معدنی زدایی و استیل شیمیایی ضایعات میگوی موزی (*Penaeus merguiensis*) به‌منظور استخراج کیتین و کی توسان

فاطمه صداقت[۱]
مرتضی یوسف زادی[۲*]
حجت تویسرکانی[۳]
سهراب نجفی پور[۴]

۱. کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲. دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۳. دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۴. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، ایران

***مسئول مکاتبات:**
Morteza110110@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۴۰۴۰۳۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۵
این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده
مطالعه حاضر باهدف تعیین روش مناسب جهت استخراج کیتین و کی‌توسان از ضایعات میگوی موزی (*Penaeus merguiensis*) انجام گرفت. در این راستا، از پنج روش پیش تیمار اسید استیک، استخراج با اسید و باز، رنگدانه‌زدایی با اتانول، رنگدانه‌زدایی با اتانول- استون و پیش تیمار دما جهت پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات، به‌منظور استخراج کیتین استفاده شد. حذف پروتئین و مواد معدنی با استفاده از محلول‌های سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید در غلظت‌های مختلف صورت پذیرفت. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین زدایی و معدنی زدایی در روش‌های مختلف نشان داد، به‌طوری‌که روش رنگدانه‌زدایی با اتانول (استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۸۴ مولار، سدیم هیدروکسید ۲/۵ مولار و اتانول)، با ۹۵ درصد حذف مواد معدنی و ۹۶ درصد حذف مواد پروتئینی به‌عنوان روش بهینه تعیین شد. در ادامه، تولید کیتوسان از طریق استیل‌زدایی کیتین صورت گرفت که از سه روش گرمادهی با تابش‌دهی ماکروویو، اتوکلاو و روش گرمادهی حرارتی تحت شرایط تقطیر برگشتی (رفلاکس)، برای این منظور استفاده شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، از بین روش‌های موردمطالعه، روش اتوکلاو با بازده تولید ۸۶ درصد، به‌عنوان روش بهینه جهت استخراج کی توسان تعیین گردید.

واژگان کلیدی: ضایعات میگو، روش اتوکلاو، روش مایکروویو، کیتین، کیتوسان.

مقدمه

کیتین بانام علمی پلی {β- (۴،۱)- ۲- استامیدو ۲- داکسی- D- گلوکوپیرانوز}، یکی از فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای تجدید پذیر در طبیعت است که به‌طور برجسته در پوسته سخت‌پوستان، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود. این پلیمر ازنظر ساختار مولکولی، حلالیت

Archive of SID
www.SID.ir

محدود و میل کم به ترکیب شیمیایی، شبیه به سلولز است، با این تفاوت که در موقعیت کربن شماره دو آن به‌جای گروه هیدروکسیل، گروه استامید قرارگرفته است (Taghizadeh *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2009) (شکل ۱).

نخستین اکتشاف کیتین در قارچ‌ها و در سال ۱۸۱۱ توسط Henri Bracannot، گیاه‌شناس فرانسوی، انجام پذیرفت. سپس در سال ۱۸۲۳ از حشرات استخراج شد و در این زمان، یک دانشمند فرانسوی بنام Odier آن را کیتین نامید که معنی لغوی آن در زبان یونانی نیام است. کیتین در حالت‌جامد به سه شکل آلفا، بتا و گاما وجود دارد (Aranaz *et al.*,2009). جهت‌گیری متفاوت زنجیره‌های پلیمری باعث بروز چنین اختلافی در کیتین‌ها شده است. گروه‌های استیل با ایجاد پیوند هیدروژنی درون زنجیره‌ای و برون زنجیره‌ای بین گروه‌های استیل کربن شماره دو و گروه‌های هیدرو کسی موجود در پلیمر، نقش مهمی در این شکل‌گیری ایفا می‌کنند (Khor, 2001, Pillai *et al.*, 2009).

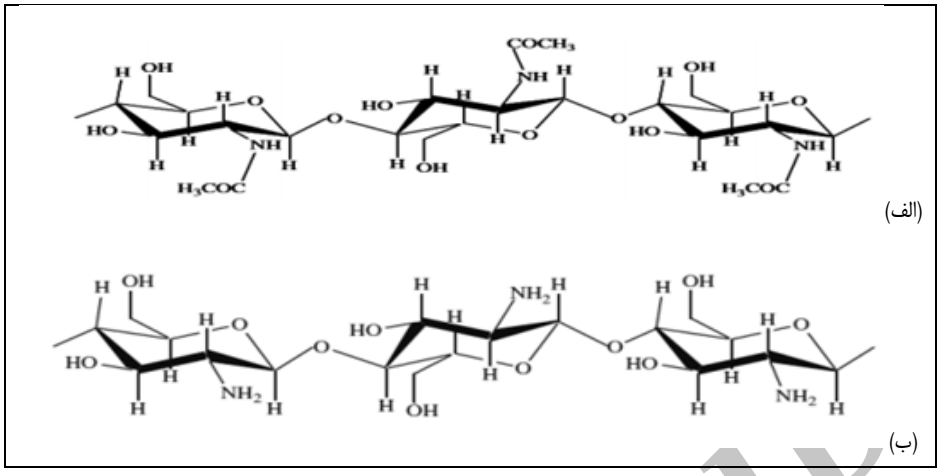
منابع عمده کیتین، پوسته سخت‌پوستان دریایی به‌ویژه خرچنگ، میگو و کریل است (Oh *et al.*, 2007). میگوی موزی (*Penaeus merguiensis*)، یکی از گونه‌های مهم در آب‌های خلیج‌فارس و دریای عمان است و هرساله و در طول فصل صید میگو در استان هرمزگان، ازلحاظ میزان صید، رتبه اول را به خود اختصاص می‌دهد. با توجه به افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی در سال‌های اخیر، میزان استفاده غذایی از آبزیان و به‌ویژه میگو بسیار زیاد شده است. این مسئله موجب افزایش تولید قسمت‌های غیرخوراکی مانند سر، دم و پوسته می‌گردد که در صورت باقی ماندن به مقدار زیاد در طبیعت، می‌توانند مشکلات زیست‌محیطی فراوانی ایجاد کنند. درنتیجه، استفاده از این ضایعات نه‌تنها می‌تواند راه‌حلی در برابر مشکلات زیست‌محیطی باشد، بلکه به‌عنوان منبعی برای تهیه ماده باارزش کیتین نیز محسوب می‌شود (غیاث‌الدین و همکاران، ۱۳۹۰). به همین دلیل، توجه پژوهشگران برای تولید کیتین به استفاده از این ضایعات جلب شده و تاکنون مطالعات بسیاری در این زمینه انجام‌گرفته است (Synowiecki *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008).

مهم‌ترین و پرکاربردترین مشتق به‌دست‌آمده از کیتین، کی توسان نام دارد که از استیل‌زدایی (هیدرولیز گروه‌های عاملی استامید) جزئی کیتین حاصل می‌شود. کی توسان در هر حلقه گلوکز، دارای یک گروه آمین آزاد و دو گروه هیدروکسی آزاد است (Vengupal, 2009) (شکل ۱). به‌طور قراردادی وجود ۵۰ درصد گروه‌های آمیدی، به‌عنوان مرز بین کیتین و کی توسان در نظر گرفته می‌شود؛ یعنی پلیمری با درجه استیل زدایی کم‌تر از ۵۰ درصد را کیتین و درجه استیل زدایی بیش‌تر از ۵۰ درصد را کی توسان می‌نامند (تقی زاده و همکاران، ۱۳۸۳).

کیتین و کی توسان توجه زیادی را به‌خصوص درزمینه‌ی صنایع پزشکی و دارویی به خود جلب کرده‌اند، از مهم‌ترین خصوصیاتی که آن‌ها را مناسب این کاربردها کرده است می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست‌تخریب‌پذیری و غیر سمی بودن آن‌ها اشاره کرد. علاوه بر این موارد، خصوصیات بیولوژیکی چون ضد سرطان، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، کاهش‌دهنده التهاب و درد و ... آن‌ها را از دیگر پلیمرهای زیستی متمایز کرده است (Koide, 1998; Kumar *et al.*, 2004).

روش‌های مختلفی برای استخراج کیتین از ضایعات سخت‌پوستان در طول سال‌ها توسعه پیداکرده است که برخی از آن‌ها اساس فرآیندهای شیمیایی استفاده‌شده برای تولید صنعتی کیتین و مشتقاتش را تشکیل می‌دهند (Kim *et al.*, 2001). رایج‌ترین روش که به‌عنوان روش شیمیایی شناخته می‌شود، شامل دو مرحله اساسی پروتئین زدایی و معدنی زدایی است که به‌وسیله اسیدها و بازهای قوی صورت می‌گیرد. هدف از این مطالعه در گام نخست، به دست آوردن میزان بهینه غلظت اسید و باز جهت معدنی زدایی و پروتئین زدایی ضایعات میگوی موزی (*P. merguiensis*) به‌منظور استخراج کیتین و سپس ارزیابی روش‌های تهیه کی توسان از کیتین حاصل است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: ساختار شیمیایی کیتین (الف) و کی توسان (ب).

مواد و روش‌ها

تمامی مواد مورداستفاده در این تحقیق از قبیل اتانول (۹۶ درصد)، هیدروکلریک اسید (۳۷ درصد)، استون، استیک اسید (۹۹ درصد) و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

ضایعات میگوی موزی (*P. merguiensis*) به‌صورت تازه از مرکز خرید میگو در هرمزگان- بندرعباس خریداری و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. از ضایعات کارا پاس، به‌عنوان نمونه استفاده گردید. پس از شستشوی اولیه‌ی پوسته‌ها با آب مقطر، از دو تیمار دمایی ۶۰ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به‌منظور خروج بیش‌تر ضایعات گوشت و بقایای پروتئینی، استفاده شد. بعد از خشک شدن در آون، پوسته‌ها با استفاده از آسیاب برقی کاملاً پودر شده و جهت استخراج کیتین آماده گردید.

پروتئین زدایی و معدنی زدایی ضایعات به‌منظور استخراج کیتین، به پنج روش مختلف انجام گرفت:

روش اول- پیش تیمار اسید استیک: پودر پوسته میگو (شستشو با آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، در ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک ۰/۰۵ مولار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت قرار داده شد. جهت حذف ترکیبات معدنی از اسیدکلریدریک ۰/۶۸ مولار و جهت حذف ترکیبات پروتئینی از سدیم هیدروکسید ۰/۶۲ مولار استفاده گردید. ماده حاصل در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۲۴ ساعت) خشک و وزن آن اندازه‌گیری شد (Toan *et al.*, 2006).

روش دوم- استخراج با اسید و باز: به پودر حاصل (شستشو با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد)، اسیدکلریدریک ۰/۱۲ مولار اضافه شد و بعد از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر، محلول سدیم هیدروکسید ۱/۲۵ مولار اضافه گردید. سپس نمونه با آب شستشو و در آون خشک شد (Mohammed *et al.*, 2013).

روش سوم- رنگدانه‌زدایی با اتانول: پودر حاصل (شستشو با آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، با اسیدکلریدریک ۰/۸۴ مولار تیمار شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از فیلتر کردن با کاغذ صافی، سدیم هیدروکسید ۲/۵ مولار اضافه گردید. سپس ۵۰ میلی‌لیتر اتانول جهت خروج مواد محلول در اتانول اضافه شد و به‌منظور خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Du *et al.*, 2008).

Archive of SID
www.SID.ir

روش چهارم- رنگدانه‌زدایی با اتانول- استون: از اسیدکلریدریک ۰/۲۵ مولار جهت معدنی زدایی و از سدیم هیدروکسید یک مولار جهت پروتئین زدایی پوسته‌ها (شستشو داده‌شده با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده گردید. سپس ۵۰ میلی‌لیتر اتانول گرم اضافه‌شده و جهت خروج ناخالصی‌ها، نمونه حاصل در استون (۳۰ میلی‌لیتر) جوشانده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک و کیتین حاصل گردید (Sagheer *et al.*, 2009).

روش پنجم- پیش تیمار دما: پوسته‌های میگو (شستشو با آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از شستشو و آسیاب کردن پوسته‌ها، به پودر حاصل اسیدکلریدریک ۰/۶۸ مولار اضافه گردید. بقایا شسته شده و بعد از ۸- ۶ ساعت غوطه‌ور شدن در آب، به آن سدیم هیدروکسید ۰/۶۲ مولار اضافه شد. سپس نمونه حاصل در آون خشک و کیتین به دست آمد (Toan *et al.*, 2006).

در تمامی روش‌های به کار گرفته‌شده، از ۳ گرم پودر پوسته میگو، ۳۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید و ۲۴ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید استفاده گردید. پوسته میگو شستشو داده‌شده با آب ۶۰ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد نیز به‌عنوان شاهد در این آزمایش‌ها استفاده شد.

فرآیند استیل زدایی کیتین به‌منظور استخراج کی توسان، به سه روش صورت پذیرفت:

روش گرماده‌ی حرارتی تحت شرایط تقطیر برگشتی (رفلاکس): در این روش به نمونه کیتین، سدیم هیدروکسید ۵۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب (WiseBath، کره جنوبی) قرار گرفت (Mohammed *et al.*, 2013).

روش اتوکلاو: سدیم هیدروکسید ۵۰ درصد به نمونه اضافه‌شده و تحت شرایط دمایی ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو (Kavoosh AV25، ایران) گردید (Hong *et al.*, 2000).

روش گرماده‌ی با تابش‌دهی مایکروویو: استخراج کی توسان با این روش، مطابق با روش Samar و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییر صورت گرفت. بدین‌صورت که به نمونه کیتین، سدیم هیدروکسید ۵۰ درصد اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰ وات در مایکروویو (LG MC-3021 WMR، کره جنوبی) قرار گرفت (وزن نمونه کیتین و حجم سدیم هیدروکسید مورداستفاده در تمامی آزمایش‌ها ثابت و به ترتیب شامل ۵ گرم و ۶۰ میلی‌لیتر است).

وزن خشک نمونه باقیمانده، بعد از قرار دادن نمونه در آون (Memmert UNB 400، آلمان) ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، محاسبه گردید (Jung *et al.*, 2007). برای تعیین درصد خاکستر، یک گرم نمونه (کیتین و پودر خام اولیه) به بوته چینی منتقل و در کوره‌ای (F21L - 1500، ایران) به دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت گرما داده شد (A.O.A.C, 1990). درنهایت، درصد خاکستر از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{خاکستر (٪)} = (\text{وزن خاکستر}) / (\text{وزن نمونه اولیه}) \times ۱۰۰$$

به‌منظور سنجش محتوی پروتئین نمونه (کیتین و پوسته‌ی میگو)، به نمونه (۰/۰۵ گرم)، سدیم هیدروکسید ۵ درصد اضافه شد (۱۰ میلی‌لیتر) و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Setoguchi *et al.*, 2012)، سپس در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی برای سنجش پروتئین با استفاده از روش برادفورد استفاده گردید (Bradford, 1976). میزان پروتئین با سرم آلبومین گاوی مقایسه شد.

به‌منظور محاسبه درصد معدنی زدایی و پروتئین زدایی (Y)، از فرمول زیر استفاده گردید:

$$Y(\%) = \frac{[(X_O \times S_O) - (X_R \times S_R)]}{(X_O \times S_R)} \times 100$$

Archive of SID
www.SID.ir

که X_O وX_R به ترتیب مقدار پروتئین یا خاکستر (گرم/ گرم)، قبل و بعد از تیمار و SO و S_R مقدار نمونه اولیه و نمونه باقیمانده (گرم) بعد از تیمار می‌باشند (Pacheco *et al.*, 2009).

در ادامه، گروه‌های عاملی پودر خشک‌شده نمونه‌ی کی توسان توسط آنالیز FT-IR تعیین گردید. در این آزمایش، پودر خشک‌شده کی توسان با KBr با نسبت ۱ به ۳۰۰ مخلوط و تحت‌فشار به قرص تبدیل شد و طیف FT-IR با اسکن در محدوده ۵۰۰ و ۴۰۰ بر سانتی‌متر حاصل گردید. نهایتاً، تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش نوزدهم و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۹۵ درصد صورت گرفت. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۰) استفاده شد.

نتایج

در جدول ۱، خصوصیات ماده خام اولیه و کیتین حاصل از روش‌های شیمیایی مختلف نشان داده‌شده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده، بیش‌ترین میزان وزن خشک در نمونه شاهد مشاهده گردید. مقایسه میزان پروتئین و خاکستر در نمونه‌های حاصل از روش‌های اول، سوم و پنجم با نمونه شاهد ۱، بیش‌ترین میزان این پارامترها را در نمونه شاهد و کم‌ترین میزان را در نمونه حاصل از روش سوم نشان داد. میزان این پارامترها در نمونه‌های حاصل از روش‌های دوم و چهارم نیز بررسی و با نمونه شاهد ۲ مقایسه گردید. نتایج حاصل از این مقایسه، بیش‌ترین میزان خاکستر و پروتئین را در نمونه شاهد نشان داد و در نمونه‌های حاصل از روش‌های دوم و چهارم به ترتیب کم‌ترین میزان پروتئین و خاکستر مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل به‌طورکلی، اختلاف معنی‌داری بین میزان وزن خشک، پروتئین و خاکستر در نمونه‌های حاصل از روش‌های مختلف به کار گرفته‌شده در این مطالعه مشاهده گردید ($P< ۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین وزن خشک، خاکستر و پروتئین در نمونه‌های حاصل از روش‌های پیش تیمار اسید استیک (روش اول)، استخراج با اسید و باز (روش دوم)، رنگدانه‌زدایی با اتانول (روش سوم)، رنگدانه‌زدایی با اتانول- استون (روش چهارم)، پیش تیمار دما (روش پنجم) و شاهد.

تیمار	وزن خشک (گرم)	خاکستر (درصد)	پروتئین (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)
شاهد ۱*	۳/۱۱ ± ۰/۰۳ ^{a}	۶۶ ± ۰/۰۱ ^{a}	۱/۲ ± ۰/۰۳ ^{a}
روش اول	۱/۳۰ ± ۰/۱۱ ^{c}	۱۸ ± ۰/۰۱ ^{c}	۰/۶۴ ± ۰/۰۱ ^{b}
روش سوم	۰/۸۳ ± ۰/۰۲ ^{d}	۱۰ ± ۰/۰۲ ^{d}	۰/۱۶ ± ۰/۰۲ ^{d}
روش پنجم	۱/۸۳ ± ۰/۰۴ ^{b}	۳۱ ± ۰/۰۱ ^{b}	۰/۲۹ ± ۰/۰۲ ^{c}
شاهد ۲**	-	۴۰ ± ۰/ ۰۱ ^{a}	۰/۸۱ ± ۰/۰۴ ^{a}
روش دوم	۱/۷۴ ± ۰/۰۷ ^{b}	۳۷ ± ۰/۰۱ ^{b}	۰/۱۱ ± ۰/۰۵ ^{c}
روش چهارم	۱/۲۵ ± ۰/۰۱ ^{c}	۳۴ ± ۰/۰۱ ^{c}	۰/۱۶ ± ۰/۰۱ ^{b}

حروف یکسان، عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

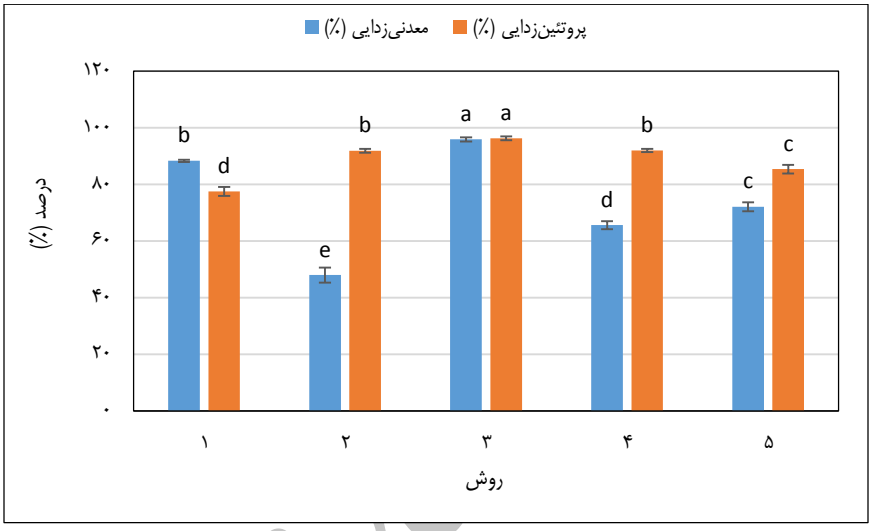
* پوسته‌ی شستشو داده‌شده با آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد

** پوسته‌ی شستشو داده‌شده با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده‌شده است در تمامی روش‌های به کار گرفته‌شده جهت استخراج کیتین، خروج مواد معدنی و پروتئینی به میزان قابل‌توجهی مشاهده گردید. در بین روش‌های به کار گرفته‌شده، نمونه حاصل از روش سوم (استفاده از ماکزیمم مقدار اسید و باز جهت استخراج

Archive of SID
www.SID.ir

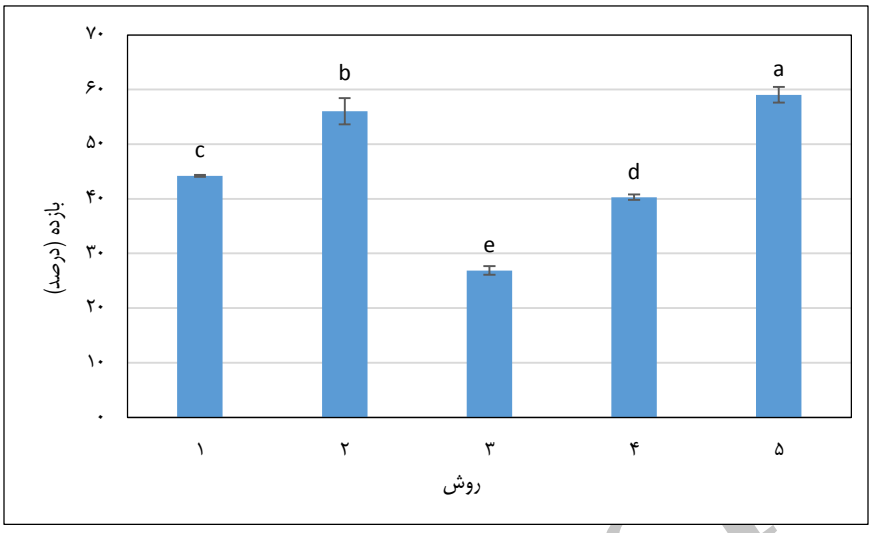
کیتین)، با ۹۵/۹ درصد معدنی زدایی و ۹۶/۳۱ درصد پروتئین زدایی، بیش‌ترین میزان این پارامترها را نشان داد. در نمونه‌های حاصل از روش‌های دوم و چهارم نیز خروج پروتئین به میزان قابل‌توجهی رسید که ازنظر شاخص‌های آماری اختلاف معنی‌داری بین میزان پروتئین زدایی در این دو روش مشاهده نگردید. نتایج همچنین نشان داد که نمونه‌های حاصل از روش‌های اول و دوم، به ترتیب کم‌ترین میزان پروتئین زدایی و معدنی زدایی را دارا می‌باشند. به‌طورکلی نتایج آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین میزان این دو پارامتر در نمونه‌های حاصل از روش‌های شیمیایی مختلف نشان داد ($P< ۰/۰۵$).



شکل ۲: درصد معدنی زدایی و پروتئین‌زدایی در نمونه‌های حاصل از روش‌های پیش تیمار استیک اسید (۱)، استخراج با اسید و باز (۲)، رنگدانه‌زدایی با اتانول (۳)، رنگدانه‌زدایی با اتانول – استون (٤) و پیش تیمار دما (۵) جهت استخراج کیتین. حروف یکسان، عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ی حاضر، روش‌های شیمیایی به کار گرفته‌شده جهت استخراج کیتین، ازنظر بازده تولید نیز مورد مقایسه قرار گرفتند. شکل ۳ به ارائه نتایج حاصل از مقایسه این پارامتر در روش‌های مختلف می‌پردازد. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید؛ بازده تولید کیتین در روش‌های پنجم و سوم، به ترتیب با ۵۹/۰۵ درصد و ۲۶/۸۹ درصد تولید، به حداکثر و حداقل مقدار خود رسید. ازنظر آماری نیز در حالت کلی، اختلاف معنی‌داری بین بازده تولید در روش‌های مختلف مشاهده گردید ($P< ۰/۰۵$).

Archive
www.SID.ir



شکل ۳: بازده تولیدکیتین در روش‌های پیش تیمار استیک اسید (۱)،، استخراج با اسید و باز (۲)، رنگدانه‌زدایی با اتانول (۳)، رنگدانه‌زدایی با اتانول – استون (٤) و پیش تیمار دما (۵). حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

بنابراین، طبق نتایج به‌دست‌آمده، از بین ۵ روش شیمیایی به کار گرفته‌شده جهت استخراج کیتین، روش سوم با بالاترین درصد حذف مواد معدنی و پروتئینی، منجر به تولید کیتینی با خلوص بیش‌تر و روش پنجم منجر به تولید ماکزیمم مقدار کیتین گردید.

نتایج حاصل از بررسی بازده تولید کی توسان با روش‌های مختلف نیز، در جدول ۲ آورده شده است. همان‌طور که از نتایج برمی‌آید؛ در بین روش‌های مورد آزمایش، روش اتوکلاو و روش مایکروویو به ترتیب با ۸۷ درصد و ۴۳ درصد، دارای بیش‌ترین و کم‌ترین بازده تولید کی توسان می‌باشند. در حالت کلی نیز در نتایج حاصل از مقایسه بازده تولید کی توسان در روش‌های مختلف به کار گرفته‌شده در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P< ۰/۰۵$).

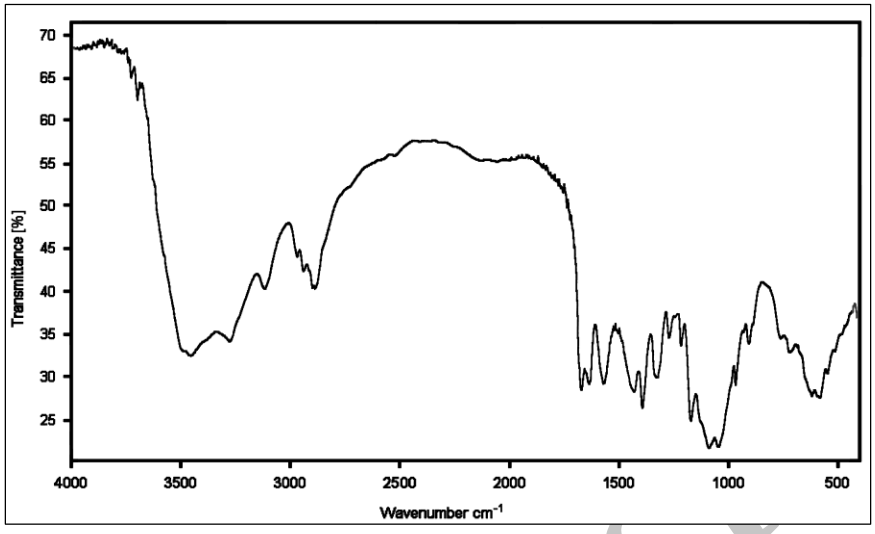
جدول ۲: بازده کی توسان حاصل از روش‌های گرماده‌ی حرارتی، اتوکلاو و مایکروویو.

روش	بازده (درصد)
گرماده‌ی حرارتی	۷۶/۵۳ ± ۲/۶۹^{b}
اتوکلاو	۸۷/۶۹ ± ۱/۵۴^{a}
ماکروویو	۴۳/۸۴ ± ۲/۳۱^{c}

حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

شکل ۴ طیف FT-IR کی توسان را نشان می‌دهد. در طیف کی توسان پیک‌های در محدوده ۳۲۰۰- ۳۴۰۰ ترکیبی از پیک‌های مربوط به گروه‌های کششی O-H و پیوندهای درون‌مولکولی هیدروژنی‌اند و پیک ۱۶۵۴ در کی توسان مربوط به گروه‌های NH_2 -CO- R است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤: آنالیز FT-IR کی توسان.

بحث و نتیجه‌گیری

بیوپلیمر کاتیونی کیتین، به‌طور مؤثری می‌تواند به‌وسیله خروج پروتئین، مواد معدنی و ترکیبات با وزن مولکولی پایین، با استفاده از اسید و باز قوی از ضایعات میگو استخراج شود (Toan *et al.*, 2006). در فرآیند صنعتی استخراج کیتین، به دلیل وجود ملاحظات اقتصادی، بهترین مواد استخراج‌کننده املاح و پروتئین، هیدروکلریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH) می‌باشند (غیاث‌الدین و همکاران، ۱۳۹۰)؛ به همین دلیل در مطالعه‌ی حاضر، از این دو ماده در غلظت‌های مختلف جهت استخراج کیتین از ضایعات استفاده گردید. در مرحله‌ی اول به‌منظور بررسی اثر دما، پوسته‌ها بعد از شستشوی اولیه، به مدت یک ساعت در دو دمای متفاوت (۶۰ و ۹۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. نتایج حاصل از سنجش میزان خاکستر و پروتئین نشان داد که میزان این پارامترها در پوسته‌ی شستشو داده‌شده با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به میزان قابل‌توجهی کم‌تر است (جدول ۱)؛ که این نتایج با نتایج مطالعه Mohammed و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد.

در مطالعه‌ی پیش رو مشاهده شد که غلظت باز نقش مهمی در خروج پروتئین از ضایعات ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت سدیم هیدروکسید از ۲/۵-۰/۶۲ مولار، میزان پروتئین زدایی از ۷۷ درصد به ۹۶ درصد افزایش یافت (شکل ۱). Benhabiles و همکاران (۲۰۱۲) نیز به بازده‌ای مشابه (۹۶ درصد) در پروتئین زدایی ضایعات میگو با استفاده از سدیم هیدروکسید دست یافتند. در مطالعه حاضر، همچنین مشاهده شد که درروش پیش تیمار اسید استیک و پیش تیمار دما با غلظت‌های یکسان سدیم هیدروکسید، پروتئین زدایی به میزان قابل‌توجهی متفاوت است (شکل ۲)؛ که این احتمالاً به این دلیل است که قرار دادن پوسته‌ها در دمای محیط به مدت ۴۸ ساعت و فاسدشدن آن‌ها قبل از تیمار اصلی (روش پیش تیمار دما)، باعث تجزیه‌ی بخش قابل‌توجهی از پروتئین‌های موجود در پوسته که با شستشو قابل جداسازی است، می‌شود. نتایج مطالعه Toan و همکاران (۲۰۰۶) نیز مؤید این واقعیت است.

در مرحله املاح، هدف جداسازی نمک‌ها و املاح معدنی پوسته‌ی سخت‌پوستان است. تیمار اسیدی با هیدروکلریک اسید، منجر به خروج این نمک‌ها که ترکیباتی از فسفات و کلسیم هستند، می‌گردد. درواقع، این تیمار منجر به تبدیل کلسیم کربنات نامحلول به کلسیم کلراید محلول می‌شود که از طریق شستشو می‌تواند از محیط حذف گردد. طبق نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط مستقیمی بین غلظت هیدروکلریک

Archive of SID
www.SID.ir

اسید و میزان معدنی زدایی مشاهده گردید؛ به‌طوری‌که در غلظت ۰/۸۴ مولار هیدروکلریک اسید (روش رنگدانه‌زدایی با اتانول)، بیش‌ترین میزان معدنی زدایی و در غلظت ۰/۱۲ مولار (روش استخراج با اسید و باز) کم‌ترین میزان این پارامتر حاصل گردید (شکل ۲). در مطالعه‌ای که توسط Benhabiels و همکاران (۲۰۱۲)، انجام گرفت با افزایش غلظت هیدروکلریک اسید از ۱/۵- ۰/۲۵ مولار، میزان معدنی زدایی افزایش یافت اما غلظت ۲ مولار هیدروکلریک اسید، ازنظر میزان این پارامتر اختلاف معنی‌داری با غلظت ۱/۵ مولار نشان نداد.

در مطالعه‌ی پیش رو تیمار پوسته‌ها با اسید استیک قبل از تیمار اصلی، اثر قابل‌توجهی بر خروج مواد معدنی نشان داد؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های یکسان هیدروکلریک اسید درروش پیش تیمار اسید استیک (اول) و پیش تیمار دما (پنجم)، میزان معدنی زدایی درروش اول به ۸۸ درصد رسید که به‌طور قابل‌توجهی میزان این پارامتر را درروش پنجم (۷۲ درصد) بهبود بخشید (شکل ۲). این احتمالاً به این دلیل است که اسید استیک موجب سست شدن کمپلکس پروتئین- کیتین- کلسیم موجود در پوسته و رها شدن ترکیبات غیرکیتینی شده و درنتیجه دسترسی هیدروکلریک اسید به مواد معدنی موجود در پوسته را در تیمار بعدی تسهیل می‌کند. نتیجه‌ی مشابهی در پژوهش Toan و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده گردید. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که استفاده از پیش تیمارها، به دلیل کوتاه کردن زمان تیمار بعدی و به حداقل رساندن میزان نیاز به مواد شیمیایی، می‌تواند در استخراج کیتین به روش شیمیایی موردتوجه باشد.

تغییرات کمی و کیفی مشاهده‌شده برای کیتین در سخت‌پوستان، به دلیل مرحله‌ی فیزیولوژیکی ارگانیسم، تغییرات فصلی، نوع گونه و روش مورداستفاده، ممکن است متفاوت باشد (Benhabiles *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013). در مطالعه‌ی حاضر، بازده تولید کیتین در روش‌های مختلف، از ۵۹- ۲۶ درصد وزن خشک، متفاوت بود (شکل ۳)؛ که این مقدار بالاتر از مقدار به‌دست‌آمده از ضایعات خرچنگ (۱۰ درصد) است (Tolimate *et al.*, 2000) و نشان می‌دهد که ضایعات میگو می‌تواند به‌عنوان یک منبع عالی از کیتین موردتوجه باشد. با توجه به این‌که پوسته‌ها اساساً شامل کیتین، کلسیم کربنات، پروتئین، لیپید و رنگ‌دانه می‌باشند (Mohammed *et al.*, 2013) و با توجه به نقش کلیدی معدنی زدایی و پروتئین زدایی در فرآیند استخراج کیتین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که احتمالاً کیتین حاصل از روش رنگدانه‌زدایی با اتانول، نسبت به روش‌های دیگر از خلوص و کیفیت بالاتری برخوردار است و در مقابل، بازده بالا درروش پیش تیمار دما، احتمالاً به خروج نامناسب پروتئین و مواد معدنی و عدم خروج رنگی زه‌ها و لیپیدهای موجود در پوسته اشاره دارد (شکل ۳).

برای تبدیل کیتین به کی توسان باید فرآیند استیل زدایی صورت گیرد. برای این منظور، از سه روش گرماده‌ی با مایکروویو، اتوکلاو و روش گرماده‌ی حرارتی استفاده گردید. در بین روش‌های مورد آزمایش، روش اتوکلاو و روش مایکروویو به ترتیب با ۸۷ درصد و ۴۳ درصد، بیش‌ترین و کم‌ترین بازده تولید کی توسان را نشان دادند (جدول ۲). در مطالعه‌ای که توسط Mohammed و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت؛ ماکزیمم مقدار کی توسان درروش گرماده‌ی حرارتی به ۷۳ درصد رسید که این مقدار قابل‌مقایسه با ۷۶ درصد بازده تولید کی توسان با همین روش در مطالعه‌ی حاضر است. طبق نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان چنین نتیجه گرفت که روش اتوکلاو به‌منظور صرفه‌جویی در زمان، می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های زمان‌بر گرماده‌ی حرارتی باشد.

روش شیمیایی به‌طور گسترده در مقیاس صنعتی استفاده می‌شود؛ چون این روش یک روش ثابت و سریع است و منجر به تولید محصولی خالی از هرگونه ناخالصی می‌گردد که برای کاربردهای حساس مثل پزشکی، دارا بودن این خصوصیت لازم و ضروری است. نیاز به مقادیر فراوان آب و انرژی و رها شدن مقادیر بالایی از بقایای اسیدی و بازی خورنده، ازجمله ایراداتی است که به این روش گرفته می‌شود (Bajaj *et al.*, 2011)، اما مطالعه‌ی حاضر، با معرفی روش‌هایی با کمترین میزان مصرف مواد شیمیایی در کمترین زمان ممکن، اثرات منفی روش‌های شیمیایی را تا حد زیادی بهبود بخشید.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

تقی زاده، م.، تک روستا، م.، داوری، گ. و یوسفی، م.، ۱۳۸۳. تهیه کی توسان با درجه استیل زدایی متفاوت و مقایسه روش‌های مختلف شناسایی آن. مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، شماره ۵، صفحات ۲۹۷– ۲۹۱.

غیاث‌الدین، ع.، شجاع الساداتی، ع. و واشقانی فراهانی، ا.، ۱۳۹۰. اصلاح و بهینه‌سازی فرآیند استخراج کیتین از پوست میگو. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، شماره ۱، صفحات ۹– ۱.

A. A. O. C., 1990. Official methods of analysis: Association of official analytical chemists.13th ed, Washington, DC, 1094 p.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, Á., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. Current Chemical Biology, 3 (2): 203-230.

Bajaj, M., Winter, J. and Gallert, C., 2011. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from *Crangon crangon* shrimp waste. Biochemical Engineering Journal, 56: 51- 62.

Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A. and Nameri, N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its Oligomers Prepared from shrimp shell waste. Food Hydrocolloids, 29: 48- 56.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram method Quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Analytical Biochemistry, 72 (1-2): 248- 54.

Du, Y., Zhao, Y., Dai, Sh. and Yang, B., 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10: 103- 107.

Hong, K. N., Young, I. C., Hyeung, R. K. and Meyers, S. P., 2000. Effective deacetylation of chitin under condition of 15 psi/ 121°C. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48 (6): 2625- 2627.

Jung, W. J., Jo, G. H., Kuk, J. H., Kim, Y. J., Oh, K. T. and Park, R. D., 2007. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. Carbohydrate polymers, 68 (4): 746- 50.

Khor, E., 2001. Chitin: fulfilling a biomaterials promise. Elsevier Science, Amsterdam, 10 p.

Kim, W. J., Lee, W. G., Theodore, K. and Chang, H. N., 2001. Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan bythe fungi, Absidia coerulea. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 1 (6): 6- 10.

Koide, S.S., 1998. Chitin-chitosan: Properties, benefits and risks. Nutrition Research, 18 (6): 109- 1101.

Kumar, M. N. V. R., Muzarelli, R. A. A., Muzarelli, C., Sashiwa, H. and Domb, A. J., 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. Chemical Reviews, 104 (12): 6017- 6084.

Mohammed, M. H., Williams, P. A. and Tverezovskaya, O., 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. Food Hydrocolloids, 31: 166- 171.

Oh, K. T., Kim, Y. J., Nguyen, V. N., Jung, W. J. and Park, R. D., 2007. Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. Process Biochemistry, 42 (7): 1069- 74.

Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Ramirez-Hernandez, J. Y., Flores- Albino, B., Gimeno, M., Barzana, E. and Shirai, K., 2009. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. Bioresource Technology, 100 (11): 2849- 2854.

Pillai, C. K. S., Paul, W. and Sharma, C. P., 2009. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science, 34 (7): 641-678.

Archive of SID

www.SID.ir

Sagheer, F. A. A., Al-Sughayer, M., Muslim, S. and Elsabee, M., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydrate Polymers, 2 (77): 410- 419.

Samar, M. M., El- Kalyoubi, M. H., Khalaf, M. M. and El- Razik, M. M. A., 2013. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. Annals of Agricultural Science, 58 (1): 33- 41.

Setoguchi, T., Kato, T., Yamamoto, K. and Kadokawa, J., 2012. Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid. International Journal of Biological macromolecules, 50 (3): 861-64.

Synowiecki, J. and Al- Khateeb, N. A., 2003. Production, Properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43 (2): 145- 171.

Taghizadeh, S. M., Takrousta, M., Davari, G. and Yousefi, M., 2004. Preparation of Chitosan with Different Degree of Deacetylation and Comparison of Its Different Characterization Methods, Irananian Journal of Polymer Science and Technology (Persian), 17: 291-297.

Toan, N. V., Ng, C. H., Aye, K. N., Trang, T. S. and Stevens, W. F., 2006. Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81(7), pp.1113-1118.

Tolimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M. and Vottero, P., 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer, 41: 2463- 2469.

Venugopal, V., 2009. Marine products for healthcare: Functional and Bioactive Natraceutical Compounds from the Ocean. CRC Press, New York, 552 p.

Xu, Y., Gallert, C. and Winter, J., 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. Applied Microbiology and Biotechnology, 79 (4): 687- 697.

Archive of SID

www.SID.ir