استافیلوکوک طلایی نیز می‌گویند. آرنوس در زبان لاتین به معنای طلایی است. در مواد غذایی فرایند شده، وجود استافیلوکوکوس آرنوس در غذا معمولاً مبین آلودگی به وسیله پوست، دهان یا بینی افرادی است که با غذا سرو کار دارند که ممکن است مستقیماً در خط تولید به وسیله کارگرانی که دارای زخمهای استافیلوکوکوسی در روی دست و بازوها هستند و یا در نتیجه سرفه و عطسه که معمولاً در عفونت های دستگاه تنفسی ایجاد می گردد، وارد غذا می شود. باقیمانده مواد غذایی آلوده که در سطح یا مجاورت سطح تولید قرار میگیرند نیز باعث آلودگی ماده غذایی فرایند شده می گردند. باکتری های اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آرنوس نقش بسیار مهمی در انتقال بیماری از طریق مواد غذایی را دارند شاخص های بسیار مناسب جهت تشخیص خاصیت ضد باکتری مواد غذایی می باشد (کریم، ۱۳۸۸). از آن جایی که استافیلوکوکوس آرنوس باعث اغلب بیماری های عفونی میباشد، باکتری سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین پاتوژن های فرصت طلب بوده و اشریشیاکلی اهمیت زیادی در بیماری زایی دارد (سعادت‌مند و همکاران، ۱۳۹۱). فعالیت آنتی‌باکتریال نانو ذرات ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تون زردباله (*Thunnus albacarus*) بر روی باکتری‌های پاتوژن که نماینده گرم مثبت آن استافیلوکوکوس آرنوس، از باکتری‌های گرم منفی اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. تا علاوه بر خواص نانو که دارای میزان حمل پایین میزان دارو، عدم مقاومت دارویی، اثرات جانبی کمتر، ارزان تر، حلالیت دارو و پتانسیل گرفتن دارو، خاصیت ضد باکتری هم اضافه گردد (Hiedi and Villiers, 2009)

-
1. Minimum Inhibitory Concentration
 2. Maximum Bactericidal Concentration

فصل دوم

مروری بر ادبیات تحقیق و

پیشینه تحقیق

۲-۱- تاریخچه استفاده از ضایعات ماهی برای تولید ژلاتین

تاریخچه تولید ژلاتین در آمریکا به سال ۱۸۵۰ برمی گردد. پس از آنکه در سال ۱۹۳۰ پوست خوک نیز جزء مواد اولیه به کار گرفته شد. رشد چشمگیری پیدا نمود. این صنعت از سال ۱۹۹۶ در اروپا رونق یافت. به نحوی که امروزه به عنوان بزرگترین تولید کننده ژلاتین در دنیا محسوب می شود. (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۷).

ژلاتین را می توان از منابع گوناگون تولید کرد. استخوان گاو، پوست گاو و پوست خوک، صنایع اصلی تجاری هستند (Wassva et al., 2007). ژلاتین از طریق هیدرولیز جزئی کلاژن تولید میشود. در طول تولید ژلاتین ماده خام حیوان با رقیق کردن اسیدی و بازی عمل آوری و در نتیجه بخشی از آن گسسته می شود کلاژن شکسته در آب گرم، قابل حل شده و ژلاتین تشکیل می شود (Arnesen and Gildberge, 2007). گزارشات حاکی از این است که مصرف سالانه ژلاتین در سال ۲۰۰۷ حدود ۳۲۶۰۰۰ تن بوده، که حدود ۴۶ درصد از پوست خوک، ۲۹/۴ درصد از پوست ۲۳/۱ درصد از استخوان گاو و ۱/۵ درصد از صنایع متفرقه تأمین شده است. اما با وجود خواص بسیار مطلوب ژلاتین به دلیل محدودیت های مذهبی (ژلاتین خوک در اسلام و یهود حرام است و گاو تنها در صورت ذبح شرعی قابل استفاده می باشد)، شیوه های خاص زندگی مانند گیاه خواری آلودگی ژلاتین پستانداران (گاو خوک) به ویروس ها از این روتلاش برای یافتن جایگزین های مناسب ژلاتین برای محصولات غذایی رو به رشد است.

پیغمبری و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی تولید کلاژن و ژلاتین از موجودات دریای کار کردند و بیان کردند که کلاژن و ژلاتین را می توان از منابع مختلف دریایی از جمله بی مهرگان آبی، پستانداران دریایی و ماهی ها استخراج کرد و بازده و کیفیت ژلاتین نه تنها تحت تأثیر گونه ها و یا بافتی است که از آن استخراج می شود، بلکه به فرایندهای تولید هم بستگی دارد.

Nagai و همکاران در سال ۲۰۰۰ روی جداسازی کلاژن از ضایعات ماهی، پوست استخوان و باله ها کار کردند و گزارش دادند که کلاژن موجود در پوست ماهیان باس دریایی ژاپنی، چاپ خال خالی و کوسه سرپهن به ترتیب ۵۲/۴ درصد، ۴۹ درصد و ۵۰/۱ درصد می باشد.

ابدالی و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی کاربرد ژلاتین ماهی به عنوان یکی از مهم ترین ژلاتین حلال در دنیا بررسی انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که سالانه فراوری ماهی ها سبب تولید حدود ۳۷ تن ضایعات غنی از کلاژن می شود که می تواند به عنوان منبع ارشمندی برای تولید ژلاتین ماهی مورد استفاده قرار گیرد همچنین گزارش شده است که ژلاتین ماهی استفاده شده در محصولات ژله ای دارای طعم و بوی مطلوب بیشتری نسبت به ژلاتین خوک یا قدرت ژل یکسان است.

Herpandi و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی استخوان و باله ماهی به عنوان منبع بالقوه ژلاتین حلال کار کردند و دریافتند که ژلاتین ماهی یک جایگزین مهم است که می‌تواند به عنوان ماده حلال و قابل قبول توسط همه مذاهب تلقی شود. این ژلاتین از محصولات جانبی ماهی که پوست عمده‌ترین بخشی مورد استفاده است ساخته می‌شود.

عطای صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۰ روی استخراج ژلاتین از ضایعات ماهی کار کردند و به این نتیجه رسیدند که ژلاتین ماهی به ویژه ماهیان آب گرچه ویژگی‌های مشابه با ژلاتین خوکی دارد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای استفاده در محصولات غذایی باشد.

آبرومند در سال ۱۳۶۸ روی بهینه‌سازی شرایط تولید ژلاتین از ضایعات ماهیان استخوانی کار کرد و به این نتیجه رسید که در صورت استفاده از شرایط قلیایی و ضایعات فیله، مقدار ژلاتین حاصل حداکثر خواهد بود همچنین با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۶/۵ می‌باشد. راندمان ژلاتین حاصل حداکثر و با بهترین کیفیت خواهد بود.

آبرومند در سال ۱۳۶۸ همچنین روی تولید پروتئین با ارزش افزوده از ضایعات ماهیان آب‌های جنوب کشور و استفاده بهینه از مواد سهل الوصول و ارزان یعنی مقادیر فراوان ماهیان غیر ماکول آب‌های جنوب ایران و همچنین ضایعات شیلات برای استخراج ژلاتین کارکرد و به این نتیجه رسید که مقادیر ژلاتین حاصله هر دو روش اسیدی و قلیایی با مقادیر ارائه شده در سایر کشورها قابل مقایسه می‌باشد.

اسماعیل‌زاده کناری و همکاران در سال ۱۳۹۰ روی اثر پیش‌فرآوری بر راندمان و قدرت ژل ژلاتین حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ کار کردند و به این نتیجه رسیدند که تأثیرات متقابل دماهای مختلف استخراج و غلظت‌های قلیا و اسید بر قدرت ژلاتین معنی‌دار است.

علوی طلب و همکاران در سال ۱۳۸۴ بر روی کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی پوست و باله کپور فیتوهاگ با منابع دیگر بررسی انجام دادند و نتیجه گرفتند که ژلاتین قلیای کپور نقره‌ای در مقایسه با ژلاتین اسیدی آن را کیفیت بهتری برخوردار است همچنین کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی فیتوهاگ در مقایسه با کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی حاصل از منابعی مانند گاو، گوساله، گوسفند، خوک، پای مرغ، پوست کوسه‌ماهی و غیره در برخی از موارد بهتر است.

اسماعیل‌زاده کناری و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی تعیین ترکیب آمینواسیدی و بررسی نقطه ذوب ویسکوزیته ژلاتین حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ کار کردند.

Cho و همکاران در سال ۲۰۰۴ روی بهینه‌سازی فرآیند و ویژگی‌های عملکردی ژلاتین غضروف کوسه (Isuus Oxytincbus) کار و آن را با ژلاتین پوست خوک مقایسه کردند و عنوان نمودند که ژلاتین کوسه غلظت هیدروکسی پرولین کمتری نسبت به ژلاتین پوست خوک دارد و کدرتر از ژلاتین پوست خوک

است. توانایی تشکیل کف پایداری کف، ظرفیت نگهداری آب و قدرت ژلی ژلاتین کوسه پایین‌تر از ژلاتین خوکی است، اما ظرفیت اتصال به چربی در ژلاتین کوسه بالاتر است.

Cho و همکاران در سال ۲۰۰۴، بر روی پروسه آماده‌سازی ژلاتین استخراج شده از غضروف کوسه (*Isurus Oxyrinchus*) کار کردند. آن‌ها به روش قلیایی از سود ۱/۶ نرمال برای ۳ روز و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (در آب داغ) برای مدت سه ساعت و چهل دقیقه ژلاتین آن را استخراج کردند. ترکیب اسیدهای آمینه آن را بررسی کردند و آن را با ژلاتین پوست خوک مقایسه کردند.

Gomez و همکاران در سال ۲۰۰۵، استخراج ژلاتین را از پوست ماهی *Dove sole* (*Solea vulgaris*) با فشار بالا انجام دادند فشاری در حدود ۲۵۰ و ۴۰۰ مگا پاسکال برای ۱۰ یا ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در طی دو مرحله انجام شد و با اسید به کار رفته در آن ناپایدار شده و استخراج در آب ۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. ژلاتین به دست آمده مورد بررسی‌های زیر قرار گرفت با این سنجش‌های زیر رادرد و فشار (۲۵۰ و ۴۰۰ مگا پاسکال) بود.

توکلی پور در سال ۲۰۱۱، بر روی ژلاتین استخراج شده از پوست *Silver Garp* (فیتوفاگ) کارکرد و بررسی‌های لازم را درمورد روش تهیه آن (اسیدی یا قلیایی) انجام داد و با سنجش فاکتورهای رئولوژیکی و فیزیکو شیمیایی (میزان رطوبت، خاکستر، محتوای اسیدهای آمینه، pH، محتوای پروتئین، نقطه ذوب و زمان ذوب، رنگ و ویسکوزیته)، روشن کرد که کدام روش کرد که کدام روش (اسیدی و قلیایی) جهت استخراج ژلاتین با کیفیت بهتر می‌تواند تولید شود.

Gimenez و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی ویژگی‌های فیزیکو - شیمیایی ژلاتین استخراج شده از پوشش اسکوئید (*Dosidiues gigas*) کار کردند. سنجش آن‌ها بر روی محتوای پروتئینی، ترکیب اسیدهای آمینه همچنین ترکیب وزن مولکولی، رنگ و pH بود.

Jakhar در سال ۲۰۱۲، ژلاتین استخراج شده از پوست *Blacks potted Croaker*

(*Protonibea diacanthus*) را مورد بررسی قرار داد. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بود از رطوبت،

پروتئین، چربی، خاکستر، تخمین هیدروکسی پرولین، سنجش رنگ، ویسکوزیته و آنالیز اکتروفورز بود.

Haddar و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی و عملکرد ژلاتین استخراج شده از استخوان سر ماهی تون (*Thannus thynnus*) کار کردند. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بود؛ سنجش رنگ، آنالیز اکتروفورز، محتوای پروتئین، رطوبت و ویسکوزیته بود.

۲-۲- تاریخچه نانو

از زمان یونان باستان، مردم و به ویژه دانشمندان بر این باور بودن که مواد را تا حدی می‌توان به اجزای کوچک تقسیم کرد تا به ذراتی خردناشدنی به عنوان کوچک ترین اجزای سازنده ماده دست یافت و این ذرات بنیان موداد را تشکیل می‌دهند. شاید بتوان دموکریتوس^۱ فیلسوف یونانی را پدر علم و فناوری نانو دانست زیرا او اولین کسی بود که در حدود ۴۰۰ سال قبل از میلاد واژه اتم را - به معنی تقسیم نشدنی - برای توصیف ذرات سازنده مواد به کار برد. البته نقطه آغاز و توسعه فناوری نانو به طور دقیق مشخص نیست، شاید بتوان گفت که اولی فناوران نانو شیشه گران قرون وسطی بوده اند که از قالب های قدیمی برای شکل دادن شیشه‌ها یشان استفاده می کرده اند. هر چند این شیشه گران نمی‌دانستند که چرا با اضافه کردن طلا به شیشه رنگ آن تغییر می کند. در آن زمان برای ساخت شیشه های کلیساها از ذرات نانو متری طلا استفاده می شده است و با این کار شیشه های رنگی بسیار جذابی به دست می آمد. رنگ به وجود آمده در این شیشه‌ها این حقیقت را آشکار می کند که مواد با ابعاد نانو دارای همان خواص با ابعاد معمول نیستند. امروزه مشخص شده است که این تغییر رنگ به این دلیل است که ذرات طلا در حالت طبیعی زرد رنگ هستند، در حالیکه ذرات در ابعاد نانو قرمز (سرخ) هستند. گذشته از این پیشینه، تولد مفهوم فناوری نانو را می توان به سخنرانی فاینمن^۲ در دسامبر ۱۹۵۹ در همایش جامعه فیزیک آمریکا نسبت داد؛ جایی که او پرسید " اگر ما بتوانیم اتم‌ها را یکی یکی به صورت دلخواه‌مان مرتب کنیم، چه چیز اتفاق خواهد افتاد؟". عنوان سخنرانی وی " فضای زیادی در سطوح پایین وجود دارد"^۳ بود. فاینمن اظهار کرد که می‌توان تمام دایره‌المعارف بریتانیکا را بر روی یک سنجاق نگارشت و ابعاد کامپیوترها را کاهش داد. او در این سخنرانی توسعه بیشتر فناوری نانو را پیش‌بینی کرد. برخی از رویدادهای مهم تاریخی در شکل گیری علم و فناوری نانو عبارتند از سال ۱۸۵۷: کشف محلول کلوییدی طلا به وسیله مایکل فارادی. سال ۱۹۰۵: تشریح رفتار محلول‌های کلوییدی به وسیله آلبرت اینشتین. سال ۱۹۳۲: ایجاد لایه‌های اتمی به ضخامت یک مولکول به وسیله لنگمویر^۴. سال ۱۹۵۹: طرح نظریه " فضای زیاد در سطوح پایین " به وسیله فاینمن برای کار با مواد در مقیاس نانو. سال ۱۹۷۴: جاری شدن واژه فناوری نانو بر زبان ها برای اولین بار توسط نوریو تانیگوچی^۵. سال ۱۹۸۵: کشف ساختار جدیدی از کربن C₆₀. سال ۱۹۹۱: کشف نانو لوله های کربنی. سال ۱۹۹۳: تولید اولین نقاط کوانتومی با کیفیت بالا. سال ۱۹۹۷: ساخت اولین نانو ترانزیستورها. سال ۲۰۰۰: ساخت اولین موتور DNA. سال ۲۰۰۱: ساخت یک مدل آزمایشگاهی پیل سوختی با استفاده از نانو

1. Democritus

2. Feynman

3. There is plenty of room at the bottom

4. Langmuir

5. Norio Taniguchi

لوله. سال ۲۰۰۳: تولید نمونه های آزمایشگاهی نانو سلول های خورشیدی بر اساس پیش بینی مؤسسه تحقیقات لوکس^۱ ارزش بازار جهانی محصولات مبتنی بر فناوری نانو تا سال ۲۰۱۵ به بیش از ۲۸۴۰ میلیارد دلار افزایش خواهد یافت، که معادل ۱۵ درصد تولید جهانی است. پیش بینی این بازار عظیم برای محصولات فناوری نانو و رشد سریع آن، دولت های مختلف را بر آن داشته است تا برای از دست ندادن این بازار، سرمایه گذاری های کلانی در تحقیق و توسعه ی نانو انجام دهند.

یزدخواستی و همکاران در سال ۱۳۹۴، ساخت، مشخصه یابی و بررسی مقایسه ای خاصیت آنتی باکتریال نانو ذرات Ag-TiO_2 و ZnO-TiO_2 مورد بررسی انجام دادند. اکسیدتیتانیوم (TiO_2) از جمله موادی است که به علت دارا بودن خواص مختلف از جمله زیست سازگاری، اکسیداسیون قوی و خواص مکانیکی نسبتاً خوب در مصارف زیستی و پزشکی کاربرد فراوان یافته است. امروزه با هدف افزایش کارایی اکسیدتیتانیوم، از آرایش این ماده با عناصری مانند نقره، روی و آهن استفاده می شود. در این پژوهش آرایش اکسیدتیتانیوم با استفاده از نقره و روی از طریق فرایند سل - ژل انجام شد و نانو ذرات ترکیبات Ag-TiO_2 و ZnO-TiO_2 در دماهای مختلف از آزمون پراش پرتوی لیکس استفاده شد. همچنین جهت مشخصه یابی نانو ذرات در طیف سنجی جذب الکترونی مرئی - فرابنفش ($uv-vis$)، توزیع انرژی پرتوی ایکس (EDS) میکروسکپ الکترونی رویشی گسیل میدانی (SEM) و پتانسیل زتا استفاده شد.

Coester و همکاران، در سال ۲۰۰۰ بر روی آماده سازی نانوذرات با دو مرحله دی سالویشن - یک روش جدید جهت بهبود سطح آن و جذب شده، وزن مولکولی بالا ته نشین شده و با تنظیم pH استون را پمپ می کنند و اندازه گیری نانو ذرات انجام شده و و زتا پتانسیل آن، FTIR و شکل نانو ذرات با میکروسکوپ SEM آن مورد بررسی قرار گرفت. دیده شد.

محققان با استفاده از نانو ذرات موفق به رهاسازی نوع دارو به بدن موش شدند که موجب از بین رفتن تومور سرطانی می شود. این نانو ذرات حامل شانس زنده ماندن موش را افزایش می دهد در رهاسازی دارو را در خون محافظت می کنند و بعد در موضع هدف آن را آزاد می کنند.

فرید عباسی و همکاران در سال ۱۳۹۰، مقایسه تأثیر نسبت های مختلف نانوسیلور با محلول های ضد عفونی کننده بر میزان باکتری شایع دهانی را مورد بررسی قرار دادند. از آن جایی که سطوح و تجهیزات پزشکی در مراکز بهداشتی درمانی و دندانپزشکی مکرراً در معرض ترشحات عفونی قرار می گیرند. در مواردی که امکان استریلیزاسیون آن ها وجود نداشته باشد از مواد ضد عفونی کننده سریع الاثر استفاده می شود. در این مطالعه اثر ضد میکروبی محلول ضد عفونی کننده طراحی شده، تحت عنوان nanex، با محلول های خالص

1. Lux

نانوسیلور و دکوتکس ۵۳ پلاس علیه باکتری‌های استرپتوکوکرس موناس و سودوموناس آئروژینوزا مقایسه گردید.

Langer و همکاران در سال ۲۰۰۳، بر روی آماده سازی نانو ذرات آلبومین از سرم بدن انسان کار کردند و بر روی آن آنالیزهای لازم از جمله گرفتن اندازه ذره زتا پتانسیل، دیدن شکل ذره در زیر میکروسکوپ الکترونی، سنجش سمیت ذره سنجش میزان جذب نانو ذره توسط سلولهای زنده را بررسی کردند.

Heidi در سال ۲۰۰۹، با وارد کردن دارو ضد سرطان به نانو کیتوزان (نانو در اینجا به عنوان حامل عمل می کند موجب توقف رشد توده سلولهای سرطانی شوند - تومور سرطانی برخی بیماران سرطانی تنها بعد از شروع سرطان از بین می‌برند- با وجود نانو ذرات کیتوزان دیگر رشد نمی‌کند. با توجه به اینکه محیط اطراف تومور اسیدی است، محتویات خود را تخلیه می کند. این نانو ذرات می توانند ترکیبات دارو را حمایت کنند (MYC) را مسدود کنند MYC در بسیاری از سرطان ها نظیر سرطان خون فعال شود نتایج نشان می دهد که ترکیب بازدارنده MYC بسیار مؤثر است اما زمانی که این ماده به جریان خون تزریق می شود، به سرعت از بین می رود در نتیجه باید توسط یک ماده دیگری محافظت شود.

Alizadeh و همکاران، در سال ۲۰۱۲ بر روی اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات نقره بر روی *Brucella melitensis* در مدل جانوری در آزمایشگاه، کار کردند. *Burcellosis* یکی از باکتری‌ها معمول جانوری در دنیاست که عفونت ایجاد می‌کند. بروز عفونت بالا در بسیاری از جوامع به خصوص در مدیترانه و در آسیای غرب اتفاق می‌افتد.

از گذشته نانو ذرات در دو بخش فلزی و غیر فلزی مورد بحث قرار می‌گرفته‌اند. نانو ذرات فلزی در حشره‌کش‌ها و باکتری کش‌ها سال‌هاست مورد استفاده قرار می‌گیرند. نانو مواد در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین‌ترین سطح سمیت را نشان داده‌اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب‌های بیماری‌زا می‌تواند انتخاب مناسبی باشد. در مطالعات صورت گرفته نشان داده شده است که نانو ذراتی چون Zn, Ti, Ag, Cr و اکسید آنها خاصیت باکتری کشی بالایی دارند (Mei et al., 2009).

با پیشرفت تکنولوژی پزشکی و افزایش آنتی‌بیوتیک‌ها به طور چشمگیری مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌ها بالا رفته است. با توجه به اینکه استفاده از نانو ذره‌های ضد میکروبی احتیاج به شرایط خاص ندارد، پس برای حل این مشکل نیاز به پیدا کردن نانو ذره‌های آنتی باکتریال وجود دارد (Mei et al., 2009).

بنابه گزارش WHO آن‌ها فعالیت نانو ذرات نقره را بر علیه *Brucella meltenis* با روش دیسک دیفوزن انجام دادند و^۱ (MIC)،^۲ به ترتیب کمترین غلظت بازدارندگی و کمترین میزان باکتری کشی، را نیز اندازه‌گیری کردند.^۲

تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنش‌های احتمالی بین نانو ذرات با ماکرومولکول‌های موجودات زنده انجام گرفته است. اختلافات بین بار منفی میکرواورگانسیم و بار مثبت نانو ذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانو ذره عمل کرده و باعث اتصال نانو ذره به زمانی که نانو ذرات ژلاتین به عنوان حامل دارو استفاده شوند، قادر خواهند بود داروی کمتری را حمل کنند. دارو لبه این وسیله اثرات جانبی کمتری را از خود نشان دهد. ارزان تر بوده و در دسترس بوده و همچنین این حامل در موضع مورد هدف به صورت یکنواخت شده و قابلیت حلالیت دارو در حالت آبی آن بیشتر است و پتانسیل گرفتن دارو به وسیله سلول‌ها افزایش می‌دهد (Heidi, 2009).

نبی‌پور در سال ۱۳۹۳، بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتری نانو ذرات نقره و روی بر روی باکترهای پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آئروس را انجام دادند.

دوست محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۲، اثرات ضد باکتری نانو ذرات نقره را بر روی برخی از باکتری-های عامل عفونت بیمارستانی در شرایط *In Vitro* و *In Vivo* را مورد بررسی قرار دادند. باکتری‌های مورد بررسی عبارت بود از استافیلوکوکوس ورثوس، سود و موناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی موریوم بود. بررسی دیسک دیفوزن و MIC و MBC را به خوبی انجام دادند.

Qi و همکاران در سال ۲۰۰۴، بر روی آماده سازی ذرات نانو کیتوزان و اثرات ضد باکتری آن کار کردند. هدف آن‌ها ارزیابی اثرات ضد باکتری بر علیه میکرو اورگانسیم‌های متعدد ذرات نانو کیتوزان و نانو ذراتی که مس بر آن اضافه شده استرا بررسی کردند.

نانو ذرات کیتوزان بر پایه ژلاتین یونی از کیتوزان با آنیون‌های تری پلی فسفات آماده سازی شده اند. یونهای مس به نانو ذرات کیتوزان جذب می‌شوند. مشخصات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات با اندازه گیری سائز آن، زتاپتانسیل، نیروی اتمی میکروسکپی، FTIR آنالیز و زمینه های XRD را تعیین کردند. اثرات ضد باکتری نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان و بارگذاری با مس *S.cholerae*، *E-coli*، *S.aureus* و *S.typhimurium* بررسی شد. (MIC)، (Min Concentration Inhibitory) کمترین غلظت بازدارندگی و (MBC)، (Min bactericidal Concentration) کمترین غلظت کشندگی را بررسی کردند.

1 . Minimum Inhibitory concentration

2 . Minimum Bactericidal concentration

فصل سوم

(روش اجرای تحقیق)

۳-۱- وسایل مورد نیاز

لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری، فانل ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی لیتری، سرسمپلر 1000-100, 100-10, 10-5 ci to test میکرولیتری (سفید، زرد و آبی) انکوباتور شیکر سهند آذر مدل 554D ایران - هیتراستیرر مدل Labinco - سانتیفرژ HeHrich Roto Fix 32A مدل Zentrifugem آون مدل - ترازوی دیجیتالی Kern مدل EG220 با دقت ۰,۰۰۱ گرم تانک الکتروفورز Akhtaria ایران - اسپکتروفومتر Chima Dzu - PH- 8400s متر (Sana PH. 01-091METEROI-091) - پمپ اینفوژن مدل New Era Pump System Syringe Pump.

DLS مدل Brookhavan، میکروسکپ الکترونی SEM: مدل ZEISS DSM960A - انکوباتور سهند آذر - اسپکتروفوتومتر - باکتریهای لیوفیلیزه که دارای ATCC خود می باشند؛ شامل اشیشیاکلی با ATCC ۲۵۹۲۲ سودوموناس آئروژینوزا با ATCC2592، استافیلوکوکوس آرئوس با ATCC ۲۷۸۲۳ دیسکهای خالی یا (Blank disc) از شرکت Patan teb.

دستگاه HPLC: Tekno kroma

الک با منافذ 0.22mm

اسیدهای آمینه استاندارد برای تزریق به دستگاه HPLC

سورنگ مامیلتون

۳-۲- مواد مورد نیاز

سود (هیدروکسید سدیم) ۳٪ - اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال - تریس - اسید هیدروکلریدریک - SDS - گلیسرول - ژل پلی آکریل آمید - متانول ۳۰٪ - اسید استیک ۵٪ - برمیدپتاسیم - تریسپین ۲۵٪ - سرم گاو - استرومایسن ۱٪ - گلوتامین ۲ میلی مولار - محلول EDTA - 5,4 دی متیل تیاژول - 5,2 دی فنیل تترازولیم بروماید - آب مقطر - محیط کشت (Muellur Hinton agar)، (Muellur Hinton Broth) از مارک Merck، کریستال فنل - بورات - اورتوفتالالدئید (OPA) - متانول - مرکاپتواتانول - Homoserine - گلوترآلدئید - استون - اتانول - DMSO

۳-۳- روش کار

۳-۳-۱- روش استخراج ژلاتین

ماهی گیدر از دریای عمان صید و تهیه شد. سپس به همراه یخ فراوان در یخدان هایی به آزمایشگاه زکریای رازی واقع در دانشگاه علوم تحقیقات منتقل شد. استخراج ژلاتین به روش قلیایی به شرح زیر انجام شد. در

آغاز پوست از قسمت پشتی ماهی تون که رنگ مشکی دارد جدا شده و فلس ها کاملاً از پوست جدا شدند. سپس پوست را کاملاً تمیز کرده و جهت استخراج آماده شد در این مرحله با آب مقطر شستشو داده و پس از آن در محلول مقدار ۸ وزنی- حجمی آن را در محلول قلیایی ۳/۱٪ هیدروکسید سدیم در دمای ۱۰ درجه در انکوباتور شیکردار با دور (rpm) ۲۰۰ قرار داده شد. در این گام پس از شستشوی کامل با آب مقطر جهت خنثی سازی، عمل قبل را با اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال انجام دادیم. در مرحله بعد جهت استخراج، آب مقطر را به میزان ۶ برابر اضافه کرده و در دمای بین ۴۰-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹ ساعت بر روی هیتراستیرر قرار داده شد تا ژلاتین آن استخراج گردد. پس از گذشت این مدت، مایع را در دور ۲۰۰۰ (rpm) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتریفوژ کرده و بعد آن را در پلیت هایی ریخته و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در آون به مدت یک شبانه روز نگه داشته شد تا خشک شود مطابق با شکل شماره (۳-۲).



شکل (۳-۱): ماهی تون زرد باله - گیر

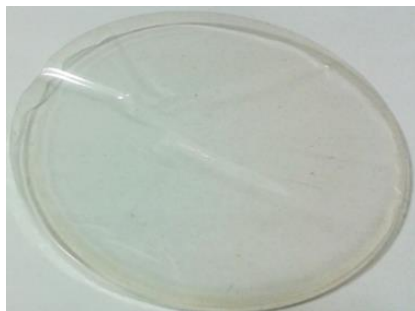
			
<p>۴. قرار دادن پلیت ها در آون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد</p>	<p>۳. سانتریفوژ مایع حاصل از هیدرولیز</p>	<p>۲. حرارت دهی پوست در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد</p>	<p>۱. محلول سازی</p>

شکل (۳-۲): مراحل تهیه ژلاتین

۳-۳-۲- مشخصات کیفی ژلاتین

۳-۳-۳- تعیین رنگ

ژلاتین تهیه شده بر روی کاغذ سفیدی قرار گرفت و رنگ آن تشخیص داده شد (طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵).



شکل (۳-۳): تعیین رنگ ژلاتین

۳-۳-۴- تعیین pH

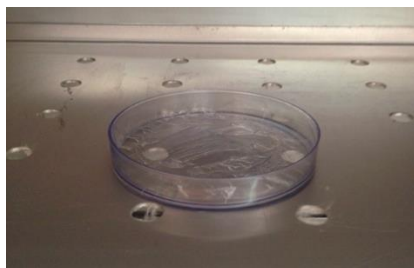
یک گرم از ژلاتین خرد شده را در ۵۰ میلی لیتر آب حل کرده و بعد صبر کردیم تا خنک شود. سپس حجم آن را به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و برای اندازه گیری از pH متر با الکترودهای شیشه ای استفاده شد مطابق با شکل شماره شکل (۳-۴). برای استاندارد کردن آن از محلول های $pH=4$, $pH=7$ بافر استفاده شد. قبل از استفاده، آن را با آب مقطر شستشو داده و pH آن به عدد ۷ رسانده شد (طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵).

۳. تعیین pH	۲. حل شدن ژلاتین در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر	۱. یک گرم ژلاتین خرد شده

شکل (۳-۴): مراحل تعیین pH

۳-۳-۵- تعیین رطوبت





در ابتدا وزن ژلاتین سنجش شد. سپس در آون با دمای ۴۵ درجه به مدت دو ساعت قرار داده شد. پس از سپری شدن زمان دوباره وزن سنجیده شد و با تعیین اختلاف وزن ژلاتین، رطوبت آن تعیین شد مطابق با شکل شماره (۳-۵) (طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵).



شکل (۳-۵): پلیت حاوی ژلاتین در آون جهت تعیین رطوبت

۳-۳-۶- تعیین قدرت بستن ژلاتین

یک گرم از ژلاتین به طور دقیق وزن شد و به همراه ۹۹ میلی لیتر آب به یک بالون ۲۰۰ میلی لیتری منتقل و بعد از سپری شدن ۱۵ دقیقه بالون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و به تناوب چرخانده تا کاملاً محلول گردید. در مرحله بعدی ۱۰ میلی لیتر از این محلول را به لوله آزمایشی به قطر داخلی ۱۲ میلی متر منتقل کرده و لوله در حمام آب و یخ قرار داده شد. حمام محتوی لوله در یخچالی در حدود صفر درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت قرار داده شد. پس از این مدت، مجموعه از یخچال خارج و لوله از حمام بیرون آورده شد مطابق با شکل (۳-۶) (طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵).

			
۴. قراردادن محلول در آب و یخ	۳. حرارت آب در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد	۲. حل شدن ژلاتین در ۹۹ میلی لیتر آب	۱. یک گرم ژلاتین

شکل (۳-۶): مراحل قدرت بستن ژلاتین

۳-۳-۷- تعیین دما و زمان باز شدن

محلول وزنی به حجم ۱۰ درصد را پس از آماده سازی مانند قبل، داخل یخچال در دمای ۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶-۱۸ ساعت گذاشته و سپس به حمام آب ۱۰ درجه سانتیگراد منتقل کرده و به تدریج به آن آب گرم ۴۵ درجه سانتی گراد اضافه شد و بدین وسیله درجه حرارت و زمان باز شدن ژلاتین ثبت می شود (طبق دستورالعمل موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۷۵).

۳-۳-۸- تعیین اسید های آمینه

آماده سازی محلول ها به شرح زیر انجام شد:

با افزودن ۵۰۰ میلی لیتر آب، محلول کاملاً حل گردید. در حال همزدن آن ۵۰۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریدریک غلیظ به آن اضافه شد.

محلول الف: بورات: بافر بورات دارای به میزان ۹/۲ مولار به میزان ۱۲۵ میلی تهیه شد.

محلول ب: ۰,۰۲۵ گرم اورتوفتالالدئید (OPA) + ۲۵۰ ماکرو لیتر محلول الف (بورات) + ۲۲۵۰ ماکرو لیتر متانول + ۲۵ ماکرو لیتر ۲- مرکاپتواتانول تهیه شد.

محلول ج: HCl 0.75M

محلول استاندارد داخلی: L-Homoserine 1mM in HCl 0.1N

آماده سازی نمونه: نمونه، آسیاب شد تا بصورت ذرات ریز درآمد تا از الک با قطر منافذ ۰,۲۵ میلی متر عبور کند.

فرآیند هیدرولیز: ۲ گرم از نمونه پودر شده را به لوله هیدرولیز منتقل کرده و ۱۰ میلی لیتر محلول ۶ مولار اسید هیدروکلریدریک - فنل به آن اضافه شده و به آرامی هم زده شد. آنگاه فرآیند هیدرولیز برای ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰-۱۲۰ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از اتمام این مرحله لوله ها را تا دمای اطاق خنک کرده و نمونه ها صاف شدند. ۲۰۰ ماکرو لیتر از محلول فوق را درون لوله آزمایش ریخته، سپس ۸۰۰ ماکرو لیتر متانول به آن اضافه نموده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد.

روش مشتق سازی: ۲۵ ماکرو لیتر از محلول بالا درون لوله آزمایش ریخته شد. روی آن ۳۲۵ ماکرو لیتر از محلول الف و ۵۰ ماکرو لیتر از محلول ب اضافه شد سپس ورتکس شد و به مدت ۲ دقیقه زمان داده تا مشتق سازی صورت گرفت. پس از پایان ۲ دقیقه به میزان ۲۵ ماکرو لیتر از محلول ج اضافه شد. سپس ۵۰ ماکرو لیتر از محلول داخل لوله آزمایش را با ۲۰۰ ماکرو لیتر از فاز متحرک A مخلوط کرده و پس از یک تکان چند ثانیه ای، ۴۰ ماکرو لیتر از آن توسط سرنگ هاملتون به دستگاه تزریق شد.

- **کالیبراسیون:** برای کالیبراسیون دستگاه از نمونه های استاندارد آمینو اسیدی موجود استفاده شد.

رقت های مختلف از هر یک از محلول های استاندارد به روش فوق را تهیه و به دستگاه HPLC با مشخصات زیر تزریق گردید. با استفاده از ارتفاع پیک های بدست آمده نسبت به استاندارد داخلی، منحنی کالیبراسیون مربوط به هر یک از اسیدهای آمینه رسم شد.

شرایط دستگاه HPLC:

– ستون: Teknokroma RP-C18 ODS-A (15 cm × 0.46 cm, 5 μm)

– دمای ستون: 35°C

– حجم تزریق: 40 μL

– شناساگر: fluorescence detector

طول موج دکتور: 480 nm / ex.: 330 nm

– فاز متحرک:

A: 855 ml acetate Buffer (50 mM, pH 7.2) + 45 ml MeOH + 12 ml THF

B: 132 ml acetate Buffer (300 mM, pH 5) + 462 ml MeOH + 6 ml THF

Gradient Program:

حرکت زمان (دقیقه)	A (%)	B (%)
Initial	۱۰۰	۰
۴	۷۷	۲۳
۱۳	۷۷	۲۳
۱۴	۷۲	۲۸
۱۶	۵۵	۴۵
۱۷	۲۵	۷۵
۲۷	۲۵	۷۵
۲۷,۵	۰	۱۰۰
۲۹,۵	۰	۱۰۰
۳۰	۱۰۰	۰

محاسبات:

مقدار هر آمینو اسید بر حسب g/100 gr از رابطه زیر بدست آمد.

$$X = \frac{PAR_t}{PAR_{st}} \times C_{st} \times \frac{V}{10^3} \times \frac{MW}{10^6} \times \frac{100}{m} \times 10$$

X = Arginine (g) /100 g sample

PAR_{st} = Peak-Area ratio of standard (PA_{st}/PA_{IS})

C_{st} = Conc. of standard (μMol)

PAR_t = Peak-Area ratio of test sample (PA_t/PA_{IS})

V = volume (ml)

MW= Molecular weight of arginine = 174.20

m = sample weight (g)

(Games, 1987).



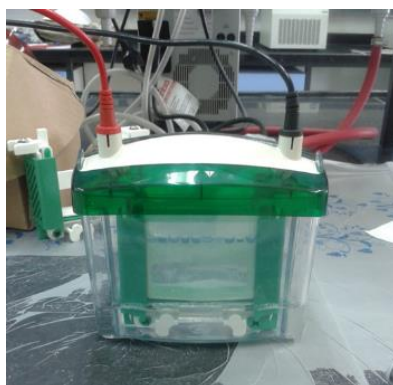
شکل (۷-۳): انجام کروماتوگرافی ژلاتین (Games, 1987).

۳-۳-۹-الکتروفورز

جهت مشاهده باندهای پروتئینی الکتروفورز به روش laemmli انجام شد.

۱. در آغاز ژل ۴ درصد و ۱۲ درصد را درست کرده که شامل آب مقطر، تریس، آکریل آمید، اس دی اس، آمونیوم پرفسفات و تممد که در هر دو ژل میزان آنها با هم فرق می کند و تنها در ژل ۴ درصد اس دی اس وجود دارد.

آماده سازی نمونه: کمتر از ۰/۰۵ گرم از ژلاتین را در یک سی سی آب جوش حل کرده و بعد به آن آب جوش، تریس، اس دی اس ۱۰٪، گلیسرول، بروموفنل بلو ۰/۵ و مرکاپتواتانول اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بند ماری گذاشته و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. ژل ها را بر روی جای ژل ریخته تا ببندد. رقت های مختلف نمونه ها را بر روی ژل لود کرده و یک لدر و همچنین یک شاهد (ژلاتین گاوی) بر روی ژل لود شد. بعد از لود، دستگاه را به برق زده تا مطابق با شکل (۳-۸) باند ها به طرف پایین حرکت کنند. بعد از حرکت باند به پایین ترین سطح، ژل را از دستگاه خارج کرده و در داخل رنگ بروموفنل بلو به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از در آوردن ژل از رنگ آن را در داخل رنگ بر قرار داده که شامل متانول ۵ درصد و اسید استیک ۷ درصد می باشد قرار داده شد. ژل را از رنگ بر درآورده و بر روی صفحه قرار داده و باندهای پروتئینی مشاهده شدند (laemmli, 2006).



شکل (۳-۸): انجام الکتروفورز

۳-۳-۱۰-طیف سنجی مادون قرمز FTIR

جهت تهیه ۲ درصد وزنی _ وزنی از ژلاتین و برومید پتاسیم را با هم مخلوط و سپس آسیاب کرده و بعد زیر دستگاه پرس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. یک قرص خیلی شفاف به دست آمد که نتیجه را جهت اندازه گیری طیف مادون قرمز زیر دستگاه گذاشته شد تا طیف به دست آمد (pavia, 2008).

۳-۴-تهیه نانو ذرات ژلاتین

۰/۶۲ گرم ژلاتین را در بشر کوچک بر روی استیرر با دور ۷۰۰ rpm در حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد در ۱۲,۵ میلی لیتر آب و ۱۲/۵ میلی لیتر استون مخلوط کرده و ۱۰/۵ میلی لیتر آب اضافه شد pH آن را به ۱۲ رسانده و ۲۵ میلی لیتر بر دقیقه استون به وسیله پمپ اینفوژن به آن اضافه شد. ۱۰۰ ماکرولیتتر گلوترآلدهید به آن اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت بر روی استیرر با دور ۷۰۰ گذاشته شود. در مرحله بعد نانو ذرات تهیه شده در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند مطابق با شکل (۳-۹) (Vorgelegt et al., 2006).



شکل (۳-۹): تهیه نانو ذرات ژلاتین

۳-۴-۱-اندازه گیری ذرات

ذرات برای اندازه گیری به دستگاه DLS برده شده تا اندازه آنها مشخص شوند (Vorgelegt et al., 2006).

۳-۴-۲-اندازه گیری زتا

ذرات جهت اندازه گیری زتا به دستگاه DLS برده شده تا اندازه آن مشخص شود (Vorgelegt et al., 2006).

۳-۴-۳-مشاهده ذرات

جهت مشاهده ذرات ۱۰۰ ماکرولیتتر از نانوذرات به اضافه ۱۰۰۰ ماکرولیتتر آب را باهم مخلوط کرده و در فریزر قرار داده و در دستگاه فریز درایر به پودر خشک تبدیل گردید و جهت مشاهده در میکروسکپ الکترونی آماده شد (Vorgelegt et al., 2006).

۳-۵- سنجش آنتی باکتریال

سنجش ضد باکتری به این ترتیب انجام شد. باکتری ها با ATCC های مشخص که عبارت بودند از سودوموناس آیروژنوزا، ۲۷۸۵۳، اشریشیاکلی ۲۵۹۲۲ و استافیلوکوکوس آرئوس ۲۵۹۲۳ از شرکت پادتن طب به صورت لیوفیلیزه خریداری شدند مطابق شکل (۳-۱۰). از سویه های مورد نظر (اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس آرئوس و سودوموناس آیروژنوزا) مطابق با رقت نیم مک فارلند تهیه شد (مطابق با شکل (۳-۱۵)) و مطابق با می توان از کشت ۴ ساعته میکروب در محیط تریپتوکیس براث که در روی شیکر ۳۵- ۳۷ درجه سانتی گراد کدورت رقت نیم مک فارلند مطابقت داده شد (Qi و همکاران، ۲۰۰۴). تنظیم رقت سوسپانسیون میکروبی با OD که در ۶۰۰ نانومتر عدد ۱ را نشان می دهد و در حدود 10^5 (cfu/mg) (شمارش کلونی بر میلیگرم) باکتری را شامل میشود انجام شد و بعد بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شدند (Raafat و همکاران، ۲۰۰۸). برای سنجش خاصیت ضد باکتری ژلاتین از روش دیسک دیفوزن (Disc diffusion) استفاده گردید (مطابق با شکل (۳-۱۱)). یک گرم از ژلاتین را در یک سی سی آب حل کرده و دیسک های خالی را به مدت ۱ ساعت در داخل آن قرار داده و دیسک ها در داخل پلیت هایی که باکتری ها در غلظت نیم مکفارلند تهیه شده اند و در کنار شعله به صورت چهار مرحله ایی بر روی پلیت های محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شده اند قرار گرفتند. این پلیت ها به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور ماندند. از آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به عنوان شاهد منفی جهت ایجاد هاله برای هر سه نوع باکتری استفاده شد. برای کنترل هم یک محیط کشت خالی در نظر گرفته شد. جهت تعیین MIC و MBC از روش رقت های متوالی (serial dilution) استفاده گردید و ۶ رقت برای ژلاتین تهیه شد و دیسکهای خالی را به مدت یک ساعت در رقت های مختلف قرار داده و بعد از یک ساعت آنها را در شرایط استریل (در زیر هود) در کنار شعله دیسک ها را در پلیت هایی از باکتری ها (که با غلظت نیم مکفارلند کشت چهار مرحله ای شده بودند) قرار داده شد. این پلیت ها به مدت یک شبانه روز (ماندن در انکوباتور) در صورت وجود هاله، قطر آن اندازه گیری شد (Nester و همکاران، ۲۰۰۳). مطابق شکل (۳-۱۲) و (۳-۱۳)

دلایل استفاده از آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین به عنوان شاهد:

۱. بررسی کاربرد در بسته بندی مواد غذایی و احتمالاً کاربرد دارویی جهت استفاده بالینی
۲. عدم مقاومت گونه های مورد بررسی به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین. به این دو دلیل از این آنتی بیوتیک استفاده شد (Reveles et al., 2016) و (Mediavilla et al., 2016).

علت انتخاب سوش های باکتری ها برای سنجش خاصیت ضد باکتری: از آنجایی که کاربرد ژلاتین و نانوجلاتین به ترتیب در بسته بندی مواد غذایی و احتمالاً کاربرد دارویی جهت استفاده بالینی میباشد باکتری

های اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آرتوس نقش بسیار مهمی در انتقال بیماری از طریق مواد غذایی را دارند شاخص های بسیار مناسب جهت تشخیص خاصیت ضد باکتری مواد غذایی می باشد (کریم، ۱۳۸۸). از آن جایی که استافیلوکوکوس آرتوس باعث اغلب بیماری های عفونی می باشد، باکتری سودوموناس آئروژینوزا یکی از مهم ترین پاتوژن های فرصت طلب بوده و اشریشیاکلی اهمیت زیادی در بیماری زایی دارد (سعادت مند و همکاران، ۱۳۹۱) کمترین غلظت بازدارنده و کشنده نانو ذرات ژلاتین به وسیله متد توریدومتری تعیین می شود (Nester et al., 2003). تلقیح باید به میزان 10^7 (cfu/mg) (واحد شمارش کلونی بر میلی گرم) تست هر کدام شامل ۵ میلی لیتر مولر هیتون براث می باشد که به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد استریل شده اند. به آن آب مقطر اضافه شد تا pH به ۱۲ رسید. در اولین لوله، ۵ میلی لیتر محلول سوسپانسیون ژلاتین و نانوژلاتین (یک میلی لیتر در میلی لیتر) اضافه می شود و بعد از مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از آن را به لوله بعدی منتقل کرده و به همین ترتیب رقت های بعد ساخته می شوند. پس هر لوله شامل سوسپانسیون نمونه مورد نظر با ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون قبلی است. سپس به لوله ها ۵۰ ماکرولیت سوسپانسیون باکتریایی که در بالا توضیح داده شد تلقیح شد. تست کنترل مثبت با اضافه کردن سیپروفلوکساسین انجام شد. تست کنترل شاهد شامل مولر هیتون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت اینکوبه می شوند با توجه به کدورت آنها MIC, MBC تعیین میشوند. یک لوپ پر از هر کدام از این لوله ها (لوله هائی از تست حداقل غلظت بازدارندگی) به محیط نوترینت آگار تلقیح شد. و برای رشد باکتریها مورد آزمایش قرار می گیرد. کدورت نشان دهنده عدم رشد باکتری ها و فعالیت ضد باکتری در لوله ها بوده و مورد بررسی قرار گرفت (Nester et al., 2003). مطابق شکل (۳-۱۴)

			
دیسک های خالی و دیسک های سیپروفلوکساسین	استافیلوکوکوس آرتوس	سودوموناس آئروژینوزا	اشریشیاکلی (لیوفیلیزه)

شکل (۳-۱۰): باکتری های لیوفیلیزه با ATCC مشخص و دیسک خالی و دیسکهای سیپروفلوکساسین جهت کنترل



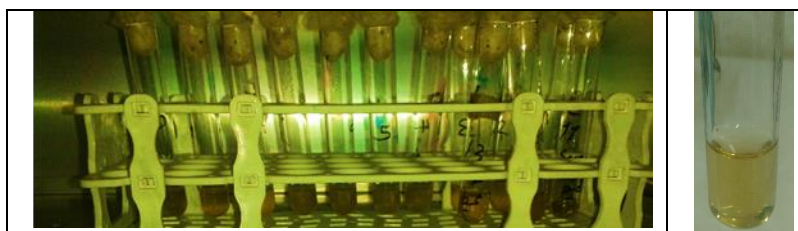
شکل (۱۱-۳) کشت های باکتری ها و تهیه غلظت نیم مکفارلند



شکل (۱۲-۳): تهیه رقت برای تعیین MIC و MBC ژلاتین با روش دیسک



شکل (۱۳-۳): گذاشتن دیسک ها بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار



شکل (۱۴-۳): تهیه رقت برای تعیین MIC و MBC نانوذراتین به روش توریدیمتری

فصل چهارم

تجربه و تحلیل داده ها

(یافته ها)

۴-۱- مشخصات کیفی ژلاتین

مشخصات ژلاتین به روش قلیایی استخراج شد و ویژگی‌های آن ارزیابی شد. رنگ آن: شفاف، pH آن ۶/۱، رطوبت اندازه گیری شده ۸/۵ درصد، دمای باز شدن و زمان باز شدن به ترتیب ۵۰ درجه سانتیگراد و ۴۵ ثانیه، دمای بسته شدن و زمان آن به ترتیب ۵۰ درجه سانتیگراد و ۴۰ ثانیه و بازده ژلاتین محاسبه شده ۹/۹ درصد بود مطابق با جدول (۴-۱).

جدول (۴-۱): مشخصات کیفی ژلاتین استخراج شده از ماهی تون زردباله

ماهی تون زردباله	فاکتورهای کیفیتی ژلاتین
۸,۵٪	(٪) میزان رطوبت
۶,۱	pH
۴°C	دمای بستن
۶۰ دقیقه	زمان بستن
۵۰°C	دمای باز شدن
۴۵ s	زمان باز شدن
شفاف	رنگ
۹,۹٪	بازده ژلاتین



شکل (۴-۱): نمایی از ژلاتین ماهی تون زردباله

۴-۱-۱- ترکیبات اسیدهای آمینه

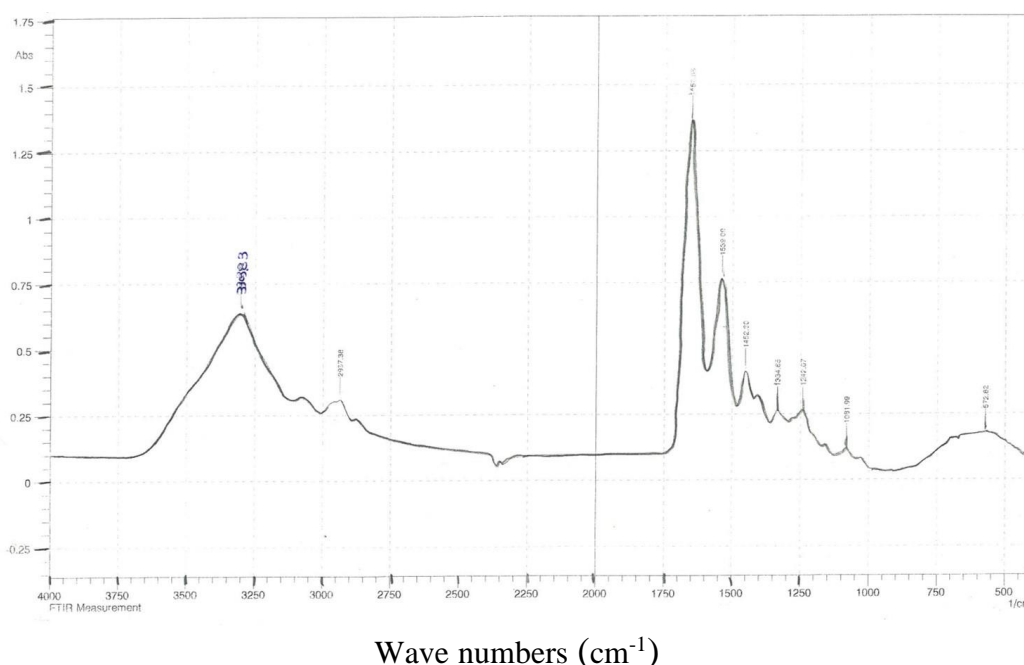
ترکیبات اسیدهای آمینه برای ژلاتین ماهی تون زرد باله در جدول (۴-۲) نشان داده شده است. یکی از اجزای مهم گلايسين می‌باشد که در ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تون زرد باله $22/4 \text{ g}/100\text{g}$ گزارش شده است، نسبت بالای میزان پرولین، هیدروکسی پرولین به ترتیب $19/6 \text{ g}/100\text{g}$ و $6/35$ می‌باشد. گلوتامیک اسید و آرژینین و بقیه اسیدهای آمینه که از ژلاتین پوست ماهی تون زرد باله استخراج شده‌اند در جدول (۴-۲) آمده است.

جدول (۴-۲): ترکیب اسیدهای آمینه از ماهی تون زرد باله.

اسیدهای آمینه	میزان اسیدهای آمینه ژلاتین پوست ماهی تون زرد باله (g/100g)
آلانین	$9/08 \pm 0/02$
آرژینین	$7/06 \pm 0/03$
اسید آسپارتیک	$4/82 \pm 0/02$
اسید گلوتامیک	$8/81 \pm 0/05$
گلايسين	$22/44 \pm 0/09$
هیسیتیدین	$0/65 \pm 0/01$
هیدورکسی پرولین	$6/35 \pm 0/04$
ایزولوسین	$1/18 \pm 0/03$
لوسین	$2/35 \pm 0/08$
لیزین	$3/77 \pm 0/02$
میتوین	$9/2 \pm 0/07$
فنیل آلانین	$2/14 \pm 0/02$
پرولین	$19/6 \pm 0/01$
سرین	$2/38 \pm 0/01$
تریپتین	$3/38 \pm 0/03$
تیروزین	$0/47 \pm 0/01$
والین	$1/9 \pm 0/02$

۴-۱-۳- طیف سنجی مادون قرمز ژلاتین

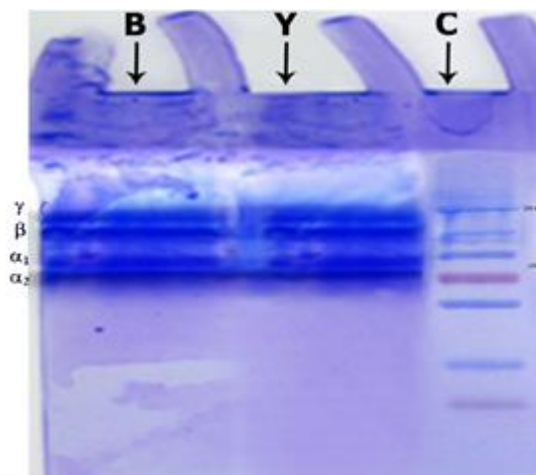
این طیف سنجی از قسمت ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تون زرده باله در شکل (۴-۲) نشان داده شده است. طیف سنجی ژلاتین از پوست ماهی تون زرد باله باندهای اصلی را در 3303.83 cm^{-1} (آمید A که نماینده کشش N-H (Stretching) نشان می دهد که جفت هیدروژن های متصل به آن هستند. در 1652 cm^{-1} که نماینده آمید I بوده کشش C=O ، که پیوند هیدروژن باند شده با COO^{-1} را نشان داده است. در 1539.09 cm^{-1} نماینده آمید II نشان داده است که خمش NH (bending) را با کشش CN به نمایش گذاشته است. در 1252.27 cm^{-1} نماینده را نشان داد که بیانگر آمید III می باشد. این نوع از طیف سنجی ژلاتین شبیه طیف سنجی بقیه ژلاتین ها است.



شکل (۴-۲) طیف سنجی مادون قرمز از ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی تون زردباله می باشد.

۴-۱-۴- آنالیز الکتروفورز SDS-Page

نمونه های پروتئینی در ژل الکتروفورز از ژلاتین استخراج شده پوست ماهی تون زرد باله و گاوی در (ژلاتین تجاری) شکل (۴-۳) نشان داده شده است. الکتروفورز هر دو (تون ماهی زرد باله و گاوی) شبیه هم نشان داده شده است. زنجیره α_1 و α_2 در هر دو نوع ژلاتین مشهود می باشد. وزن مولکولی آنها ۱۳۰ کیلو دالتون است. وجود زنجیره β که از دو زنجیره α تشکیل شده است و در هر دو نوع ژلاتین وجود دارد در حدود ۲۵۰ کیلودالتون وزن داشته است و زنجیره γ که از سه زنجیره α تشکیل شده است که شبیه ژلاتین تجاری گاوی بوده و مشابه آن را نشان می دهد.

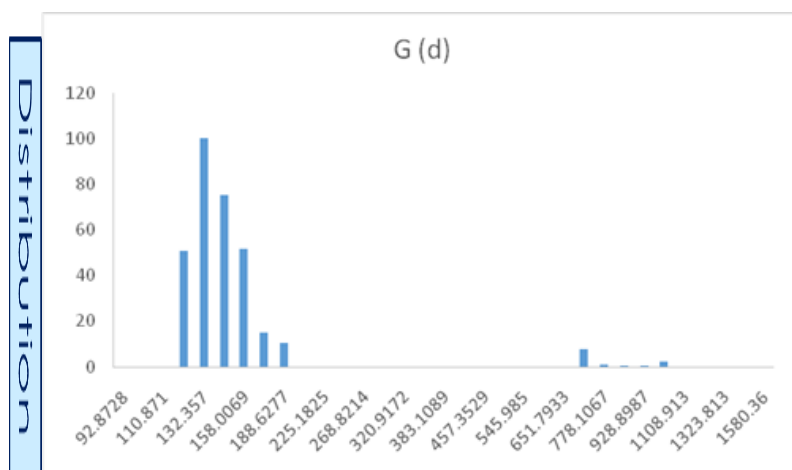


شکل (۳-۴): ژل SDS-PAGE در ماهی تون زردباله (Y) و گاوی (B) و دلد (C) جهت تعیین وزن مولکولی (۲۵۰ و ۱۳۰ کیلو دالتون) میباید.

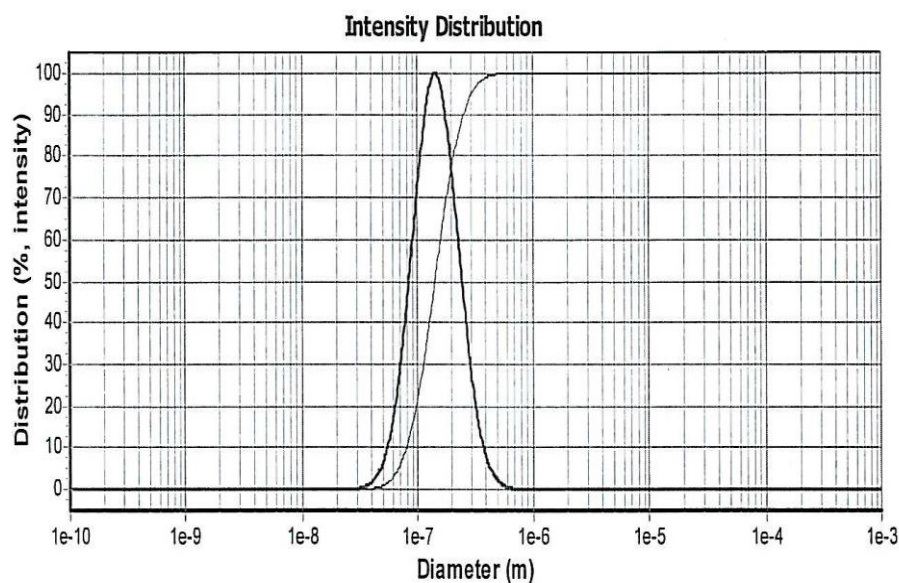
هر ماهی تون زردباله به طور متوسط ۱۳۷/۴ گرم پوست دارد و هر گرم پوست به طور متوسط ۰/۰۳۴۰ گرم ژلاتین تولید میشود. از یک ماهی تون زردباله میتواند ۴/۶۷ گرم ژلاتین تولید شود و از آن جایی صید بالای سالانه سطح زیان درشت ۲۷۰۰۰۰ تن است که ۴۲۰۰۰ تن متعلق به ماهی تون زردباله می باشد. در این صورت میتوان از ضایعات آن ۱۹/۶۱۴ تن ژلاتین استخراج کرد (دفتر آمار و بودجه سازمان شیلات، ۱۳۹۵).

۲-۴- ذرات نانو ژلاتین

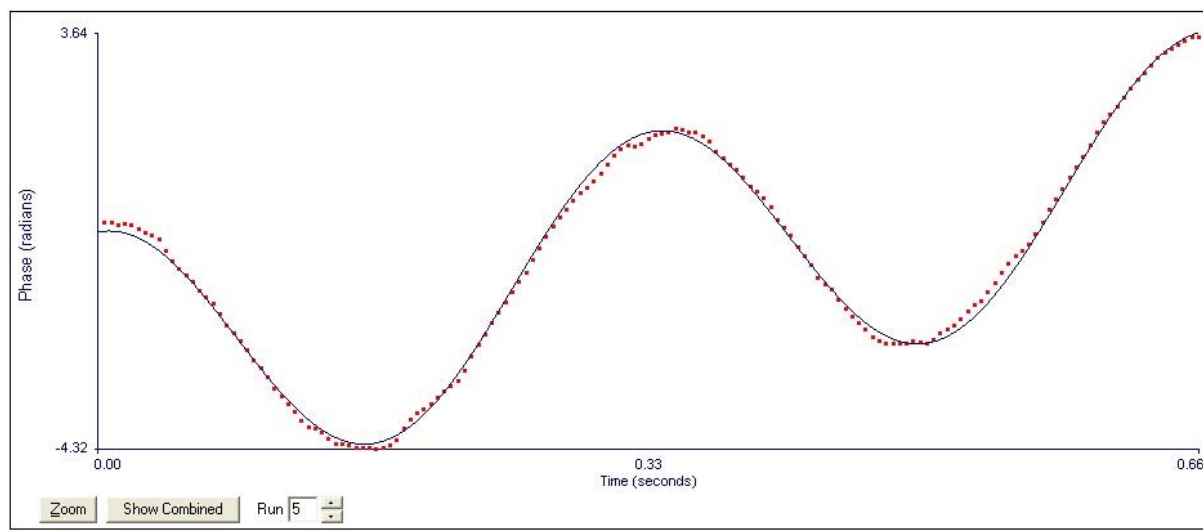
اندازه نانو و رابطه آن با فاکتورهای مختلف با دستگاه DLS اندازه نانو ذرات، اندازه گیری شد. زمانی که pH آن مقدار ۱۲ را نشان می داد، اندازه آن ۱۳۲ نانومتر مطابق با شکل (۴-۴) ثبت شد. PDI یا Poly Dispersity - Index (میزان یکنواختی پراکندگی سایز) نیز توسط این دستگاه (DLS) اندازه گیری شد و میزان آن ۰/۲۴۸ را نشان داد مطابق با شکل (۴-۵). زتاپتانسیل آن مطابق با شکل (۴-۶) ۳۱ mv می باشد.



شکل (۴-۴): نمودار نانوذرات ژلاتین که به وسیله DLS و دستگاه (Brookhaven) اندازه گیری شده است.

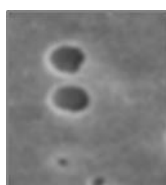
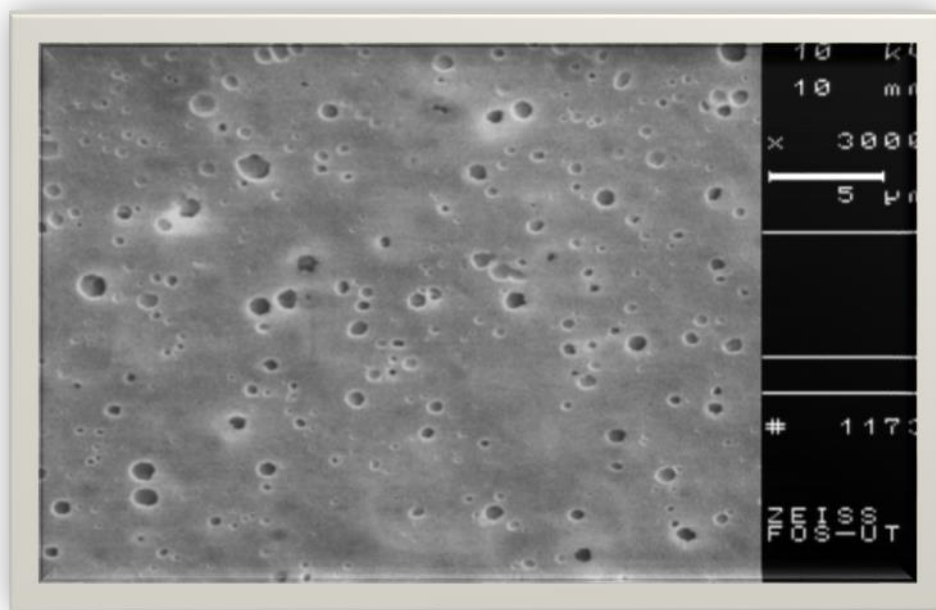


شکل (۴-۵): نتایج DLS با Brookhaven (پراکنش ذرات با میزان آنها) میباشد.



شکل (۴-۶): نتایج DLS در دستگاه (Brookhaven) زتا پتانسیل) میباشد.

نانوذرات ژلاتین به وسیله میکروسکپ (SEM) مشاهده شدند و به شکل کروی فرم بودند و با میکروگراف در میکروسکپ الکترونی و دستگاه DLS (۱۲۱ - ۱۸۸) پراکنش داشتند مطابق با شکل (۴-۷).



شکل (۴-۷): میکروسکپ الکترونی (SEM) ذرات نانوذلاتین را به صورت کره های نرم نشان میدهد

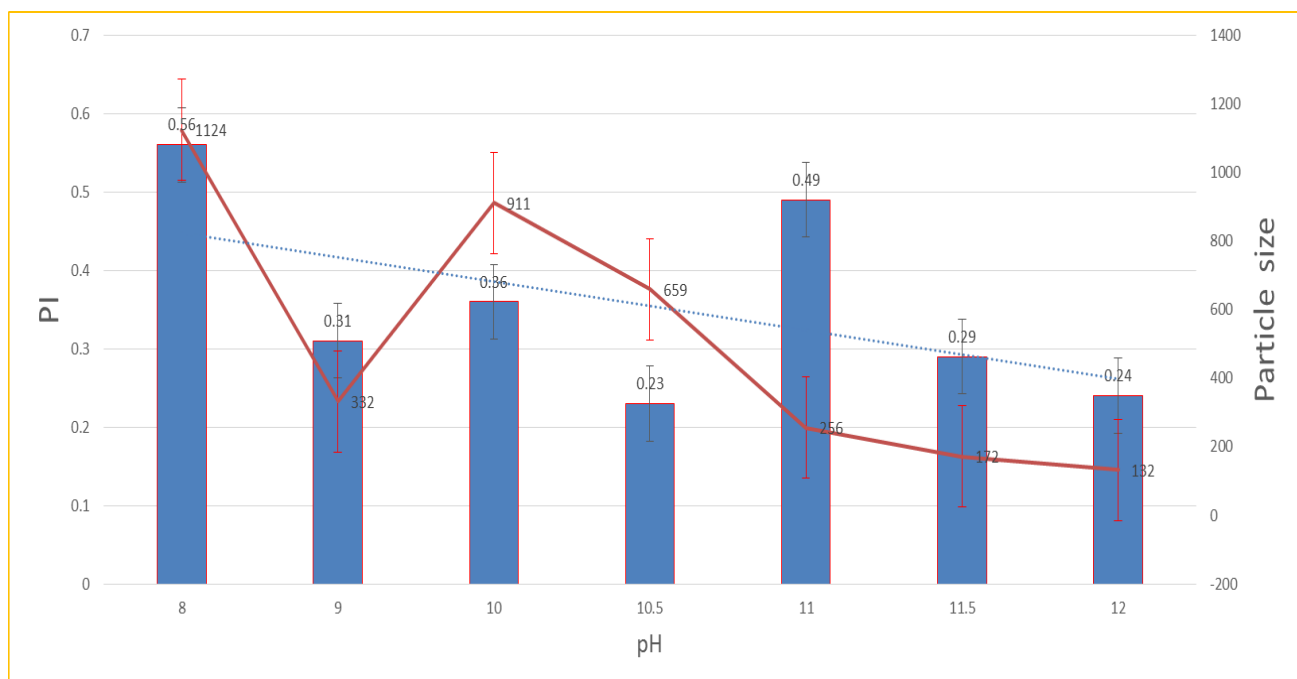
این اندازه را با توجه به pH های مختلف، میزان سرعت اضافه کردن استون، میزان دفعات استفاده از فیلتر و درصد گلوتر آلدئید بر روی میزان نتایج به دست آمده بر روی جدول (۴-۳) نشان داده شده است.

جدول (۳-۴): تاثیر pH های مختلف، میزان سرعت اضافه کردن استون، میزان دفعات استفاده از فیلتر و درصد گلوتر آلدهید بر روی اندازه ذرات و زتا پتانسیل

میزان شاخص پراکندگی PI N=1	پتانسیل (mV)	اندازه ذرات نانومتر (nm)	معرف دی سالویشن	استفاده از فیلتر ۰,۲۵ میکرومتر	PH	سرعت اضافه کردن استون	میزان درصد گلوتر آلدهید	دما قبل از مرحله اول دی سالویشن	دما قبل مرحله دوم دی سالویشن
۰/۲۴	۳۱/۵۳	۱۳۲	استون	دوبار	۱۲	۰/۲۵ ml/min	۲۵٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۲۹	۳۳/۵۱	۱۷۲	استون	یک بار	۱۱/۵	۰/۵ ml/min	۲۵٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۴۹	۱۱/۳۴	۲۵۶	استون	یک بار	۱۰/۵	۰/۷۵ ml/min	۲۵٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۲۳	۳/۲۴	۶۵۹	استون	یک بار	۱۰	۱ ml/min	۸٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۳۶	۲/۵۱	۹۱۱	استون	یک بار	۹	۱/۲۵ ml/min	۸٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۳۵	۲/۳۱	۳۳۲	اتانول ۹۸٪	یک بار	۸	۱/۵ ml/min	۲۵٪	۵۵°C	۵۵°C
۰/۵۶	۱/۰۵	۱۱۲۴	اتانول ۹۸٪	—	۸	۱/۷۵ ml/min	۲۰٪	۵۵°C	۵۵°C

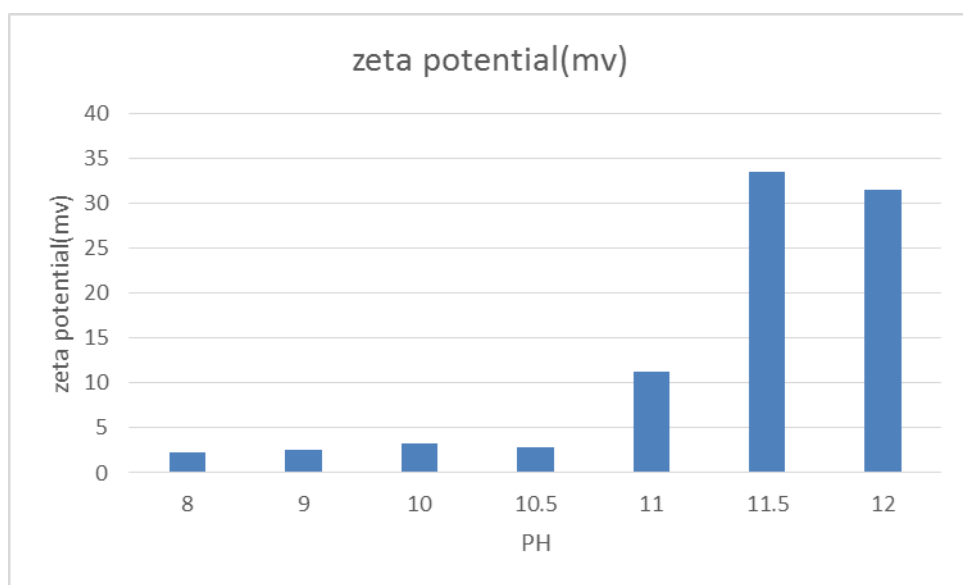
عوامل موثر بر مرحله اول دی سالویشن: طبق پروتکل اصلی با اضافه کردن استون رسوب سریع ژلاتین را خواهیم داشت. به دلیل ویسکوزیته بالای ژلاتین، رسوب هیدروژل مانند ژلاتین می‌تواند به وسیله دکانت شدن به راحتی شناور گردد و منجر به رسوب کامل از ژلاتین نامحلول شود. میزان pH در مرحله اول و دوم دی سالویشن بسیار موثر بوده است.

بار شبکه از بار کم چگالی پلی الکترولیت مانند ژلاتین در محلول بسیار تحت شرایط pH موجود در آن می‌باشد. از این رو تغییر در pH منجر به تغییر اساسی در اندازه نهایی نانو ذرات گزارش شده می‌شود. دامنه pH مشاهده شده بین ۷/۵ تا ۱۲ می‌باشد. در pH زیر ۸ نانو ذرات ژلاتین تمایل به گرد آمدن و رسوب کردن را داشتند. در این پروژه در pH=۱۰ اندازه نانو ذرات ۶۵۹ نانومتر گزارش شده است. در pH=۱۲، اندازه نانو ذرات به دست آمده ۱۳۲ نانومتر بود. به سرعت اضافه کردن ۵۰ میلی لیتر استون به نانو ذرات، باید توجه شود. زیرا تعیین کننده فاز جداسازی و نسلی از نانو ذرات بوده که به نظر می‌رسد در جایی که استون به آن اضافه می‌شود pH را پایین آورده است. بنابراین در pH ۱۲ اضافه کردن ۲۵ میلی لیتر استون جهت القاء فاز جداسازی لازم می‌باشد. زیرا pH ۱۲ حتی با اضافه کردن ۵۰ میلی لیتر استون فاز جداسازی انجام نمی‌شود. ظاهراً بار شبکه مولکول‌های ژلاتین شدید و قوی می‌باشد، بنابراین نیروهای دافع بین مولکولی متعادل که در ساختار سه بعدی پروتئین جهت جلوگیری از فروپاشی تجمع آن‌ها، نقش دارد. این حالت به وسیله نماینده دی سالویشن القاء می‌شود. در این دامنه pH، نانو ذراتی که کوچکتر تولید می‌شوند، نیروهای دفع کشش‌های بین مولکولی به شدت ممانعت کننده از نیروهای درون مولکولی انباشته (ته نشین) شدن آن‌ها می‌باشد، مطابق شکل (۴-۸).



شکل (۴-۸): ارتباط بین مقدار pH و اندازه نانوذرات و شاخص پراکندگی ذرات

زتا پتانسیل ژلاتین قبل از مرحله دوم دی سالویشن در pH های مختلف بسیار برجسته است. پس میزان pH بسیار مهم است. با ارجاع به داده‌ها، میانگین زتا پتانسیل مولکول‌های پلی پپتید تقریباً می‌بایستی بین ۲۹ و ۳۳ (MV) باشد که قادر به تولید نانو ذرات کوچک بوده است (مطابق شکل ۴-۹).

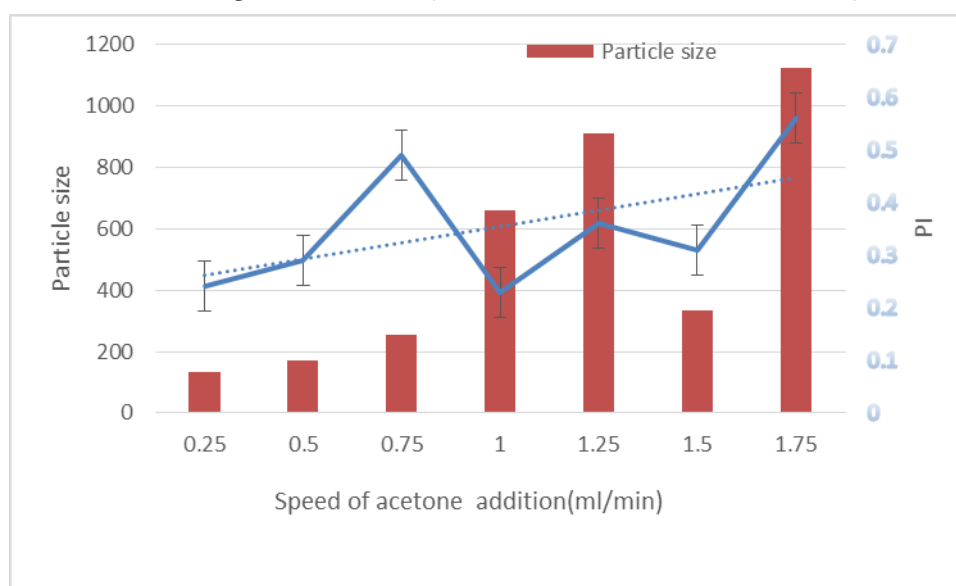


دامنه تغییرات = ۴

شکل (۴-۹): ارتباط بین pH و میزان زتا پتانسیل

سرعت اضافه کردن استون در طول مرحله دوم، در این پروژه بر روی اندازه نانوذرات ژلاتین مؤثر بوده است. محدودیت این روش، متوسط اندازه ذرات در امتداد افزایش شاخص میزان یکنواختی پراکندگی به صورت نمایی (توانی) افزایش یافته است. بنابراین شاخص‌های اندازه ذرات و میزان یکنواختی پراکندگی انباشته شده یا نانو ذرات به صورت هتروژنوس می‌شوند.

در نتیجه، میزان نسبت بالا پیشنهاد نمی‌شود مگر اینکه تغییراتی در شرایط استاندارد ایجاد شود (برای مثال یک استیرر خیلی خوب، کیفیت تهیه را بالا برده است). سرعت زیر ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه بسیار عالی بوده و برخلاف نوسان‌هایی در میزان اضافه کردن استون مؤثر می‌باشد مطابق شکل (۴-۱۰).



Std error = 8.85

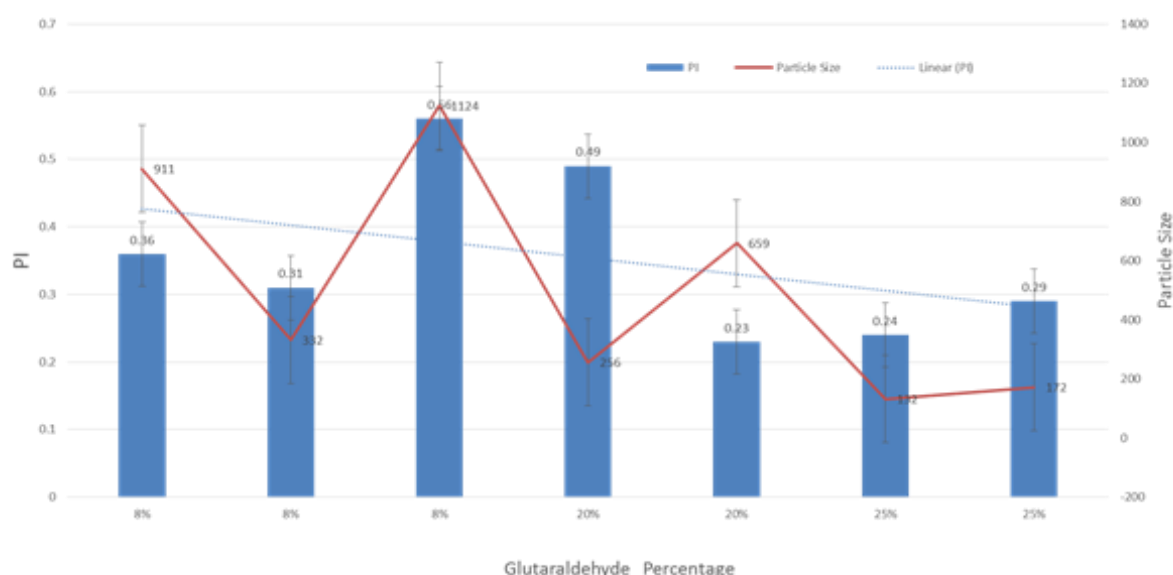
P = 0 - P < 0.05

دامنه تغییرات = ۱/۵

شکل (۴-۱۰): ارتباط بین سرعت اضافه کردن استون در مرحله دوم و کیفیت اندازه نانوذرات.

در مورد میزان اضافه کردن گلوتر آلدهید جهت ثابت کردن نانو ذرات این گونه استنباط شده است که به جهت اینکه نانو ذرات در جای خود و هنگامی که استون تبخیر شود، از شکل خود خارج نشوند و باید ثابت گردند. این عملیات به وسیله نمایندگان non - Zero و Zero length انجام می‌شود. نمایندگان Zero length - (مانند EDC یا اتیل - تری دی متیل آمینو پروپیل - کربو دی آمید) دارای گروه کربوکسیلیک فعال می‌باشد که به طور مستقیم با گروه‌های آمین پیوند می‌دهند و زنجیر پروتئینی را هماهنگ می‌کند. برای نانو ذرات ژلاتین گلوتر آلدهید (GTA) به عنوان نماینده انتخاب شده است. از آن جایی که این نماینده واکنش خیلی قوی و کارآمد (جهت ثابت کردن) را انجام داده است، گلوتر آلدهید (به صورت non - zero length

به عنوان ثابت کننده) یک سری پل هایی بین ذرات با گروه های آمینی ایجاد کرده است. اما گلوترآلدهید به دلیل واکنش پذیری بالایی که دارد، مقدار استفاده از GTA از 6.25-75 میلی گرم به ازای نمونه گزارش شده است. میزان استفاده بیشتر آن منجر به چگال تر شدن و کوچک تر شدن نانو ذرات تهیه شده گزارش شده است. با توجه به اندازه گیری شاخص میزان یکنواختی پراکندگی، اندک افزایشی در میزان گلوترآلوهید سبب تجمع بین ذره ای قوی و کشش آن ها نسبت به همدیگر و در نهایت گرد آمدن ذرات در کنار هم خواهد شد به علاوه باید در نظر داشت که تعداد پیوندهای ایجاد شده جهت ثبات نانو ذرات ژلاتین مسئول کاهش رها سازی جنبشی از نیروی بالقوه ای می باشد که در داروها گنجانده شده است. در نهایت تعداد عملکرد گروه های آمینی در دسترس برای باندهای کووالانسی از لیگاندهای آمینی واکنش نشان داده است. همچنین بر تعداد گلوترآلوهید (ثابت کننده) اثر داشته است مطابق شکل (۴-۱۱).



Std error = 8/85

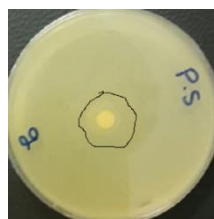
P = 0 - P < 0.05

دامنه تغییرات = ۱۷

شکل (۴-۱۱): ارتباط بین میزان درصد گلوترآلدهید و کیفیت اندازه نانو ذرات

۴-۳- خاصیت ضد باکتری

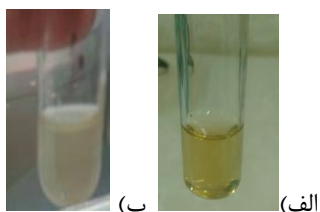
ژلاتین دارای فعالیت ضد باکتری خود را بر علیه باکتریهای گرم منفی نشان داد که نماینده آن باکتری های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا بود مطابق شکل ۴-۱۴ ژلاتین توانسته است هاله ایی را به قطر ۳ میلیمتر بر علیه باکتری سودوموناس ایجاد کند. MIC (کمترین غلظت بازدارندگی) و MBC (کمترین غلظت کشندگی) ژلاتین در غلظت در (۵ و ۴) به ترتیب ۶۲ و ۱۲۵ (ماکرولیتر بر میلی لیتر) در باکتری سودوموناس آئروژینوزا می باشد مطابق با شکل (۴-۱۲) می باشد و در حالی که فعالیت ضد باکتری نانوزلاتین بر علیه باکتریهای گرم مثبت و منفی، که نمایندگان آن باکتری های عبارت است از باکتری استافیلوکوکوس آرئوس و سودوموناس آئروژینوزا می باشد. کدورت لوله ها نشان دهنده اثر ضد باکتری می باشد مطابق با شکل (۴-۱۳). به ترتیب در غلظت های ۳۱ و ۶۲ ماکرولیتر بر میلی لیتر نانوذرات ژلاتین اثر ضد باکتری بر باکتری های استافیلوکوکوس آرئوس و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد و همچنین کدورت در لوله ها نشان دهنده فعالیت ضد باکتری می باشد مطابق با شکل (۴-۱۴). MIC و MBC شاهد منفی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در جدول (۴-۴) نشان داده شده است. همچنین شکل ۴-۱۵ هاله ضد باکتری آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین را بر علیه سه باکتری با ایجاد هاله هارا نشان می دهد.



شکل ۴-۱۲: هاله ضد باکتری ماهی تون زردباله به قطر ۳ میلیمتر بر روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا



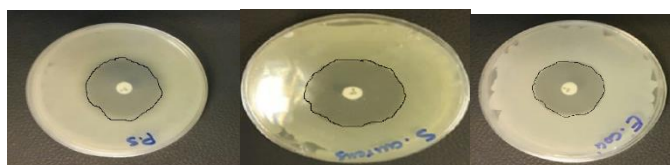
شکل ۴-۱۳: MIC, MBC ژلاتین بر روی باکتری سودوموناس به ترتیب در رقت های ۵ و ۴ و غلظت های ۶۲ و ۱۲۵ (ماکرولیتر بر میلی لیتر) و ایجاد هاله هایی به قطر ۱ و ۰/۵ میلیمتر



شکل ۴-۱۴: (الف) نشان دهنده عدم کدورت (عدم فعالیت ضد باکتری در نانو ذرات ژلاتین) و شکل (ب) نشان دهنده کدورت (فعالیت ضد باکتری در نانو ذرات ژلاتین) در استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا

جدول ۴-۴: MIC و MBC (ماکرو لیتر بر میلی لیتر) شاهد منفی (آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین)

MBC	MIC	(ماکرو لیتر بر میلی لیتر)
۱۰۰۰	۱۰۰۰	شاهد منفی آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین
۰/۲۵	۱	سودوموناس آئروژینوزا
۰/۱۲	۰/۵	استافیلوکوکوس آرتوس
۰/۰۰۴	۰/۰۱۵	اشریشیاکلی



(الف) (ب) (ج)

شکل ۴-۱۵: ایجاد هاله هایی به قطر ۳۱،۳۵،۳۴ میلی متر در سیپروفلوکساسین (به عنوان شاهد منفی) به ترتیب بر روی باکتری های الف) سودوموناس آئروژینوزا، ب) استافیلوکوکوس آرتوس و ج) اشریشیاکلی

۴-۳-۱-ارتباط بین اندازه نانو ذرات ژلاتین و فعالیت ضد باکتری

نشان می دهد که نانو ذرات ژلاتین فعالیت ضد باکتری بر علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا را دارد. زمانی که اندازه نانو ذرات به زیر ۶۵۹ نانومتر می رسد به خاصیت ضد باکتری آن افزوده شده و به باکتری استافیلوکوکوس آرتوس هم خاصیت ضد باکتری هم پیدا می کند. پس با کوچک تر شدن اندازه ذرات خاصیت ضد باکتری افزایش میابد مطابق با (جدول ۴-۵)

جدول ۴-۵: ارتباط بین اندازه نانوذرات ژلاتین و وجود (+) یا عدم (-) وجود فعالیت ضد باکتری

۱۱۲۴	۱۰۱۹	۹۱۱	۶۵۹	۳۴۱	۲۷۹	۱۷۰	۱۴۳	۱۳۲	اندازه نانوذرات ژلاتین (نانومتر)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	فعالیت ضد باکتری سودوموناس آئروژینوزا
-	-	-	-	-	-	-	-	-	فعالیت ضد باکتری استافیلوکوکوس آئروس

۴-۴-۴ نتایج آماری

مدل آماری

۱. بنابر مدل آماری رگرسیون خطی این عوامل pH های مختلف، میزان سرعت اضافه کردن استون، میزان دفعات استفاده از فیلتر و درصد گلوترآلدهید بر روی اندازه ذرات اثر مستقیم دارند و به صورت معنی داری بر روی اندازه ذرات اثر میگذارند $P < 0.05$ میباشد.

Variables Entered/ Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	agent دی سالوینگ استفاده از فیلتر pH سرعت اضافه کردن استون درصد گلوترآلدهید	.	Enter
a. Dependent Variable: اندازه ذرات			
b. All requested variables entered.			

با توجه به جدول فوق متغیرهای وارد شده در مدل که عبارتند از دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید و همچنین روش برازش مدل رگرسیونی (Enter) ارائه شده اند. متغیر وابسته اندازه ذرات است. در این روش همه متغیرها وارد مدل می شوند و از تمامی اطلاعات وارد شده در تحلیل مدل استفاده می شود. به عبارت دیگر این روش همه رگرسیون های ممکن را در اختیار محقق می گذارد.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	۰/۹۴۷ ^a	۰/۹۴۹	۰/۹۹۳	۸۹/۱۹۱
a. Predictors: (Constant), pH، استفاده از فیلتر agent دی سالوینگ، سرعت اضافه کردن استون درصد گلوترآلدهید،				

با توجه به جدول فوق ضریب همبستگی متغیرهای از دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید برابر ۰/۹۷۴ و مجذور آن یعنی ضریب تبیین برابر $R^2 = ۰/۹۴۹$ و ضریب تبیین تعدیل شده نیز برابر $\bar{R}^2 = ۰/۹۳۳$ می باشد. به عبارت دیگر در حالت تعدیل یافته ۰/۹۳۳ درصد از واریانس (پراکندگی) متغیر اندازه ذرات توسط متغیرهای از دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید پیش بینی می شود.

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	۲۲۴۲۴۲۹/۹۲۱	۵	۴۴۸۴۸۵/۹۸۴	۵۶/۳۷۷	...
	Residual	۱۱۹۳۲۶/۳۶۵	۱۵	۷۹۵۵/۰۹۱		
	Total	۲۳۶۱۷۵۶/۲۸۶	۲۰			
a. Dependent Variable: اندازه نانوذرات						
b. Predictors: (Constant), استفاده از فیلتر agent دی سالوینگ، سرعت اضافه کردن استون درصد گلوترآلدهید،						

جدول فوق تحلیل واریانس برازش رگرسیونی را نشان می دهد که در آن مجموع مربعات، میانگین مربعات، درجات آزادی، مقدار آماره F (۵۶/۳۷۷) و همچنین سطح معنی داری (۰/۰۰۰) نشان داده شده است. با توجه به اینکه مقدار سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری رگرسیون را استنتاج نمود. یعنی متغیر اندازه نانوذرات از متغیرهای از دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید تاثیر می پذیرد.

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-۱۶۰/۶۱۸	۴۳۹/۱۷۲		-۰/۳۶۶	۰/۷۲۰
	دی سالوینگ agent	-۹۳۸/۳۲۸	۲۰۵/۰۰۷	-۱/۲۶۴	-۴/۵۷۷	۰/۰۰۰
	استفاده از فیلتر	-۲۰۰/۷۳۰	۳۶/۴۸۵	-۰/۴۳۶	-۵/۵۰۲	۰/۰۰۰
	pH	۸۰/۲۰۱	۳۱/۷۸۹	۰/۳۷۷	۲/۵۲۳	۰/۰۲۳

سرعت اضافه کردن استون	۱۵۱۱/۰۱۱	۲۴۵/۳۰۹	۲/۲۵۳	۶/۱۶۰	۰/۰۰۰
درصد گلوترآلدهید	۴۱۸/۷۳۸	۷۲۱/۴۵۷	۰/۰۹۳	۰/۵۸۰	۰/۰۵۰۷۰
اندازه نانوذرات = متغیر وابسته					

جدول فوق برآورد ضرایب مدل رگرسیونی را نشان می دهد. ضریب رگرسیون برای متغیر Speed برابر ۱۵۱۱/۰۱۱، مقدار خطای استاندارد ۲۴۵/۳۰۹ و ضریب استاندارد برابر ۲/۲۵۳ بدست آمده است. با توجه به اینکه مقدار آماره t برابر ۶/۱۶۰ بدست آمده و سطح معنی داری (برابر ۰/۰۰) کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری ضریب متغیرهای مستقل و تاثیر آن بر متغیر اندازه نانوذرات را تایید کرد. برای سایر متغیرها نیز چنین نتیجه ای حاصل شده است. نتایج حاصله از تحلیل رگرسیونی متغیرهای موجود در معادله را می توان به صورت استاندارد شده در رابطه ریاضی ذیل نشان داد:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \varepsilon$$

به عبارت دیگر

nanoparticle size

$$= -1.264(\text{Disolvating}) - 0.436(\text{UseFilter}) + 0.377(\text{PH}) + 2.253(\text{Speed}) + 15.026(\text{gluter aldehyde}) + \varepsilon$$

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید	.	Enter
a. Dependent Variable: زتا پتانسیل			
b. All requested variables entered.			

با توجه به جدول فوق متغیرهای وارد شده در مدل که عبارتند از دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید و همچنین روش برازش مدل رگرسیونی (Enter) ارائه شده اند. متغیر وابسته زتا پتانسیل است. در این روش همه متغیرها وارد مدل می شوند و از تمامی اطلاعات وارد شده در تحلیل مدل استفاده می شود. به عبارت دیگر این روش همه رگرسیون های ممکن را در اختیار محقق می گذارد.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	۰/۹۹۷ ^a	۰/۹۹۴	۰/۹۹۳	۱/۰۹۴۷۱
a. Predictors: (Constant), سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید دی سالوینگ agent، pH، استفاده از فیلتر				

با توجه به جدول فوق ضریب همبستگی متغیرهای، سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH برابر ۰/۹۹۷ و مجذور آن یعنی ضریب تبیین برابر $R^2 = ۰/۹۹۴$ و ضریب تبیین تعدیل شده نیز برابر $\overline{R^2} = ۰/۹۳۳$ می باشد. به عبارت دیگر در حالت تعدیل یافته ۰/۹۳۳ درصد از واریانس (پراکندگی) متغیر توسط متغیرهای سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH پیش بینی می شود.

ANOVA ^a					
Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Regression	۳۱۹۲/۹۸۲	۵	638.596	532.879	.000 ^b
Residual	۱۷/۹۷۶	۱۵	1.198		
Total	۳۲۱۰/۹۵۸	۲۰			
a. Dependent Variable: ZPotential					
b. Predictors: (Constant), سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید دی سالوینگ agent، pH، استفاده از فیلتر					

جدول فوق تحلیل واریانس برازش رگرسیونی را نشان می دهد که در آن مجموع مربعات، میانگین مربعات، درجات آزادی، مقدار آماره F (۵۳۲/۸۷۹) و همچنین سطح معنی داری (۰/۰۰۰) نشان داده شده است. با توجه به اینکه مقدار سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری رگرسیون را استنتاج نمود. یعنی متغیر زتا پتانسیل از متغیرهای سرعت اضافه کردن استون، درصد گلوترآلدهید دی سالوینگ agent، استفاده از فیلتر، pH تاثیر می پذیرد.

Coefficients ^a					
Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
	B	Std. Error	Beta		

(Constant)	4.036	5.390		۰/۷۴۹	۰/۴۶۶
agent سالیونگ	7.826	2.516	.286	3.110	۰/۰۰۷
استفاده از فیلتر	1.531	.448	.090	3.419	۰/۰۰۴
pH	-.987	.390	-.126	-2.530	۰/۰۲۳
سرعت اضافه کردن استون	-13.540	3.011	-.548	-4.497	۰/۰۰۰
درصد گلوترآلدهید	133.055	8.855	.799	15.026	۰/۰۰۰
a. Dependent Variable: زتا پتانسیل					

جدول فوق برآورد ضرایب مدل رگرسیونی را نشان می دهد. ضریب رگرسیون برای متغیر درصد گلوترآلدهید برابر ۱۳۳/۰۵۵، مقدار خطای استاندارد ۸/۸۵۵ و ضریب استاندارد برابر ۰/۷۹۹ بدست آمده است. با توجه به اینکه مقدار آماره t برابر ۱۵/۰۲۶ بدست آمده و سطح معنی داری (برابر ۰/۰۰) کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری ضریب متغیر سرعت درصد گلوترآلدهید و تاثیر آن بر متغیر زتا پتانسیل را تایید کرد. برای سایر متغیرها نیز چنین نتیجه ای حاصل شده است. نتایج حاصله از تحلیل رگرسیونی متغیرهای موجود در معادله را می توان به صورت استاندارد شده در رابطه ریاضی ذیل نشان داد:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \varepsilon$$

به عبارت دیگر

$$\text{zeta potential} = 0.286(\text{Disolvating}) + 0.090(\text{UseFilter}) - 0.126(\text{PH}) - 0.548(\text{Speed})$$

$$+0.799(\text{gluter aldehyde}) + \varepsilon$$

۲. بنابر مدل رگرسیون (مدل سازی مدل پیش بینی) با کاهش اندازه اثر آنتی باکتریال افزایش می یابد. با توجه به جدول زیر در مدل که عبارت است از فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا و همچنین روش برازش مدل رگرسیونی (Enter) ارائه شده است $P < ۰/۰۵$ بوده و با کاهش اندازه به باکتری استفیلوکوکوس آئروس نیز اثر آنتی باکتریال دارد.

تحلیل رگرسیون (مدلسازی مدل پیش بینی)

فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا با کاهش اندازه اثر آنتی باکتریال افزایش می یابد.

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	سودوموناس آئروژینوزا as ^b	.	Enter
a. Dependent Variable: nanoparticles size			
b. All requested variables entered.			

با توجه به جدول فوق متغیر وارد شده در مدل که عبارت است از فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا و همچنین روش برازش مدل رگرسیونی (Enter) ارائه شده است. در این روش همه متغیرها وارد مدل می شوند و از تمامی اطلاعات وارد شده در تحلیل مدل استفاده می شود. به عبارت دیگر این روش همه رگرسیون های ممکن را در اختیار آماری می گذارد.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	۰/۲۴۶ ^a	۰/۰۶۰	۰/۲۲۳	۴۶۸/۷۶۲
a. Predictors: (Constant): سودوموناس آئروژینوزا				

با توجه به جدول فوق ضریب همبستگی متغیرها برابر ۰/۲۴۶ و مجذور آن یعنی ضریب تبیین برابر ۰/۰۶۰ $R^2 =$ و ضریب تبیین تعدیل شده نیز برابر $R^2 = ۰/۲۲۳$ می باشد. به عبارت دیگر در حالت تعدیل یافته ۰/۲۲۳ درصد از واریانس متغیر اندازه توسط متغیر فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا پیش بینی می شود

ANOVA ^a					
Model	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Regression	۵۴۲۷۶/۲۰۰	۱	۵۸۹۷۶/۲۰۰	۰/۳۶۵	۰/۰۲۴ ^b
Residual	۷۴۴۱۰۹/۳۰۰	۶	۱۵۳۵۰۱/۵۱۴		
Total	۹۶۸۶۳۵/۴۱۰	۷			
a. Dependent Variable: nanoparticle size					
b. Predictors: (Constant), سودوموناس آئروژینوزا					

جدول فوق تحلیل واریانس برازش رگرسیونی را نشان می دهد که در آن مجموع مربعات، میانگین مربعات، درجات آزادی، مقدار آماره F (۰/۳۶۵) و همچنین سطح معنی داری (۰/۰۰۰) نشان داده شده است. با توجه

به اینکه مقدار سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری رگرسیون را استنتاج نمود.

Coefficients ^a					
Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	۴۵۴	۲۱۶/۵۶۵		۲/۰۹۶	۰/۰۳۴
Pseudomonas	۱۳۵/۶۰۰	۲۷۳/۹۳۶	۰/۱۹۸	۰/۴۹۵	۰/۰۱۸

a. Dependent Variable: اندازه نانوذرات

جدول فوق برآورد ضرایب مدل رگرسیونی را نشان می دهد. ضریب رگرسیون برای متغیر فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا برابر ۱۳۵/۶، مقدار خطای استاندارد ۲۷۳/۹۳۶ و ضریب استاندارد برابر ۰/۱۹۸ بدست آمده است. با توجه به اینکه مقدار آماره t برابر ۰/۴۹۵ بدست آمده و سطح معنی داری (برابر ۰/۰۱۸) کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری ضریب متغیر فعالیت آنتی باکتریال سودوموناس آئروژینوزا و تاثیر آن را تایید کرد.

فعالیت آنتی باکتریال استافیلوکوکوس آئروس با کاهش اندازه اثر آنتی باکتریال افزایش می یابد.

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	استافیلوکوکوس آئروس b	.	Enter

a. Dependent Variable: اندازه

b. All requested variables entered.

با توجه به جدول فوق متغیر وارد شده در مدل که عبارت است از فعالیت آنتی باکتریال استافیلوکوکوس آئروس و همچنین روش برازش مدل رگرسیونی (Enter) ارائه شده است. در این روش همه متغیرها وارد مدل می شوند و از تمامی اطلاعات وارد شده در تحلیل مدل استفاده می شود. به عبارت دیگر این روش همه رگرسیون های ممکن را در اختیار محقق می گذارد.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	۰/۱۹۸ ^a	۰/۰۳۹	۰/۱۲۱	۳۷۵/۱۰۲
a. Predictors: (Constant), استافیلوکوکوس آرئوس				

با توجه به جدول فوق ضریب همبستگی متغیرها برابر ۰/۱۹ و مجذور آن یعنی ضریب تبیین برابر ۰/۰۳۹ = R^2 و ضریب تبیین تعدیل شده نیز برابر ۰/۱۲۱ = $\overline{R^2}$ می باشد. به عبارت دیگر در حالت تعدیل یافته ۰/۱۲۱ درصد از واریانس متغیر اندازه توسط متغیر فعالیت آنتی باکتریال استافیلوکوکوس آرئوس پیش بینی می شود.

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	۳۴۴۷۶/۳۰۰	۱	۳۴۴۷۶/۳۰۰	۰/۲۴۵	۰/۰۳۸ ^b
	Residual	۸۴۴۲۰۹/۲۰۰	۶	۱۴۰۷۰۱/۵۳۳		
	Total	۸۷۸۶۵/۵۰۰	۷			
a. Dependent Variable: اندازه نانوذرات						
b. Predictors: (Constant), استافیلوکوکوس آرئوس						

جدول فوق تحلیل واریانس برازش رگرسیونی را نشان می دهد که در آن مجموع مربعات، میانگین مربعات، درجات آزادی، مقدار آماره F (۰/۲۴۵) و همچنین سطح معنی داری (۰/۰۰۰) نشان داده شده است. با توجه به اینکه مقدار سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری رگرسیون را استنتاج نمود.

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	۴۵۴/۰۰۰	۲۱۶/۵۶۵		۲/۰۹۶	/۰۴۱
	Staphylococcus	.۱۳۵/۶۰۰	۲۷۳/۹۳۶	۰/۱۹۸	۰/۴۹۵	۰/۰۱۸
a. Dependent Variable: اندازه نانوذرات						

جدول فوق برآورد ضرایب مدل رگرسیونی را نشان می دهد. ضریب رگرسیون برای متغیر فعالیت آنتی باکتریال استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۱۳۵/۶، مقدار خطای استاندارد ۲۷۳/۹۳۶ و ضریب استاندارد برابر ۰/۱۹۸ بدست آمده است. با توجه به اینکه مقدار آماره t برابر ۰/۴۹۵ بدست آمده و سطح معنی داری (برابر

۰/۰۱۸) کمتر از ۰/۰۵ بدست آمده است می توان معنی داری ضریب متغیر فعالیت آنتی باکتریال استافیلوکوکوس آرنئوس و تاثیر آن را تایید کرد.

فصل پنجم

نتیجه گیری و پیشنهادات

نتیجه گیری

مقایسه بین فاکتورهای ژلاتین ماهی تون زرد باله با فاکتورهای ژلاتین پستانداران در جدول (۵-۱) آمده است. نتایج نشان می دهد که فاکتورهای کیفی در ژلاتین ماهی تون زردباله به ژلاتین پستانداران نزدیک می باشد؛ اما دمای باز شدن و بسته شدن ژلاتین ماهی تون زرد باله با پستانداران اختلاف داشته و این اختلاف به دلیل، تفاوت در اسیدآمین ه های آن بوده و میزان بازده آن برای ژلاتین های استخراج شده از پوست گونه های مختلف در مقالات متفاوت می باشد. در (Jamilah&Harvinder 2002), red tilapia (7.8%), black tilapia (5.4%), young Nile perch (12.3%), adult Nile perch (16.0%) (Muyoga et al.,2004), sin croaker (14.3%), shortfin scad (7.3%) (Cheow et al.,2007), bigeye snapper (6.5%), brown stripe red snapper skins (9.4%) (Jongiaronrak et al,2006). میزان بازده کمتر در ژلاتین ماهی تون زرد باله کمتر از ژلاتین پوست استخراج شده در Nile tilapia و کمتر از Nile perch, adult Nile perch و sin croaker بیشتر از black tilapia, tilapia, red tilapia, shortfin scad, bigeye snapper و stripe brown snapper می باشد. آنچه باعث اختلاف بازده آنها شده به میزان کلاژن مربوط می شود که در پوست موجود است (Muyoga et al., 2004). که باز این اختلاف به سن ماهی و اختلاف در روش های استخراج بستگی دارد.

جدول (۵-۱): اختلاف بین فاکتورهای ماهی تون زرد باله با استاندارد (Gelatin manufactures insutitute of America,2003)

محتوای رطوبت (%)	pH	انواع ژلاتین
۸/۵ درصد	۶/۱	ژلاتین ماهی تون زرد باله
(۸-۱۵) درصد	۷/۵-۵	ژلاتین مواد غذایی استاندارد (روش تهیه قلیایی)
(۸-۱۵) درصد	۶/۵-۵/۳	ژلاتین استاندارد کپسول سخت (روش تهیه قلیایی)
(۸-۱۵) درصد	۶/۵-۵/۳	ژلاتین استاندارد کپسول نرم (روش تهیه قلیایی)

جدول (۵-۲): مقایسه بعضی از فاکتورهای ژلاتین ماهی تون زردباله با ژلاتین پستانداران (استاندارد ملی ایران، ۱۳۷۵).

ژلاتین پستانداران (گاوی)	ژلاتین ماهی تون زرد باله	فاکتورهای کیفی
بی رنگ تا کهربایی	شفاف	رنگ
۷/۴-۵	۶/۱	pH
۲۹-۱۵	۴	دمای بستن (c)
۳۲-۲۷	۴۵	دمای باز شدن (c)
٪(۱۵-۸)	۸/۵	رطوبت(%)

ترکیب اسیدهای آمینه ژلاتین ماهی تون زردباله و خوکی در جدول (۱۵) آمده است. برای هر دو نوع ژلاتین، گلیسین از اجزای اصلی ژلاتین بوده و مقدار آن در ژلاتین پوست تون زرد باله $22/4 \text{ g}/100\text{g}$ ، ژلاتین پوست خوکی $22/4 \text{ g}/100\text{g}$ برمیگردد. در مورد اسیدآمینه آلانین پوست تون زرد باله $9/08 \text{ g}/100\text{g}$ و ژلاتین پوست خوکی $12/55 \text{ g}/100\text{g}$ (Wainwright, 1977) می باشد. نسبت بالای پرولین، هیدروکسی پرولین، گلوتامیک اسید و آرژنین و اسیدآمینه هایی برای هر دو نوع ژلاتین مشاهده شده است. میزان بالای گلیسین منطقی به نظر می رسد. گلیسین برای ساختار سوم پروتین الزامیست و برای ساختار تری پل هلیکس کلاژن لازم است. ظاهراً محتوی اسیدهای آمینه موجود در ژلاتین پوست ماهی تون زرد باله بالاتر از محتوای ژلاتین پوست خوک می باشد (Chew et al., 2007) و همچنین محتوای اسیدهای آمینه گزارش شده در ژلاتین پوست Croaker و Scad به ترتیب $11.8 \text{ g}/100\text{g}$ و $10 \text{ g}/100\text{g}$ می باشد و میزان ژلاتین در پوست گاو (ژلاتین تجاری) $13/7 \text{ g}/100\text{g}$ است. محتوای اسیدآمینه (در ژلاتین پوست ماهی زرد باله) (شامل پرولین و هیدروکسی پرولین می باشد) و از بقیه گونه ها بالاتر بوده و مسئول ثبات دمایی در ساختار تری پل هلیکس کلاژن می باشد و همچنین این اسیدهای آمینه باعث نظم شبکه ژلاتینی می شود. میزان پایین پرولین و هیدروکسی پرولین در ژلاتین ماهی باعث می شود که میزان ژلی شدن آن و دمای ذوب آن کاهش یابد. ساختمان سوپرهلیکس در ژلاتین باید ثابت بماند این ساختمان برای مشخصات ژلاتین بسیار حیاتی بوده و جهت تعادل ساختمان ژلاتین بسیار حائز اهمیت می باشد. این محدودیت ها دو حلقه پیرولیدین از اسیدهای آمینه را تحمل می کند که علاوه بر باندهای هیدروژن بین دو اسیدهای آمینه باقی می ماند (Ledward, 1986). بنابراین آماده سازی ژلاتین با محتوای بالای پرولین، هیدروکسی پرولین و گلیسین، خصوصیات ویسکوزیته بهتری از ژلاتین ارایه می دهد. بنابه جدول (۵-۳).

جدول (۳-۵): مقایسه بین اسیدهای آمینه ژلاتین پوست خوک و گاوی (Wainwright, 1977)، تیلایپا (Songchotikupan et al., 2008) و

ماهی تون زردباله

ژلاتین پوست ماهی تون زردباله g/100g	ژلاتین پوست گاوی g/100g	ژلاتین پوست خوک g/100g	محتوای (پروتئین g/100g) ژلاتین پوست Nile tilapia	اسیدهای آمینه
۹/۸	۷/۷۰	۱۲/۵۵	۱۱/۸۹	آلانین
۷/۰۶	۳/۶۷	۷/۴۳	۸/۷۱	آرژینین
۴/۸۲	۰	۷/۸۴	۸/۲۰	اسیدآسپارتیک
۸/۸۱	۲/۲۳	۸/۴۶	۸/۹۹	اسیدگلوتامیک
۲۲/۴۴	۲۸/۶۷	۲۲/۴۵	۲۱/۱۸	گلیسین
۰/۶۵	۵/۳۹	۰/۲۰	۰/۲۰	هیستیدین
۶/۳۵	۷/۷۷	۹/۴۶	۸/۷۰	هیدروکسی پرولین
۱/۱۸	۰/۱۰۲	۱/۰۶	۰/۸۸	ایزولوسین
۳/۷۷	۳/۵۸	۳/۴۲	۳/۰۲	لیزین
۲/۳۰	۱/۰	۲/۳۲	۲/۱۲	لوسین
۲/۵۹	۲/۸۹	۰/۸۲	۱/۱۳	متیونین
۲/۱۴	۴/۷۴	۱/۶۶	۱/۷۴	فنیل آلانین
۱۹/۶۰	۴/۰۱	۹/۸۰	۸/۸۳	پرولین
۲/۳۸	۲/۹۹	۳/۱۸	۳/۹۶	سربین
۳/۳۸	۴/۸۰	۵/۹۲	۵/۸۲	تریپتین
۰/۴۷	۱/۴۰	۰/۸۱	۰/۶۷	تریپتین
۱/۹	۳/۴۸	۱/۹۸	۱/۶۷	والین

در مورد آنالیز اکتروفورز SDS-Page در مورد ژلاتین ماهیان و پستانداران دارای وزن مولکولی پراکنده هستند و این پراکنش آن‌ها به ساختمان کلاژن و پروسه تولید ژلاتین برمی‌گردد. ژلاتین تولید شده از پوست ماهی تون زردباله شبیه به ژلاتین تجاری گاوی می‌باشد. در هر دوی آن‌ها اجزای α , β , γ با وزن مولکولی یکسان موجود بود. پروسه استخراج می‌تواند بر روی طول زنجیره پلی پپتیدی و همچنین بر روی مشخصات اساسی ژلاتین تأثیر بگذارد. پارامترهای مؤثر در تهیه پروسه ژلاتین، دما و زمان بودند در قبل از آماده‌سازی، مشخصات و روش‌های محافظتی از مواد خام بسیار مهم بودند. آماده‌سازی قلیایی بسیار مناسب برای کمپلکس‌هایی مانند کلاژن می‌باشد به علاوه اولیگومرهای مختلفی از زیر واحدهای آلفا، هیدرولیز نسبی سالم زنجیره‌های آلفا یک ماده مولکولی که دارای وزن بودند مولکولی مخلوط می‌باشد (Schrieber and Gareris, 2007). مقادیر بالای زنجیره‌های β و γ اثرات منفی بر روی بعضی از مشخصات عملکردی ژلاتین ماهی گذاشته است و این اثرات عبارت است از

ویسکوزیته پایین، نقطه ذوب پایین میباشد که دمای بستن و زمان بستن بالا برده است (Cho et al., 2006); (Muyonga et al., 2004). ژلاتین استخراج شده از *Priacanthus macracanthus* و *Priacanthus tayenus* دارای دو زنجیره α_1 و α_2 به عنوان اجزای اصلی ژلاتین شبیه آن می باشد (Benjakul et al., 2008). افزایش میزان زنجیره β (دوتا زنجیره α_1, α_2) دارای پلی پپتیدهای پروتئینی با وزن مولکولی کمتر بوده که به دما و زمان بستگی دارد. تجزیه کامل ژلاتین (در ۱۲۰ دقیقه در ۱۰ درجه سانتی گراد استخراج انجام می شود) که این استخراج از کلاژن به ژلاتین شکل می گیرد. این تغییر فاز از کلاژن به ژلاتین زنجیره های پلی پپتیدی با طول های متفاوتی را پدید آورده است که به خصوص به علت گسستن پیوند کووالانسی در زنجیره ها و شکستگی های نامطلوب از بعضی اتصالات بین زنجیرها می باشد (Muyonga et al., 2004)..

در این پروژه، زنجیره های β و γ دقیقاً شبیه به ژلاتین پستانداران بوده است که همین موضوع مشخصات اساسی ژلاتین پوست ماهی تون زردباله کمک به می کند. برای اینکه تجزیه کامل ژلاتین پوست ماهی تون زردباله صورت گیرد، ژلاتین در ۹ ساعت و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت قرار گرفته است. پراکنش وزن مولکولی Hake و Flat fish که با حضور جزء مهم به نام زنجیره β (با وزن مولکولی بالا) توصیف شده است، همانند ماهی تون زردباله می باشد همچنین گزارشاتی که از پوست ژلاتین ماهیان Salmon Pollock رویت شده است نشان می دهد که آنها از نظر وزن مولکولی زنجیره ها کمتر از ژلاتین خوکی می باشند (Muyonga et al., 2004).

طیف FTIR در مورد ساختمان دوم پروتئین و پلی پپتیدها بحث می کند. این طیف بسیار مهم و با ارزش می باشد. ۹ طیف FTIR در مورد جذب باندها که شامل V, VI, III, II, I, B, A گزارش شده است. که شامل آمید I, باند (1700-1600 cm^{-1}) رویت شده است که بسیار حساس بوده و در مورد ساختار دوم پروتئین بحث می کند باند آمید I به علت لرزش کشش C=O می باشد که در حدود ۸۰ درصد از گروه آمیدی با خمش H-N و C-N کمتر 20% می باشد (Kung and Yu, 2007). آمید II (1575-1480 cm^{-1}) که اصولاً مشتق شده از خمش N-H و لرزش کشش C-N و نشان داده است که حساسیت کمتری را در مورد ساختار پروتئین نسبت به آمید I نشان می دهد در حالی که لرزش باندهای آمیدهای از نظر عملی کمتر در ساختار پروتئین نقش دارند (Kong and Yu, 2007). باندهای آمید I, II در ژلاتین تون ماهی زردباله به ترتیب ۱۶۵۲ cm^{-1} و ۱۵۳۹.۵۹ cm^{-1} مطابق شکل (۱۹) نشان داده است فرکانس های بالا در باندهای آمیدی به کمبود از دست دادن وزن مولکولی نسبت داده می شوند که مربوط به ساختمان تریپل هلیکس بوده که علت آن مستقل از ارتباطات درون مولکولی و شکستن باندهای بین مولکولی

استنباط شده است. هنگامی که ژلاتین در دمای بالاتر یا زمان طولانی‌تر استخراج می‌شود این حالت اتفاق می‌افتد (Kittiphattana *et al.*, 2010) (Ahmad and Benjakul, 2011). آمید III در ژلاتین تون ماهی زردباله در ۱-۱۲۴۲ cm رویت شده است که پیوسته از دست رفتن حالت تریپل هلیکس بوده که در مولکول اتفاق افتاده است. این انتقال از α هلیکس به ساختمان Coil تصادفی بوده یا به بیان دیگر دی‌نچر شدن از کلاژن به ژلاتین می‌باشد (Muyounga *et al.*, 2004). آمید III در ژلاتین 237 cm^{-1} به وسیله Benjakul و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش شده است. باند آمید A که مشتق شده از لرزش خمش از گروه N-H است (Kong and Yu, 2007). در این پروژه کشش باند N-H در طول موج $3303/83\text{ cm}^{-1}$ ثبت شده است. به طور نرمال لرزش کشش N-H باند A در طول موج بین $(3440-3400)\text{ cm}^{-1}$ می‌باشد (Muyounga *et al.*, 2004). هنگامی که گروه N-H از پپتیدهای کوتاه‌تر بوده، باندهای هیدروژنی بیشتری را نشان می‌دهد. البته حالت باندها در آمید A به انتقال فرکانس‌های پایین‌تر می‌گراید. باند آمید A در ژلاتین پوست ماهی تون زردباله به وسیله اسید هیدروکلریدریک در ۲ ساعت به دست آمده است که شامل درگیری بین گروه‌های N-H و به سمت قطعات پپتیدی در باندهای هیدروژنی می‌باشد (Ahmad and benjakul, 2011). باند آمید B مشتق شده از کشش بین N-H و خمش C-H می‌باشد. این باند آمید B با غلظت اسید و با پارامترهای دمایی تغییر می‌کند و پیک آن تحت تأثیر باندهای هیدروژنی ایجاد شده است و در این ژلاتین $2937/38\text{ cm}^{-1}$ گزارش گردیده است.

در این تحقیق نانوذرات ژلاتین از ژلاتین ماهی تون زرد باله تهیه شدند. تا کنون هر نوع ژلاتین تجاری با منشا پستانداران (خوک و گاو) بوده است. این ژلاتین در مقایسه با ژلاتین خوکی حلال می‌باشد همچنین در مقایسه با ژلاتین گاوی دارای میزان اسیدآمینه گلايسين پایین تری بوده و خطر بیماری جنون گاوی را ندارد. تهیه نانوذرات ژلاتین از ژلاتین ماهی تون زرد باله خود از نظر تجاری (در بسته بندی مواد غذایی) میتواند بسیار مفید باشد و شباهتی که این ژلاتین با ویژگی های فیزیکوشیمیایی و رئولوژی ژلاتین پستانداران داشته اهمیت آن را بیشتر میکند.

Vorgelet و همکارانش در سال ۲۰۰۶، نانوذراتی از ژلاتین گاوی -ژلاتین تهیه شده به روش اسیدی -جهت سیستم بارگذاری برای داروهایی که پایه نوکلئوتیدی دارند، به روش دی‌سالویشن دو مرحله ای تهیه کردند. اندازه نانو ذرات بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر بودند و عوامل موثر بر آن دمای مرحله دوم تشکیل نانو ذرات، زمان اضافه کردن استون و میزان اضافه شدن گلوترآلدهید -جهت ثابت ماندن شکل نانوذرات - موثر می‌باشد. در سال ۲۰۰۳، langer و همکارانش نانوذراتی از آلبومین سرم انسانی را با روش سالویشن -در یک مرحله - آماده کردند. محدوده ذرات بین ۱۵۰ تا ۲۸۰ نانو متر به دست آمدند. pH در طول انجام کار و اضافه کردن

گلوترآلدهید - جهت ثابت ماندن شکل نانوذرات - بر روی اندازه نانوذرات موثر بودند. در سال ۲۰۱۳، Azimi و همکاران بر روی تولید نانوذرات ژلاتینی به عنوان سیستم رهایشی (دارو) از سرم آلبومین حیوانی - با روش دومرحله ای سالویشن - استفاده کردند. اندازه ذرات را بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر به دست آوردند. میزان بارگذاری این نانو ذرات ژلاتین در شرایط آزمایشگاهی مشاهده شد و روش دی سالویشن روش خوبی جهت تولید حامل دارو ارزیابی شد. همچنین عوامل معرف دی سالوینگ، استفاده از فیلتر، pH سرعت اضافه کردن استون و درصد گلوتر آلدهید در اندازه ذرات وزتا پتانسیل موثر بودند.

با تایید مطالعات گذشته، نانوذرات ژلاتین با استفاده از روش دی سالویشن تهیه شدند و اندازه نانوذرات آن ۱۳۲ نانومتر به دست آمد. این اندازه از محدوده آخرین یافته ها کمتر میباشد. این اندازه از نانوذرات ژلاتین و زتا پتانسیل (۳۱ میلی ولت) احتمال استفاده آن را به عنوان حامل دارو افزایش میدهد.

مقایسه سنجش فعالیت آنتی باکتریال ژلاتین و نانو ژلاتین نشان دادند که نانو ذرات ژلاتین دارای فعالیت آنتی باکتریال بالاتری نسبت به ژلاتین می باشد. نانو ذرات ژلاتین دارای MIC و MBC پایین تری نسبت به ژلاتین ماهی تون زردباله می باشد نانو ذرات ژلاتین نسبت به آنتی بیوتیک ها دارای مزیت هائی می باشند که مهمترین آنها این است که باکتریها نسبت به نانوذرات مقاومت پیدا نمی کنند زیرا نانو ذرات بر روی قسمت های مختلف و آنزیم های متعددی موثر هستند، زیرا سلول های انسانی به صورت بافت هستند.

Alizade و همکارانش ۲۰۱۳، بر روی اثرات ضد باکتری نانو ذرات نقره بر روی *Brucella melitensis* در مدل جانوری در آزمایشگاه، کار کردند. *Burcellosis* یکی از باکتری ها معمول جانوری در دنیاست که عفونت ایجاد می کند. بروز عفونت بالا در بسیاری از جوامع به خصوص در مدیترانه و در آسیای غرب اتفاق می افتد. بعد از انکوباسیون نانوذرات نقره بر روی باکتری *Burcellosis melitensis* که ۴۰ دقیقه بوده است. اثر باکتری کشی بسیار خوبی علیه این باکتری دارد.

Salem و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر ضد باکتری دونوع از نانوذرات نقره و روی را بر روی دو باکتری اشریشیاکلی و ویبریوکلرلا که باعث اسهال و همچنین در کشورهای جهان سوم سبب مرگ میشوند، مطالعه کردند. طراحی نانوذراتی که به طول ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده و کمترین غلظت بازدارندگی آن را هم بررسی کردند و دریافتند که نانوذرات روی اثرات کمتری بر روی باکتری های مذکور داشته و نانونقره اثرات ضد باکتری بهتری داشته است.

Lifeng در سال ۲۰۰۴، بر روی آماده سازی ذرات نانو کیتوزان و اثرات ضد باکتری آن کار کردند. هدف آن ها ارزیابی اثرات آنتی باکتریال بر علیه میکرو اورگانسیم های متعدد ذرات نانو کیتوزان و نانو ذراتی که مس بر آن

اضافه شده را بررسی کردند. نانو ذرات کیتوزان بر پایه ژلاتین یونی از کیتوزان با آنیون های تری پلی فسفات آماده سازی شده اند. یونهای مس به نانو ذرات کیتوزان جذب می شوند. مشخصات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات با اندازه گیری سایز آن، زتاپتانسیل، نیروی اتمی میکروسکوپی، FTIR آنالیز و زمینه های XRD را تعیین کردند. اثرات آنتی باکتریال نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان و بارگذاری با مس به باکتری های *E-coli*، *S.cholerae*، *S.typhimurium* و *S.aureus* بررسی شد. (MIC) (MBC) را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که غلظت نانوذرات کیتوزان در MIC و MBC ۲/۱. ماکروگرم بر میلی لیتر می باشد و میزان اثرات ضد باکتری آن با اضافه شدن مس به نانوکیتوزان، افزایش میابد.

Guillen و همکاران در سال ۲۰۱۱، بر روی اثرات ضد باکتری و آنتی اکسیدان ژلاتین ماهی تون و اسکویید کار کردند و نتایج آنها نشان داد که از میان باکتری های مورد بررسی بر روی باکتریهای گرم مثبت بوده و همچنین باکتری *Lactobacillus acidophilus* که گرم مثبت بوده و *Bifidobacterium lactis* در روده بزرگ بسیاری از پستانداران و انسان زندگی می کنند و متعلق به باکتری های گرم منفی به *Photobacterium phosphoreum* اثر آنتی باکتریال خود را نشان داده است.

با توجه به نتایج به دست آمده و مطالعات گذشته ژلاتین را به عنوان پایدار کننده استفاده کرده اند. در این تحقیق به صورت اختصاصی بر روی خاصیت ضد باکتری آن بررسی شده و از باکتری هایی استفاده شده که در برابر آنتی بیوتیک ها مقاومت داده اند همچنین بررسی خاصیت ضد باکتری نانو ذراتی از پروتئین (ژلاتین) تهیه شده اند، برخلاف نانو ذرات نقره و طلا، می تواند برای بدن موجودات عوارض جانبی کمتری داشته باشد. ژلاتین خاصیت ضدباکتری پایین تری نسبت به نانو ذرات ژلاتین دارد ($P > 0.05$). با تایید مطالعات گذشته، افزایش خاصیت ضدباکتری به دلیل نانو بودن ژلاتین می باشد همچنین

MIC, MBC نانوذرات ژلاتین کمتر از ژلاتین می باشد. کم بودن MIC, MBC نانوذرات ژلاتین به خصوصیات منحصر به فرد آن می افزاید. همچنین با کوچک تر شدن اندازه نانو ذرات ژلاتین خواص فیزیکی و شیمیایی آن تغییر می کند. خاصیت سطحی آن افزایش یافته و میزان تداخل آن با باکتری ها افزوده میشود

(Ahmadi et al., 2013). این ذرات ریزتر نانوذرات ژلاتین می تواند از غشای باکتری عبور کرده با ایجاد تغییراتی در غشاء سلولی باعث افزایش نفوذپذیری و در نتیجه تخریب غشاء می شوند (Rai et al., 2009). همچنین نقش کریر یا تسهیل کننده را ایفا کند، در نتیجه خاصیت ضد باکتری افزایش میابد به علاوه خواص ضد باکتریایی و عدم ایجاد مقاومت در برابر میکروارگانیسم ها، باعث شده است که این مواد جایگزین خوبی برای آنتی بیوتیک ها به شمار روند. همچنین نانوذرات ژلاتین خاصیت ضد باکتری بالاتری نسبت به ژلاتین دارد و این از خواص

نانو بودن آن می باشد. و این واقعیت برای نانوژلاتین علاوه بر کاربرد احتمالی دارو به آن خاصیت ضد باکتری آن می افزاید.

در جمع بندی نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که برای اولین بار به بررسی در مورد ژلاتین و نانوژلاتین می پردازد، عبارت است: تهیه ژلاتین از یک منبع دریایی، به صورت حلال و ارزان، تهیه شده از ضایعات کارخانه های ماهی تون که خطر اسفنجی شدن را نداشته (به دلیل پایین بودن اسید آمینه هیستیدین) و خطر جنون گاوی را ایجاد نکرده (به دلیل پایین بودن اسید آمینه گلیسین) همچنین دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ژلاتین پستانداران است مناسب جهت بسته بندی مواد غذایی بوده و اندازه ذرات آن ۱۳۲ نانومتر که اندازه آن از گونه های مشابه تهیه شده کوچک تر میباشد. احتمالاً مناسب جهت حامل دارو می باشد. مقایسه سنجش فعالیت آنتی باکتریال ژلاتین و نانو ذرات ژلاتین نشان می دهد که ژلاتین دارای فعالیت آنتی باکتریال علیه باکتری سودوموناس و نانوژلاتین بر علیه سودوموناس و استافیلوکوکوس میباشد. فعالیت آنتی باکتریال نانو ذرات ژلاتین از ژلاتین بالاتر بوده و ذرات نانو ژلاتین دارای خاصیت آنتی باکتریال علیه باکتری سودوموناس میباشد و زمانی که اندازه آن از ۶۵۹ نانومتر کمتر تا ۱۳۲ نانومتر باشد به باکتری استافیلوکوکوس هم خاصیت آنتی باکتریال نشان میدهد. با کاهش اندازه ذرات اثر آنتی باکتریال افزایش می یابد.

پیشنهادهات

*در ادامه این تحقیق میتواند مطالعه برای نانوژلاتین به عنوان حامل دارو را بیشتر پرداخت و بر روی موجودی مانند موش بهره برد و در نهایت با اطمینان بیشتر بر روی انسان اثر آن را امتحان کرد و از اثرات خوب آن استفاده کرد.

*همچنین نانو ذرات ژلاتین به عنوان حامل دارو از اثرات آنتی باکتریال جهت بیماری هایی مانند سل و کلیه بیماری هایی که به مصرف آنتی بیوتیک مقاوم شده اند، بهره برد.

*فورموله کردن دارویی به نام ریفامپسین برای انتقال آئروسول در پودر خشک که برای پایداری پوسته، پراکنش موثر و گسترش رهایش در محل ریه و نیز دارورسانی سیستمی مناسب است و استفاده از این نانو ذرات ژلاتین به عنوان حامل دارو جهت درمان بیماری سل میباشد.

*جهت مشاهده قابلیت تولید ژلاتین، برای سایر گونه های ماهیان تون مانند هور، شبه ماهیان تون مانند شیر تکرار شود.

منابع و ماخذ

منابع فارسی

آبرومند.ع.، ۱۳۸۳. تهیه ژلاتین از ضایعات شیلات، رساله کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱-۱۰۴،

آبرومند.ع.، ۱۳۶۸. بهینه سازی شرایط تولید ژلاتین از ضایعات ماهیان استخوانی استان خوزستان. اولین همایش روش های پیشگیری از اتلاف منابع ملی، تهران. ۱-۱۲۵.

ابدالی، س. و معتمدزادگان، ع.، ۱۳۹۰. کاربرد ژلاتین به عنوان یکی از مهم ترین منابع ژلاتین حلال در دنیا. اولین سمینار ملی امنیت غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه. ۱-۸۴.

اسماعیل زاده کناری و همکاران، ۱۳۹۰. بررسی اثر پیش فراوری بر راندمان و قدرت ژل ژلاتین حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ، مجله الکترونیک فراوری و نگهداری مواد غذایی، جلد ۹، شماره ۴.

آقازاده، م. و ایوبی، الف.، ۱۳۸۹. امکان تولید، کیفیت و عمر ماندگاری اسپرید کم چرب با استفاده از ژلاتین استحصالی از پوست استخوان ماهی کپور نقره ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)، رساله کارشناسی ارشد دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان. ۱۵۲ ص.

پیغمبری، ی. و مشهدی، الف.، ۱۳۸۸. تولید ژلاتین و کلاژن از موجودات دریایی، همایش بین المللی خلیج فارس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر.

دوست محمدی، ی.، ۱۳۹۲، اثرات ضد باکتری نانو ذرات نقره را بر روی برخی از باکتری های عامل عفونت بیمارستانی در شرایط In Vitro و In Vivo. مجموعه مقالات پژوهشی شریف، انتشارات دانشگاه صنعتی شریف. ۵۷ ص.

رجب نیا، م.، ۱۳۹۲. الفبای آنتی بیوتیک. انتشارات علم و دانش. ۲۶۲ ص.

رضایت، م و موسوی، الف، ۱۳۸۵. فارماکولوژی آنتی بیوتیک ها. سازمان چاپ و انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۴۴ ص.

شفیعی، ع و قنبر پور، ع، ۱۳۷۱. مبادی آنتی بیوتیک ها. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۲۰ ص.

کاظمی دلیری، الف، ۱۳۷۳. تهیه ژلاتین از ضایعات حیوانی، مجموعه مقالات پژوهشی شریف، انتشارات دانشگاه صنعتی شریف. ۵۷ ص.

فرحناکی و همکاران، ۱۳۸۸. خصوصیات و کاربردهای هیدروکلوئیدها در مواد غذایی و دارویی، علم کشاورزی ایران. ۱۴۵ ص.

فرهی، ف و همکاران، ۱۳۷۳. ژلاتین مورد مصرف در صنایع غذایی. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۲۰ ص.

قربانزاده، ر. و نظری، س، ۱۳۹۵. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه. واحد آمار. ۶۴ ص.

علوی طلب و همکاران، ۱۳۸۴. بررسی و مقایسه کیفیت ژلاتین اسیدی و قلیایی پوست و باله کپور فیتوفاگ یا منابع دیگر، مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۱۲، ۷۲ ص.

عطایی صالحی و همکاران، ۱۳۹۰. بررسی استخراج ماهی. همایش صنایع غذایی، قوچان، ۱۴۲ ص.

کریم، گ، ۱۳۸۸. بهداشت و فناوری شیر، انتشارات دانشگاه تهران. ۳۵۶ ص.

مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۷. بررسی خصوصیات رئولوژی ژلاتین فیل ماهی، هجدمین کنگره ملی علوم صنایع غذایی مشهد، ۱۳۲ ص.

نبی پور . ۱۳۹۳، بررسی مقایسه‌ای اثرات ضد باکتری نانو ذرات نقره و روی بر روی باکترهای پاتوژن سود و موناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آئوس. مجموعه مقالات پژوهشی شریف، انتشارات دانشگاه صنعتی شریف. ۵۷ص.

منابع انگلیسی

Ahmad, M., & Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monocerus*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. Food Hydrocol. 25(3), 381-388.

Ahmadi, F., Abolghasemi, S., Parhizgar, N., & Moradpour, F,. (2013).Effect of Silver Nanoparticles on Common Bacteria in Hospital Surfaces. Jundishapur journal of microbiology. 6(3), 209-14.

Alizadeh, H., Salouti, M, & Shapouri, R. (2013). Intramacrophage antimicrobial effect of silvernanoparticles against *Brucella melitensis*16M. Scientialranica ., 20(3),1035–1038.

Alyautdin, R., Petrov, V., Langer, K.,Berrthhold ,A.,Kharkevich,D., & Kreuter,J.(1997).Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate, nanoparticles.Elsevier J.14(3),325-364..

Arnesen, J.A & Gildberg, A. (2006).Extraction of muscle properties and gelatin from cod head.Bioresource technology .41(6).22-31.

Arnesen, J.A, and Gillberg, A. (2007).Extraction and charactrisation of gelatin from atlantic salmon (*Salmo salar*).Biosource technology. 98(5).324-333.

Azimi, B., Nourpanah, P., Rabiee, M., & Arabab, S. (2014).Producing gelatin nanoparticles as delivery system for bovine albumin.18(1),34-40.

Benjakul, S., Kijroongrojana, K & Sukkwai, S. (2008). Extraction of gelatin from bigeyesnapper (*Priacanthus tayenus*) skin for gelatin hydrolysate production. *International Food Research Journal*, 18(4), 1129-1135.

Bernas T & Dobrucki J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*. 47(4): 236–42.

Block, B.A., Booth, D.T. & Carey, F.G. (1992). Depth and temperature of the blue marlin, *Makair anigricans*, observed by acoustic telemetry. *Mar. Biol.*, 114(1), 175-183.

Boren, G. & Regenestein, A. (2000). Optimization of gelatin extraction from silver carp skin. *Journal of food science*. 74(5). 99-110.

Burke, C., Hsu, T. & Volkin, D. (1999). Formulation, stability, and delivery live attenuated vaccines for human use. *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 16(7), 1-83.

Chan, W., & Nie, S. (1998). Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *J. Science*. 281(5385), 2016-2018.

Chew, C., Norizah, Z., Kyaw Z & Howell, N. (2007). Gelatin. *Food chemical*. 101(3), 386-391.

Cheng, I.H. (2008). Using fish gelatin and protein to make low-fat spread. *Food hydrocolloids*. 22(2). 88-99.

Cho, S.M. (2006). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food hydrocolloid*. 18(3). 112-119.

Cho, M., Gub, Y. & Kima, S. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 221–229.

Choi, S., & Regenstein, J.(2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 65(7), 194-199.

Coester, C., Langer, K., Vanbriesen, H., & Kreuter, J. (2000).Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake.*Microencapsul.* 17(2), 187-93.

Collette, B.B., McDowell, J& Graves,J. (2006). Phylogeny of recent billfishes (xiphoidei). *Bull. Mar. Sci.* **79**(3), 455-468.

Eastoe, J., & Leach, A.1977.Chemical constitution of gelatin .The science and technology of gelatin. 7(6), 284-295.

Farrugia, C. A. (1998). The formulation of gelatin nanoparticles and their effect on melanoma growth in vivo, Dissertation, Chicago. 12(1).34-42.

Farrugia, C. A. & Groves, M. J. (1999) .Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticulate formulation. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(6), 643-649.

Flory, P. J. & Weaver, E. S. (1960). Helix ↔ coil transitions in dilute aqueous collagen solutions.*Journal of the American chemical society*. 82(7), 4518-4525.

Games, D. (1987). Application of high performance liquid chromatography/mass spectrometry in food chemistry. In Gillbert, J., (ed) *In application of mass spectrometry in food Science*, ElsevierAppl Sci, Publisher.pp.209.

Gallo, J.M., Hung, C.T., & Perrier, D.G.1984. Analysis of albumin microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* 22(1), 63–74.

Gelatin manufactures institute of America, Inc. Standard methods for sampling and testing of gelatin . (2003). GMIA. 271 medison, suite908, New York.

Gimenez, B., Gomez-Guillen, M., & Montero, P. (2005). The role of salt washing of fish skin in chemical and rheological properties of gelatin extracted. Food Hydrocolloids, 19(6), 951-957.

Gómez-Guillén M ,C., López-Caballero ME., Alemán A. López de Lacey A., Giménez, B. & Montero, P.(2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Estelle Le Bihan. 10(5), 89-115.

Gupta, A., Gupta, M., Yarwood,S. & Curtis, A. (2004). Effect of cellular uptake of gelatin nanoparticles on adhesion, morphology and cytoskeleton organization of human fibroblasts.Journal of controlled release. 95(3), 197-207.

Haddar, A., (2011), Physicochemical and functional properties of gelatin from tuna (*Thunnus thynnus*) head bones. Food and agriculture organization of the united nations. 22(10), 302-312.

Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., & Kiwada, H. (1994). Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. Pharm. Res. 11(6), 402-406.

Herpandi, M. Huda, N., & Adzitey, E. (2001). Fish bone and scales apotential source of halal gelatin.Journal of fisheries and aquatic science. 6(5), 226-234.

Heidi,M. (2012). Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles.Journal pharmaceutical nanotechnology. 426(3),193-201

Hiedi, F & Villiers, C. (2009). The immerging field of nanostructures from biological molecules.Journal of nanoparticles research. 12(1).342-354.

Holzer, D. (1996).Gelatin production.us patent.5.

Jain, R., & Stroh, . (2004). Zooming in and out with quantum dots. *J.Nat Biotechnol.* 22(8), 959-60.

Janus, S, Tabor, B & Darlow, R. (1989). The seething of gelatin sols colloids. 77(5). 56-65.

Jamilah, B, and Harvinder, k. (2002). Propertise of gelatin from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77(2), 81-84.

Jakhar, J. (2012). Optimization of Process Parameters for Gelatin Extraction From the Skin of Blackspotted Croaker Using Response Surface Methodology *Food Sci Technol* 51 (11), 3235-3243.

Jongiareonrak, A., Benjakul, S., Vesessanguan, W., Prodpran, T., & Tanaka, M. 2006. Characterization of edible films from skin gelatin of brown stripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocol.* 20(7), 492-501.

Karim, A. & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospect an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 563-576.

Kim, S. & Mendis, E. (2006). Bioactive compound from marine process by product – a review. *Food Research International*, 39(8), 383-393.

Kong, J., & Yu ., S . (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 39(6), 549-559.

Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., Vonbriesen, H., & Begley, D. (2000). Direct evidence that polysorbate -80-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drug to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *J.Pharm.* 20(3), 409-416.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Shahidi, F. (2010). Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of rownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction condition. *Food hydrocolloids*. 24(4), 164-171.

Ledward, D. (1986). Gelatin of gelatin. In Mitchell, J., (ed). *Functional Properties of Food Macromolecules*, Elsevier, London.pp.

Lammli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 225(2), 680-685.

Laemmli, L. (2006). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *The journal of biological chemistry*. 272(5), 568-570.

Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Vonbriesen, H., & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*. 275(1), 169-80.

Lee, C., Mackey, J., Frechet, J., & Szoka, F. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Journal biotechnol*. 23(12), 1517-1526.

Lee, C., Singla, A. & Lee, Y. (2001). Biomedical application of collagen. *International journal of pharmaceutics*, 225(3), 221-22.

Lifeng, L. (2004). Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/Sodium Alginate/Microcrystalline Cellulose Film. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*. 51(7). 2157-2163.

Lin, W., Coombes, A.G.A., Davies, M.C., Davis, S.S., & Illum, L. (1993). Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *J. Drug Target*. 1(2), 237-243.

Marin, L., Xia, X., Qing-shan, S. Shan-shan, D., & You, O. (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. Springer. 42(4), 135-141.

Mei. N., Xuguang, L., Jinming, D., Husheng, J., Liqiao, W., & Bingshe, Xu. (2009). Antibacterial activity of chitosan coated Ag-loaded nano-SiO₂ composites. Springer. 78(1), 54–59.

Mediavilla. J., Patrawalla. A., Chen. L., Chavda. K., Mathema, B., Vinnard. C., Dever. L., & Kreiswirth, B. (2016). Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla_{NDM-5}*, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States. US National Library of Medicine National Institutes of Health Search database. 30; 7(4), 1191-16.

Montero, P. & Gomez-Guillen, M. (2000). Extracting condition for megri (*Lepidorhombus boscii*) skin collagen affect function properties of the result gelatin. Journal of food science, 65(3), 434-438.

Muyonga, J., cole, C., & Duodu, K. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chemistry 86(3), 325-332.

Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., & Kawashima, Y. (1999). Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. J. Pharm. 187(2), 143-152.

Muyonga, J., cole, C., & Duodu, K. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chemical, 86(3), 325-332.

Nagai, T. & Suzuki, N. (2000). Isolation of collagen from fish waste material-skin bone and fins. Food chemistry. 68(5), 222-235.

Nahar, M., Misha, D., Dubey, V., & Kumar, M. (2008). development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B- loaded gelatin nanoparticles. Nanomedicine, nanotechnology, biology and medicine. 4(5), 252-261.

Nelson, J.S. (1994). Fishes of the world. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York. 600 p.

Payon, P., Leblon, L., & Meijer, P. (2007). Gelatin and transitions in biopolymers in the physics of phase transitions. Springer. 12(3), 412-423.

Piez, K. (1997). Characterization of collagen from Cod fishskin. Biochemistry. 4.56-70.

Pollack, S. (1990). Silicone, fibril, and collagen implantation for facial lines and wrinkles. Journal of Dermatology and Surgical oncology, 16(3), 957-961.

Prabha, S., & Labhastwar, V. (2004). Critical determinant in PLGA/PLA nanoparticles-mediated gene expression. J. Pharm. 21(2), 354-364.

Qi, L, Xu, Z, Jiang, X, Hu, C & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Ministry of Education, Hangzhou. 1(6)2693-2700.

Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., & Tan, W. (2001). Biochemically functional silica nanoparticles. J. analyst. 126(8), 1274-1278.

Pavia, L. (2008). Introduction to spectroscopy. Cengage learning. 106 pages.

Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., & Couvreur, P. (1993). Development of a new drug carrier made from alginate. Journal of pharmaceutical sciences, 82(9), 912-917.

Rai, M., Yadav, M., & Gade, A. (2009). Silver Nanoparticles Promote Neuronal Growth. Biotechnology Advances, 27 (2), 76 -83.

Rao, K. (1995). Recent developments of collagen based material for medical applications and drug delivery systems. *Journal of Dermatology and Surgical oncology*, 16(4), 957-961.

Reveles, K., Bryson, M., Moore, R., Hand, E., & Howell, C. (2016). Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Diabetic Foot Infections in a Large Academic Hospital: Implications for Antimicrobial Stewardship. *Plos Journal*. 137(10), 1371-1379.

Romero, E.L., Morilla, M.J., Regts, J., Koning, G.A., & Scherphof, G.L.(1999). On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Lett*. 448(4), 193–199.

Rustad, T. (2003). Utilisation of marine by-product. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(4), 453-463.

Salem, W. Leitner, D, Zingl, F, Schratte, G, Prassl, R, Goessler, W, Reidl, J & Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxic *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology*. 305(1), 85–95.

Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatin hand book*. Weinheim. Wiley, New York, USA.

Sivera, M, Kvitek, L, Panacek, A, Prucek, R. Vecerova, R & Zboril, R. 2015. Antibacterial activity of chitosan coated Ag-loaded nano-SiO₂ composites. *Carbohydrate polymer*. 78(1), 54-59.

Tachon, S. Michelin D, Chambellon E, Cantonnet M, Mezange C, Henno L, Cachon R & Yvon M. (2009). Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology*. 155(9), 2941–2948.

Vorgelet, V, Zwioerek, K & Munchen, K. (2006). Gelatin nanoparticles as delivery system for nucleotide-based drugs. *Elsevier*. 12(4), 216-240.

Wainwright, F. (1977). Physical tests for gelatin products, in: A.G. Ward, A. Courts (Eds.), The science and technology of gelatin,academic press,Newyork,pp.508-531.

Wasswa, J., Tang, J. & Gu, X. (2007).Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. Food Reviews International, 23(3), 159-174.

Wilesmith, J., Ryan, J. & Atkinson, M.(1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. Veterinary Record, 12(1), 199-203.

Wook, Y. & Kim, Y. (2009). Preparation and cytotoxicity comparison of type A gelatin nanoparticles with recombinant human gelatin nanoparticles. Macromolecular research .17(4), 464-468.

Zhang, S., Wang, Y, Herring, J& Oh, H. (2007).Characterization of edible film fabricated with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) extract using pretreatment methods .Journal of food science ,72(4) 498-C503.

Abstract

One of the mainly valuable consumed colloid protein materials in pharmaceuticals, medical and food industries is Gelatin. Fish gelatin near warm water is similar mammal gelatin. Due to the amount of catch of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) use in factory. Fish skin are peel off and wasted in factory every day. Analysis factors were extracted alkaline method gelatin from skin, physiochemical and rheological test (amino acid composition (HPLC), electrophoreses, fourier transform infrared, moisture content, pH, setting point, setting time, melting point and melting time, color and gelatin yield) with access method of National Iran Standard. Prepared gelatin nanoparticles from gelatin with desolvation method. Determination of particles size, size distribution, zeta potential for characterize the surface and morphology. Antibacterial assay with disc diffusion method and determined MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. For nanoparticles gelatin antibacterial assay (MIC and MBC) turbidimetry. Statistical processing were linear regression and modeling and forecasting regression. Albeit antibacterial compared gelatin and gelatin nanoparticles. It produced 0.034g gelatin for one gram of yellowfin tuna. Yellowfin tuna had higher gelatin content (Proline and Hydroxyproline) than mammalian gelatin content. SDS-electrophoresis for yellow fin gelatin showed protein band (α , β , γ) same as mammalian protein band. Fourier transform infrared had the same spectra for both of them. Factors were pH (6.1), Moisture (8.5%) Setting temperature and time respectively 4(c) and 60(s) and Melting temperature and time respectively were 50(c) and 45(s). The color was transparent. The mean size of the gelatin nanoparticles was 132 nm and PI (polydispersity) and zeta potential were respectively 0.248, -31 MV. pH, speed of addition of acetone, percent of glutaraldehyde depends on size of nanoparticles gelatin. (Statistically significant was $P < 0.05$). Gelatin nanoparticles had antibacterial in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* while gelatin had antibacterial *Pseudomonas aeruginosa*. Nanoparticle gelatin had higher MIC and MBC than gelatin. Statistically significant was $P < 0.05$. Antibacterial assay for gelatin particles has evaluated for foodstuffs packing and it may using drug delivery. This kind of gelatin is lawand similar mammalian gelatin. Antibacterial properties is more useful for usage in foodstuffs packing and may using drug delivery.

Key word: *Thunnus albacares*- Yellowfin tuna-Gelatin- Gelatin nanoparticle- MIC- MBC- Desolvation.



ISLAMIC AZAD UNIVERSITY

SCIENCE AND RESEARCH BRANCH

Faculty of Marine science and Technology Department of Marine Biology

Ph.D Thesis marine biology

Subject:

The study of antibacterial nanoparticles obtained from yellowfin tuna
(*Thunnus albacares*)

Thesis Advisor:

SH. Jamili Ph.D

M. Rezayat Ph.D

Consulting Advisor:

H. Atar Ph.D

F. Kymarama Ph.D

By:

Homa.Sadeghi

Summer 2016

