استحصال کیتین و تولیدکیتوزان از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا *(Artemia urmiana)*

یوسفعلي اسدپور*[۱]، سیدعباس شجاع الساداتي[۲]، محمدرضا کلباسي[۳] و اصغر خسروشاهي[٤]

۱- دانشجوي دکتراي شیلات , دانشکده منابع طبیعي و علوم دریایي نور, تلفن: ۰۱۲۲-۶۲۵۳۱۰۱-۳
۲- استاد بیوتکنولوژي صنعتي، گروه بیوتکنولوژي مهندسي شیمي, دانشگاه تربیت مدرس
۳- استادیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعي و علوم دریایي دانشگاه تربیت مدرس
٤- دانشیار گروه صنایع غذایي دانشکده کشاورزي دانشگاه ارومیه

چکیده

در این پژوهش پوسته سیست آرتمیا اورمیانا از سواحل دریاچه ارومیه جمع‌آوری, و بعنوان یک منبع جدید جهت استحصال موادی با ارزش افزودهٔ بالا یعنی کیتین و کیتوزان خالص سازی و خشک گردید. کیتین موجود در سیست به روش شیمیایی طی چهار مرحله کانی زدایی، حذف مواد پروتئینی, لیپیدی و مواد رنگی خالص‌سازی شد. میزان استخراج کیتین با بازدهی ۳ ± ۲۸ درصد وزنی تعیین شد. تولید کیتوزان از کیتین با واکنش محلول هیدرواکسیدسدیم ۵۰ درصد (حجمی – حجمی) و اتانول ۹۷ درصد در دمای جوش به مدت ٤ ساعت انجام و در این خصوص کیتوزان با بازدهی ۳ ±٦۰ درصد تولید گردید. برای شناسایی ساختار شیمیایی و تشخیص کیفی محصولات حاصل از پوسته های سیست آرتمیا اورمیانا, تست های تشخیص کیفی تجزیه عنصری دستگاهی (C.H.N.O) ، طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) ، و پرتو نگاری اشعه ایکس (XRD) انجام شد. نتایج تجزیه عنصری نشان می دهد که کیتین استخراج شده از پوسته های سیست آرتمیا اورمیانا دارای ۷/٦ درصد نیتروژن , ٤۸/٦ درصد کربن و ۷ درصد هیدروژن است، براساس این نتایج فرمول تجربی کیتین پوسته سیست آرتمیا $(C_{7.6}H_{12.8}N_1O_{17.7})_n$ تعیین شد. نتایج تجزیه عنصری بیانگر این است که کیتوزان پوسته دارای ۷/٦ درصد نیتروژن، ٤۱/٤ درصد کربن، ٦/۷ درصد هیدروژن می‌باشد و بر این اساس فرمول تجربی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا نیز $(C_{6.27}H_{11.29}N_1O_{28.4})_n$ بدست آمد. پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه بعنوان منبع جدید در تولید کیتین و کیتوزان معرفی می‌شود. سالیانه می‌توان براساس ارزیابی های انجام یافته از پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه مقادیر قابل توجهی کیتین و کیتوزان استخراج نمود.

کلید واژگان: کیتین، کیتوزان , ا ستخراج , آرتمیا اورمیا نا , اشعه ایکس

۱- مقدمه

کیتین با نام شیمیایی β-D (1-4) N-acetly- glucosamine است که پس از داستیله شدن، بنام کیتوزان، با نام علمی β-D (1-4) –2-amino-2-deoxy- α- glucan تبد یل می‌شود, که به واسطه حذف گروه استیلی وایجاد گروه آمینی, خاصیت بازی پیدا کرده و یک پلیمر جداگانه با خواص فیزیکی وشیمیایی متفاوت محسوب می شود[۱]. این دو پلیمر، پلی‌ساکارید ازت دار طبیعی هستند که در ساختمان شیمیایی هر کدام بیشتر از ۵۰۰۰ مونومر گلوکز آمین وجود دارد[۲]. بعلت ساختار شیمیایی، خصوصیات و عملکردهای متفاوت، باعث شده که تاکنون بیش از ۳۰۰۰ اختراع کاربردی از کیتین و کیتوزان و مشتقات آنها به ثبت برسد [۳،۱]. این پلیمرها در صنایع مختلف داروسازی، آرایشی، کشاورزی، صنایع غذایی،

Archive of SID
www.SID.ir

تولیدات گیاهی، پالایش آب، زیست فناوری، پزشکی، کاغذسازی، پالایش فلزات سنگین، تغذیه حیوانات، شیمی فیبر و نساجی کاربرد دارند [۲]. تا حال بیش از ۳۰۰ منبع مختلف از انواع بی‌مهرگان و گیاهان دریایی، آلگها، باکتری‌ها، حشرات، قارچها، مخمرها و غیره برای استخراج این مواد مورد بررسی قرار گرفته‌اند [٤]. در حال حاضر پوسته میگو، خرچنگ وکریل[1] منابع اصلی استخراج این مواد است [۲، ٤]. میزان نیاز جهانی کیتین ۱۵۰۰۰۰ تن در سال برآورد شده درحالیکه میزان تولید فعلی آن ۳۰۰۰ تن در سال می‌باشد [۲،٤، ۵] . عدم امکان تولید بیشتر به دلیل محدودیت منابع قابل دسترس و فصلی بودن صید سخت پوستان می‌باشد [۲، ٤]. در حال حاضر بیش از ٤۵ شرکت در دنیا به تولید و تجارت آن اشتغال دارند[۳]، تجارت جهانی آنها سالیانه میلیونها دلارمی باشد [۳، ٦] که ژاپن بزرگترین مصرف‌کننده و آمریکا بزرگترین تولیدکننده آن می‌باشند [٤]. نظر به اهمیت و کاربردهای فراوان این دوکوپلیمر طبیعی دست‌یابی به منابع جدید و روشهای نوین در عمل آوری آنها مدنظر بسیاری از کشورها می‌باشد [۷].

دریاچه ارومیه با مساحت معادل ۵۰۰۰ کیلومتر مربع یکی از منابع، بزرگ و طبیعی آرتمیا در دنیاست, که لایه‌های کوریونی سیست های آرتمیای دریاچه پس از تفریخ در طول سال بعلت سبکی وزن با وزش بادهای غالب منطقه‌ایی و امواج به سواحل دریاچه رانده شده و بصورت پوسته های سیست آرتمیا در سواحل انباشته می‌شوند و استفاده خاصی از آنها به عمل نمی‌آید [۸], در فرآیند تکثیر طبیعی ذخایر آرتمیای دریاچه، سالیانه مقدار زیادی پوسته تولید می شود [۸]. در ایران تولید کیتین و کیتوزان از پوسته خرچنگ، لابستر و میگو گزارش گردیده است, ولی در حال حاضر به دلایل متعددی هیچ تولیدی از آنها صورت نمی‌گیرد[۹]. لیکن در این تحقیق پوسته های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه به عنوان منبع جدید برای استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- استخراج کیتین از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

مقدار۱۰ کیلوگرم از پوسته های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه طی ماههای دی و بهمن با تورهای دستی از سواحل دریاچه در ایستگاههای ساحلی رشکان و بزرگراه جمع‌آوری، وبا استفاده ازروش وزنی درآب شور و شیرین خالص‌سازی و خشک گردید [۱۰]. کیتین پوسته های سیست آرتمیای دریاچه با روش شیمیایی بهینه تغییر یافته طی٤ مرحله کانی‌زدائی با اسید کلرئیدریک ۰/۵ نرمال به مدت ٤ ساعت در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد [٤]، حذف مواد پروتئینی، با محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد (وزنی- وزنی) در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت [٤]، حذف مواد لیپیدی با محلول پترولیوم بنزن (به عنوان یک روش نوین در فرایند عمل آوری کیتین) به مدت ٤ ساعت و حذف مواد رنگی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۳۵ درصد سرد با غلظت ملایم به مدت نیم ساعت[٤], انجام پذیرفت. خالص‌سازی محصول ابتدا با محلول کلریدسدیم ۱ درصد (وزنی- وزنی) به مدت ۱ ساعت در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد و سپس با محلول اسید استیک گلاسیال ۱۰ درصد (حجمی- حجمی) به مدت یک ساعت دیگر در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد[٤], انجام شد.

۲-۲- تبدیل کیتین به کیتوزان

برای تبدیل کیتین به کیتوزان مقدار ۱۰ گرم از کیتین خشک بدست آمده ، با محلول هیدروکسیدسدیم ۵۰ درصد (وزنی- وزنی) به همراه محلول اتانول ۹۷ درصد بر روی اجاق الکتریکی به مدت ٤ ساعت جوشانیده و سپس شستشو، صاف و خشک و توزین شد [۱۱].

1. Krill
2. Labster

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۳- تست هاي تشخيص كيفي

برای شناسایی ساختار شیمیایی و کیفیت کیتین و کیتوزان حاصله و تعیین دقیق میزان درجه داستیله شدن[1] کیتوزان تست های تشخیص کیفی ذیل انجام شد که شامل:

۲-۳-۱- طيف سنجي مادون قرمز(FTIR-Infared spectroscopy)

در این روش همه نمونه‌ها با دستگاه پرس به صورت پلیت‌های شفاف به ضخامت ۰/۲۵ میلی‌لیتر مخلوط با برمیدپتاسیم (KBr)، آماده و سپس به وسیله دستگاه طیف سنج مادون قرمز ABB-Bomem مدل MB-۱۰۰ آزمایش‌ها انجام شد[۵ ، ۱۲].

۲-۳-۲- پرتونگاري با اشعه ايكس (X-Ray Powder Diffraction)

جهت مشخص نمودن ساختار بلوری، همه نمونه‌ها با دستگاه Retcsh تا اندازه ۲۵ میکرومتر آسیاب و با پودر اسید بوریک و مخلوط با Wax-C به صورت قرص‌های ٤ میلی‌لیتری آماده و سپس با دستگاه XRD ساخت شرکت فیلیپس طیف‌سنجی گردید [۵، ۱۳].

۲-۳-۳-تجزیه‌عنصري دستگاهي(C.H.N.O.Analyser)

تجزیه عنصری آنها با دستگاه تجزیه C.H.N.O.RAPID مدل Heraeus با مکانیسم احتراق و از رابطه اکسایشی

$$aC_xHyN_wO_z + bO_2 \xrightarrow[CuO]{600^0C} \times C_2O_2 + cH_2O + eN2$$

انجام و تعیین گردید [۷].

۲-۳-٤- تعيين درجه استيل‌زدايي (degree of deacetylation)

برای تعیین درجه استیل‌زدایی و راندمان محصول به روش تیتراسیون اسیدـ باز با اسید کلرئیدریک ۰/۱ نرمال و محلول سود ۰/۱ و سنجش pH محلول استفاده شد [۱].

۳- نتايج

پس از آنکه بر روی پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه مراحل کانی‌زدائی، حذف مواد پروتئینی، لیپیدی و مواد رنگی انجام شد، مقدار ۳ ± ۲۸ درصد وزنی محصول باقی مانده از تخلیص نهایی، کیتین بدست آمد که برای اثبات آن تست های تشخیص کیفی تجزیه عنصری بعمل آمد و نتایج آن در (جدول ۱) آمده است.

از آنجا که طیف سنجی مادون قرمز از پیشرفته‌ترین روشها در تعیین ساختمان مولکولی ترکیبات شیمیایی آلی مجهول بشمار می‌آیند، این آزمایش برای اثبات کیتین استخراجی از پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه انجام شد [۱۲], که نتایج آن بشرح (نمودار ۱) آورده شده است.

در طیف سنجی FTIR باندهای جذبی ۳٤۸۷/۹ cm^{-1}، ۲۸۹۲/۸ cm^{-1}، ۱۵٦۰/۳ cm^{-1} ، ۱٦٦۵/٦ cm^{-1}، ۱۳۱۹ cm^{-1}، ۱۰۱۹/۱ cm^{-1} مبین وجود ارتعاشات کششی وخمشی گروههای آمینو اسیتل, کربنیل, O-H ، و C-H آلیفاتیک وپیوند C-O در پلیمر کیتین است.

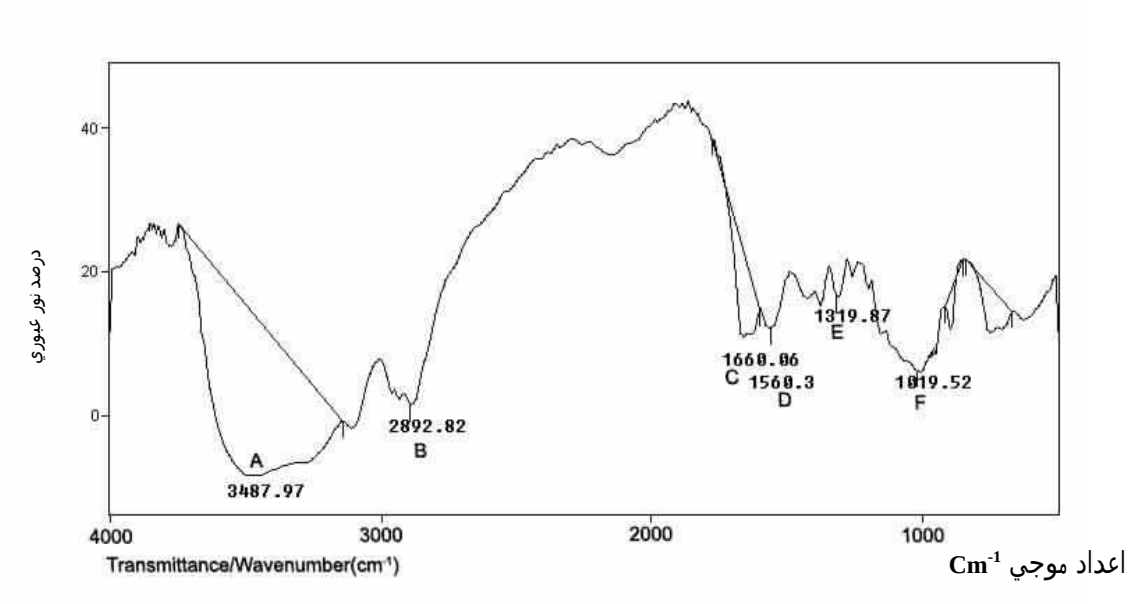
ساختار بلوری کیتین استخراج شده از پوسته های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه با پرتونگاری با اشعه ایکس انجام شد که در (نمودار۲) مشخص گردیده است (این نمودار پرتونگاری از تیوب مسی و با زاویه تابش ۲θ است).

1- Degree of deactylation

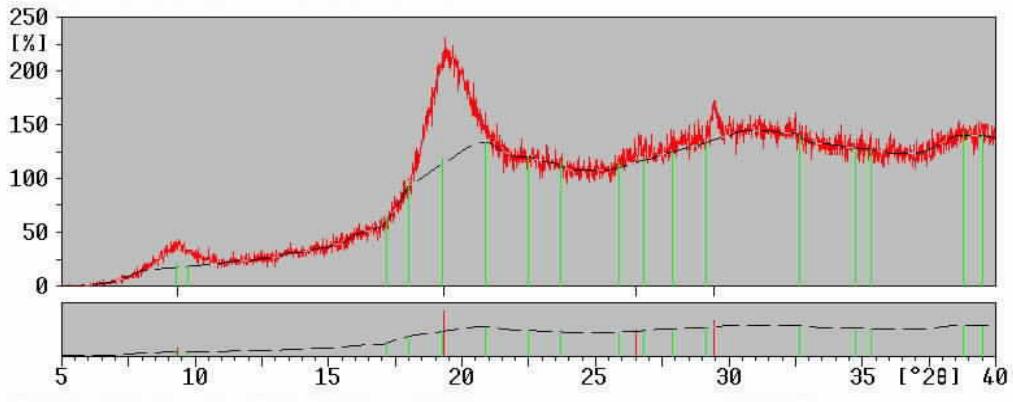
Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱ نتایج تجزیه عنصری کیتین استحصالی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

عنصر	کربن	نیتروژن	هیدروژن	اکسیژن
درصد	٤٨/٦	٧/٦	٧	٣٦/٨



نمودار۱ طیف FTIR نمونه کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا



نمودار۲ طیف کیتین حاصله از پرتونگاری با پرتو اشعه ایکس (رنگ قرمز)

www.SID.ir

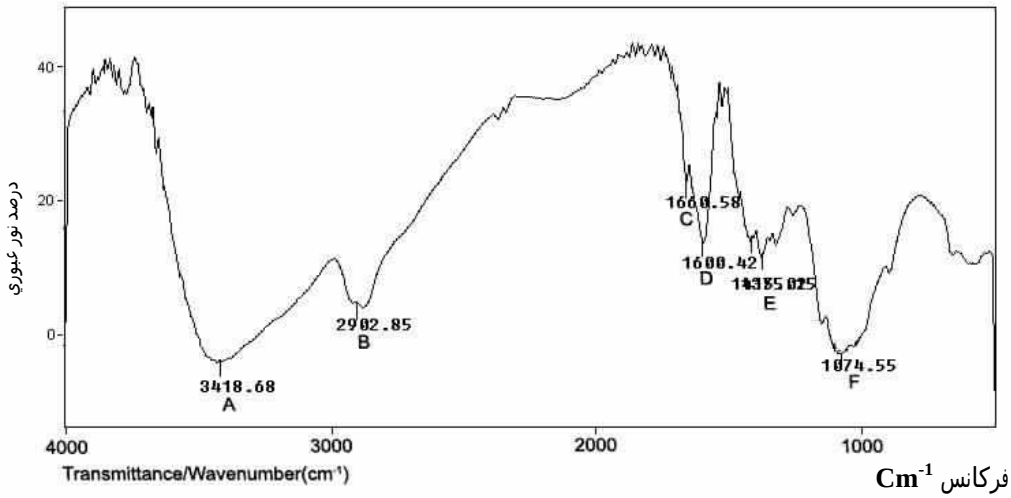
پس از تبدیل ۱۰ گرم از کیتین به کیتوزان وزن محصول نهایی ۶/۲ گرم و راندمان واکنش داستیله شدن ۳ ± ۶۰ درصد برآورد شد. برای اثبات آن تست تشخیص کیفی تجزیه عنصری بعمل آمد [۱۲، ۱۳] که نتایج آن در (جدول ۲) آورده شده است.

از کیتوزان تولید شده طیف سنجی مادون قرمز و پرتونگاری با اشعه ایکس با تیوب مسی و با زاویه تابش 2θ بعمل آمد که نتایج مربوطه در (نمودارهای ۳ و ٤) آورده شده است.

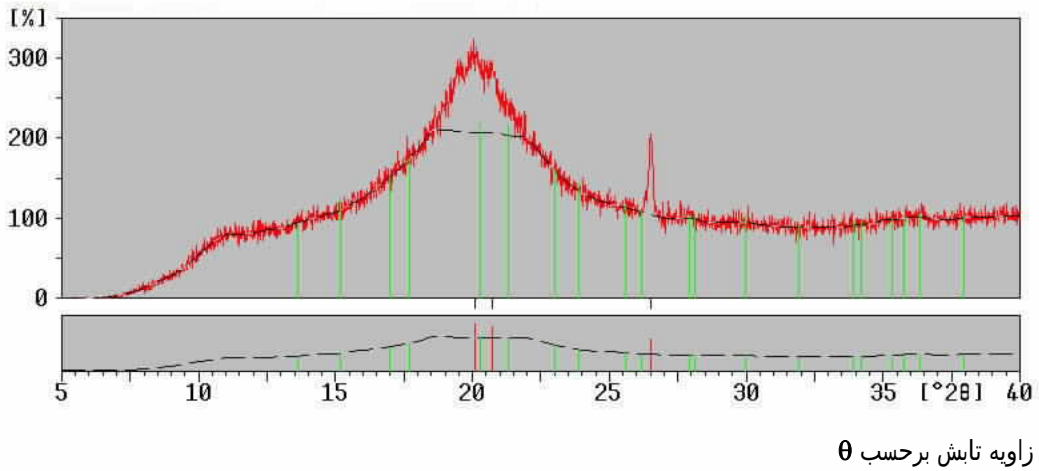
پیک‌های A,B,C,D,E,F به ترتیب مربوط به باندهای جذبی گروههای آمیدی O-H, N-H, و C-O اختصاصی در پلیمر کیتوزان است.

جدول ۲ نتایج تجزیه عنصری کیتوزان استحصالی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

عنصر	کربن	نیتروژن	هیدروژن	اکسیژن
درصد	٤١/٤	٧/٧	٦/٧	٤٤/٢



نمودار۳ طیف FTIR کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا



نمودار٤ طیف پرتونگاری با اشعه ایکس کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه

www.SID.ir

٤- بحث

دراین تحقیق پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه برای اولین بار به منظور استحصال موادی با ارزش، یعنی کیتین و کیتوزان مورد بررسی و تجزیه قرار گرفت پس از تست ها مشخص گردید که مقدار کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیای دریاچه به میزان ۲ ± ۲۸ درصد وزنی می‌باشد, در صد وزنی موجود ازسایر منابع استخراج فعلی آن دردنیا, درپوسته خرچنگ ها تا١٤ درصد, پوسته میگوها تا ۲۵ درصد و کریل تا ۱۹ درصد گزارش شده است [۱، ٤]. لذا باتوجه به مقدار قابل توجه کیتین موجود در ساختمان آن، پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه بعنوان یک منبع بسیار خوب و نسبتا فراوان برای استحصال این کوپلیمر گزارش می‌شود.

بالا بودن درصد کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیا در مقایسه با سایر منابع استخراج فعلی آن در دنیا فرآیندی سودآور خواهد بود، که تبدیل پوسته های سیست آرتمیااورمیانا به کیتین و مشتقات بعدی آن موجب تولید موادی با ارزش افزودهٔ بالا از پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه خواهد شد.

راندمان تبدیل کیتین به کیتوزان و بازده درجه استیل‌زدائی بدست آمده از آن نیز مناسب است. این دو پلمیر حاصله اختلافات اندکی در مقایسه با محصولات مشابه استخراجی از پوسته خرچنگ، میگو و لابستردارند [۱، ٤]. که اثبات نظریه Sigma در سال ۲۰۰۰ مبنی بر تفاوت اختصاصات و عملکردهای کیتین و کیتوزان نسبت به منابع استخراجی و روش‌های عمل‌آوری‌شان را مورد تأیید قرار می‌دهد [١٤].

کیتین پوسته سیست آرتمیا۷۱٪ درصد نیتروژن و ۱/٤٥ درصدکربن, وکیتوزان ۷۷٪ درصدکربن و۲٪ درصد نیتروژن بیشتری درمقایسه باسایرانواع مقایسه‌ای آن دارد [۹], وجود این اختلاف جزئی در ساختمان کیتین و کیتوزان استخراجی از پوسته سیست آرتمیا، می‌تواند منجر به تولید مشتقاتی جدید با کاربردهای ویژه‌ای گردد, و نظریه Seaborne در سال ۲۰۰۱ مبنی بر تولید مشتقات متفاوت در شرایط یکسان از کیتین و کیتوزان‌ها مؤید این امر است [١٤]. دراکثرمنابع حذف مواد لیپیدی در پروسه های عمل آوری کیتین, بامحلول اتانول بوده است, برای دستیابی به نتیجه بهتر درحذف کامل مواد لیپیدی وامکان بازیا فتهای مجدد, برای اولین بار حذف مواد لیپیدی با پترولیوم بنزن به عنوان یک روش نوین در بهینه سازی روشهای استخراج, این مواد ارائه شده است [٦].

با توجه به بالا بودن درصد نیتروژن و کربن در ساختمان کیتین پوسته سیست آرتمیا، کاربردهای اختصاصی آن را در زمینه های پزشکی در مورد هموستاز، فرآیندهای دیالیز، سنتز پوست مصنوعی، نخ بخیه جراحی، زیست فناوری های محیطی، سم‌زدایی، پرتوزدایی را دو چندان با اهمیت می‌سازد [۷، ۱۳].

در طیف سنجی FTIR کیتین, وجودباندهای جذبی $۳٤۸۷/۹\ cm^{-1}$، $۲۸۹۲/۸\ cm^{-1}$، $۱۵٦۰/۳\ cm^{-1}$، $۱٦٦۵/٦\ cm^{-1}$، $۱۳۱۹\ cm^{-1}$، $۱۰۱۹/۱\ cm^{-1}$ مبین ارتعاشات کششی وخمشی گروههای آمینو استیل,کربنیل, O-H، و C-H آلیفاتیک وپیوند C-O در پلیمر کیتین است (نمودار۱).

طیف های مادون قرمز و پرتونگاریهای بدست آمده از اشعه ایکس، و باندهای جذبی ایجاد شده از آنها، در مقایسه با طیف‌های استانداردشان [۵، ۱۳، ١٤] بیانگر، یکسان بودن کوپلیمرهای کیتین و کیتوزان است که اختلافات جزئی مربوط به ماده اولیه و روش‌های عمل‌آوری است.

هرچند استحصال کیتین و تبدیل آن به کیتوزان از پوسته خرچنگ، میگو و لابستر در ایران گزارش شده است[۹] ولی به دلایل فسادپذیری سریع پوسته این آبزیان به علت پروتئین کنده شده توأم با پوسته، گرمای زیاد مناطق تولیدی, فصلی بودن صید و بهره‌برداری میگو، خرچنگ، لابستر در عمل هیچگونه تولیدی انجام نمی‌شود، لذا می‌توان سالیانه مقادیر قابل توجهی کیتین و سایر مشتقات آن را از پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه براساس ارزیابیهای بعمل آمده و بدون داشتن مشکلات فوق استخراج نمود [۸].

برای ادامه پروژه، انجام پژوهش و ارزیابی‌های زیست محیطی در بهره‌برداریهای کلان از این منبع ضروری است و

Archive of SID
www.SID.ir

ضمناً بررسی امکان بازیافت سایر فرآورده های جنبی از پوسته‌های سیست آرتمیای دریاچه ارومیه، بررسی نقش عوامل طبیعی و آلودگیهای احتمالی و بهینه سازی روش‌های استخراج نیز پیشنهاد می‌شود.

۵- سپاسگزاري

بدین وسیله از کلیه مسئولین و دست‌اندرکاران محترم دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، گروه بیوتکنولوژی فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس و آزمایشگاههای شیمی پلیمر دانشگاه صنعتی شریف، آنالیز مواد غذایی دانشگاه ارومیه، کمال تشکر و امتنان را می‌نمائیم.

٦- منابع

[1] Pariser, E.R; and lombardi, d.p: 1988. “A guide to the research literature chitin”, Source book. Plenum Press. New York, U.S.A, p. 560 .

[2] Alder, E; 1997. “Chitin natural macromolecules”. Chem. of Macromolecules. Internet. Pdf. http://www.seaborne.com/chitinguide.htm. p.10.

[3] Seaborne. S; 2001. “A natural Product for the 21th century”. in Guid to Chitin Internet pdf *<URL, http;//www.Seaborn. Com/Chitinguide. Htm.* p. 5.

[4] Pagel d; 1999. “Chitin Production from lobster and crab”, In Natl Acdemy Press, Island, pp. 61-68.

[5] Charles, J.P; 1998. “The Aldrich Library of Infrared Spectra”; Edi, III, p. 1867.

[6] Meyers, S.P., 2001. “Chitin structure and mechanical properties” Internet pdf *<http://www.Seaborn.com/chitinguide Htm>* p. 10.

[7] Hein, S; Chuen, N; Chandrkrachang, S; and Stevens, F., 2001. “A systematic approach to quality assessment system of chitosan”, in Asian Istitute of Techno. Internet pdf <http://www.Southrnblue.Com/chitosan> Bangkok.

[8] Sorgeloos, p., 1997. “Determiantion and identification of biological characteristics of *Artemia urmiana* for application in aquaclture”. Univ of Gent Belgium, Item A, p. 110.

[۹] تهامی، م و تهامی، م ـ ۱۳۷٤ «استخراج کیتین از پوسته خرچنگ، میگو، لابستر» پایان‌نامه کارشناسی ارشد. مرکز تحقیقات شیلات بندرعباس.

[۱۰] اسدپور، ی، ۱۳۷۳ «دستورالعملهای استحصال و عمل آوری آرتمیا اورمیانا و بکارگیری آن در آبزی‌پروری، مرکز تحقیقات امور دام و منابع طبیعی، آذربایجان غربی، ص. ٦۰ .

[11] No, H.K; lee, K.S., and Meyers, S.P., 2000. “Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of Chitosan Products”, J, Food Scie, Vol. 65. No.7 pp. 1134-37.

[۱۲] پاویالمیمن، کریز؛ «نگرشی بر طیف‌سنجی»، مترجم، موثق، ب؛ ۱۳۷۵، انتشارات علمی و فنی، ص. ٦۸۵.

[13] Brugnerotto, j., Lizardi, F.M., and Rinaudo M., 2001. “An infrared investigation in relation with Chitin and Chitosan characterization” J. Polymer, 42, Elseviesr, pp. 231-242.

[14] Roger, J. Keller, 1998. “The Sigma Library. F. FTIR Spectra, Vol. 2, p.134.

[15] Walker, J., 2000. “Chitosan, in TSCAA, Interagency Testing Committee. U.S.A, Internet. Pdf *<http://www.chitosan.net >*. p. 15 .

Archive of SID

www.SID.ir