

تهیه کیتوزان با کیتین‌های تولیدی از میگو با استفاده از دو اسید متفاوت و تعیین درجه استیلاسیون با استفاده از طیف FTIR

معصومه کردی^۱

ناصر فرخی^{۲*}

Nfarrokh@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲

چکیده

کیتین بعد از سلولز فراوان‌ترین پلی‌ساکارید یافت شده در طبیعت است که در پوسته سخت‌پوستان، اسکلت خارجی حشرات، نماتدها، جلبک‌ها و دیواره سلولی قارچ‌ها به صورت کمپلکس با سایر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها یافت می‌شود. پلیمر خطی کیتوزان با زمینه کاربرد فوق‌العاده بالا از پزشکی گرفته تا کشاورزی، از مشتقات کیتین است که از طریق داستیلاسیون کیتین تولید می‌شود. در این مطالعه کیتین با درصدهای متفاوتی از دو اسید صنعتی از پوسته میگو تهیه شد و خصوصیات عملکردی کیتوزان تهیه شده از این نمونه‌ها توسط طیف‌سنج‌های تبدیل فوریه (FTIR₁) مطالعه شد. الگوی FTIR نمونه‌ها تقریباً با نمونه‌های استاندارد مطابقت داشتند. همچنین تهیه فیلم کیتوزان و بررسی طیف IR آن نشان داد که کیتوزان به دست آمده دارای درجه استیلاسیون بین ۱۸-۲۲ می‌باشد. نظر به وفور میگو در بخش‌های جنوبی و شمالی کشور، راه‌اندازی خط تولید این ماده بسیار پربها امکان‌پذیر می‌باشد که در رشد اقتصادی و، با جایگزینی این ماده با مواد شیمیایی ناسازگار با محیط زیست، در حل مشکلات زیست‌محیطی جوامع انسانی موثر می‌باشد.

کلمات کلیدی: کیتین، کیتوزان، FTIR، درجه استیلاسیون.

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- استادیار گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. * (مسئول مکاتبات)

Production of chitosan from shrimp produced chitin with two acids and determination degree of acetylation by FT-IR spectroscopy

Masoumeh Kordi¹

Naser Farrokhi ^{*}(*Corresponding Author*)

Nfarrokh@nigeb.ac.ir

Abstract

After cellulose, chitin is the most abundant polysaccharide found in nature. Chitin has been found in the shells of crustaceans, exoskeleton of insects, nematodes, and fungi cell wall in complex forms with other proteins and polysaccharids. Chitosan produced by deacetylation of chitin and used in medico until agriculture. The chitin with different percentages of industrial acid was prepared from shrimp shells and functional properties of chitosan prepared from these samples by Fourier transform (FTIR) was studied. FTIR pattern almost matched samples with standard samples. The preparation of chitosan film and its IR spectrum showed that the degree of acetylation of chitosan obtained between 22-18 liable by Brugnerotto and coworker (2001) method. In view of shrimp abundance in northern and southern parts of the country, the commissioning a very precious product line is the possible that economic growth and replacing with chemicals incompatible with the environment in solving the environmental problems of human societies is the most effective.

Key Words: Chitin, Chitosan, FTIR, Acetylation degree.

1- PhD student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor at Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. ^{*}(*Corresponding Author*)

مقدمه

کیتین پس از سلولز فراوان‌ترین پلی‌ساکارید طبیعی است که در ساختار آن واحدهای (*N*-acetylglucosamine) 2- acetamido-2-deoxy- β -D-glucose با پیوندهای β (4 \rightarrow 1) بهم متصل می‌شوند. کیتین اغلب به عنوان یکی از مشتقات سلولز بررسی شده است، با آن که کیتین در موجودات تولید کننده سلولز وجود ندارد. کیتین از نظر ساختاری همانند سلولز است، اما در موقعیت کربن شماره ۲ گروه‌های استامید acetamide (-NHCOCH_3) دارد. به طور مشابه کیتوزان که از مشتقات کیتین است، پلی‌مری خطی از واحدهای 2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose است که با پیوندهای α (4 \rightarrow 1) به هم متصل شده‌اند، و با *N*-داستیل‌اسیون کیتین تولید می‌شود، میزان تغییر آن توسط درجه داستیل‌اسیون مشخص می‌شود، و بنابراین یک کوپلیمر از *N*-استیل‌گلوکزآمین و گلوکزآمین است (۱). این مواد بیولوژیک کاربردی جدید، پلیمرهایی با پتانسیل بالا هستند که در صنایع مختلف داروسازی (۲)، کشاورزی، صنایع غذایی (۳)، تولیدات گیاهی، پالایش آب (۴)، زیست فناوری، پزشکی (۵)، کاغذسازی، پالایش فلزات سنگین، تغذیه حیوانات، شیمی فیبر و نساجی (۷) کاربرد دارند.

تا به حال بیش از ۳۰۰ منبع مختلف از انواع بی‌مهرگان و گیاهان دریایی، جلبک‌ها، باکتری‌ها، حشرات، قارچ‌ها، مخمرها و غیره برای استخراج این مواد مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

در حال حاضر پوسته میگو خرچنگ و کریل منابع اصلی استخراج این مواد است (۸). میزان نیاز جهانی کیتین ۱۵۰۰۰۰ تن در سال برآورد شده در حالی که میزان تولید فعلی آن ۳۰۰۰ تن در سال می‌باشد (۸). عدم امکان تولید بیش‌تر به دلیل محدودیت منابع قابل دسترس و فصلی بودن صید سخت-پوستان می‌باشد (۸). نظر به اهمیت و کاربردهای فراوان این مواد، دستیابی به درصد محصول بالا با کیفیت مطلوب مدنظر بسیاری از کشورها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه شیمی دانشگاه شاهرود در ۱۳۹۴ اجرا گردید. مواد مورد استفاده از قبیل HCl، NaOH و KBr از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. طیف IR با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مادون قرمز FTIR مدل RAYLEIGH WQF-510A از نمونه‌های کیتوزان گرفته شد.

در این پژوهش از پوسته‌های مربوط به میگو استفاده شد، پوسته‌های مذکور از عمده فروشی‌های میگو تهیه گردید. در مرحله بعد پوسته‌ها با آب به‌طور کامل شستشو شد و بقایای گوشت میگو و احشاء داخلی میگو کاملاً از آن جدا گردید. سپس پوسته‌ها در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید، بعد با آسیاب به پودر تبدیل شد. آنگاه استخراج کیتین از پوسته‌ها طی مراحل زیر به روش Takiguchi (۱۹۹۱) صورت گرفت (۹). خالص‌سازی کیتین: پوسته‌ها جهت پروتئین‌زدایی در محلول سودسوزآور ۱ نرمال در دمای اتاق برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بقایای پوسته روی کاغذ صافی ریخته شد و مواد باقی مانده روی کاغذ صافی تا رسیدن به pH خنثی با آب مقطر شستشو گردید. کانی‌زدایی از پوسته‌های میگو به مدت ۲۴ ساعت در محلول اسید کلریدریک ۱ نرمال و ۲ نرمال و اسید لاکتیک ۱ نرمال و ۲ نرمال با نسبت‌های پوسته به اسید ۱:۱۰، ۱:۱۵ و ۱:۲۵ در دمای اتاق روی هم زن انجام شد. سپس بقایای پوسته صاف شد و مواد باقی‌مانده روی کاغذ صافی تا رسیدن به pH خنثی با آب مقطر شستشو گردید (شکل ۱). کیتوزان حاصل دی‌استیل‌اسیون کیتین است. فرآیند دی‌استیل‌اسیون کیتین در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت درون محلول سود غلیظ ۵۰ درصد انجام شد. سپس مواد معلق در محلول سود روی کاغذ صافی ریخته شد و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شستشو شدند. آنگاه کیتوزان بدست آمده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۱۰).



شکل ۱- مراحل تولید کیتوزان از پوسته میگو. الف) میگو با پوست (ب) پوسته‌های شسته و خشک شده میگو (ج) کیتوزان استحصال شده از پوسته میگو.

نتایج و بحث

تیمارهای مختلفی که برای تولید کیتین و کیتوزان مورد استفاده قرار گرفت شامل درصد سود و اسید مصرفی و مدت زمان تیمار نمونه‌ها با این دو ماده بود، که به طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است، این جدول شامل درصد محصول کیتوزان تولیدی با دو اسید صنعتی متفاوت لاکتیک اسید و هیدروکلریک اسید و سود سوز آور ۱ نرمال و همچنین درجه استیلاسیون نمونه‌ها می‌باشد

نتایج حاصله نشان داد که درصد استحصال کیتوزان به روش‌های مختلف بین ۸ تا ۱۹ درصد می‌باشد که این درصدها با درصدهای تولید محصول آزمایشات Chang و همکاران (۱۹۹۷) و Heu و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد (۱۳ و ۱۰). درصد تولید محصول در کیتوزان تولیدی از کیتین تهیه شده با لاکتیک اسید کم‌تر از کیتین حاصل از هیدروکلریک اسید بود، که این تفاوت احتمالاً دلیل پروتئین‌زدایی غیر کامل هیدروکلریک اسید نسبت به روش لاکتیک اسید می‌باشد. درجه استیلاسیون نمونه‌ها بعد از انجام طیف‌سنجی با دستگاه طیف‌سنج تبدیل فوریه و اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج‌های مشخصی به روش Brugnerotto و همکاران (۲۰۰۱) محاسبه گردید. تغییرات درجه استیلاسیون به دلیل تفاوت موجود در طیف FTIR نمونه‌ها می‌باشد. جهت شناسایی دقیق تفاوت‌های بین طیف‌های FTIR (مخصوصاً طول موج‌های مورد نظر برای اندازه‌گیری درجه استیلاسیون) حاصل از نمونه‌های مختلف باید طیف‌ها را بر هم منطبق کرد تا

کاغذ صافی ریخته شد و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شستشو شدند. آنگاه کیتوزان بدست آمده در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (۱۰). پس از آن که بر روی پوسته‌های میگو مراحل کانی‌زدایی، حذف مواد پروتئینی، لیپیدی و مرحله داستیلاسیون و تولید کیتوزان انجام شد. درصد محصول با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد استحصال کیتوزان = وزن کیتوزان تولیدی ÷ (وزن اولیه پوسته میگو × ۱۰۰)

تعیین درجه استیلاسیون کیتوزان: در این آزمون برای تعیین درجه استیلاسیون از اسپکتروفتومتر مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. برای تعیین درجه استیلاسیون کیتوزان طبق روش Brugnerotto و همکاران (۲۰۰۱) از میزان جذب نمونه در طول موج‌های ۱۳۲۰ و ۱۴۲۰ cm^{-1} استفاده شد (۱۱)، باند ۱۳۲۰ cm^{-1} باند اختصاصی برای *N*-استیل گلوکزآمین است. طبق تحقیق Garcia و همکاران (۱۹۸۳) در باند ۱۴۲۰ cm^{-1} به طور آشکاری بین نمونه کیتین و کیتوزان تفاوت وجود دارد (۱۲).

به منظور گرفتن طیف IR نمونه‌ها، مقدار ۱۵ میلی‌گرم از پودر نمونه کیتوزان با مقدار کافی از پودر KBr مخلوط و با استفاده از دستگاه پرس مخصوص ساخت قرص، تحت فشار قرار گرفت و به صورت قرص درآمد و در دمای اتاق برای آزمایش‌های اسپکتروفتومتری مادون قرمز در دامنه طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} ثبت شد. طیف زمینه به طور اتوماتیک از طیف نمونه کسر شد.

زباله‌ها بی‌اطلاعند. اما امروزه نیازهای روز افزون جامعه بشری در کنار پیشرفت برق‌آسای شاخه‌های مختلف علوم کاربردی سبب شده، آن‌چه از نظر بعضی زباله متعفن و مسبب آلودگی محیط زیست شناخته می‌شود، اکنون یکی از ارکان توسعه صنایع دارویی و بهداشتی محسوب گردد. کیتین ماده خام فراوانی است که برای تبدیل به مواد شیمیایی و محصولات جدید عملاً تمام نشدنی است. امروزه کیتین و کیتوزان به عنوان بیوپلیمرهای اختصاصی بیوتکنولوژی مطرح هستند. این نوع ماده زیستی به علت برتری‌ها و مزیت‌های ذاتی، آینده درخشانی دارند. هزینه تولید کیتوزان در مقایسه با کاربردهای فراوان و قیمت گران آن، پایین و استخراج کیتوزان از ضایعات سخت پوستان در کشور ما از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است و در صنایع مختلف همچون زیست‌فناوری، کشاورزی، صنایع غذایی، پزشکی، داروسازی، منسوجات، بهداشتی و آرایشی، دارویی، صنعت و غیره کاربرد دارد و استفاده از آن گامی موثر در حل مشکلات زیست محیطی کشور به شمار می‌رود.

سپاسگزاری

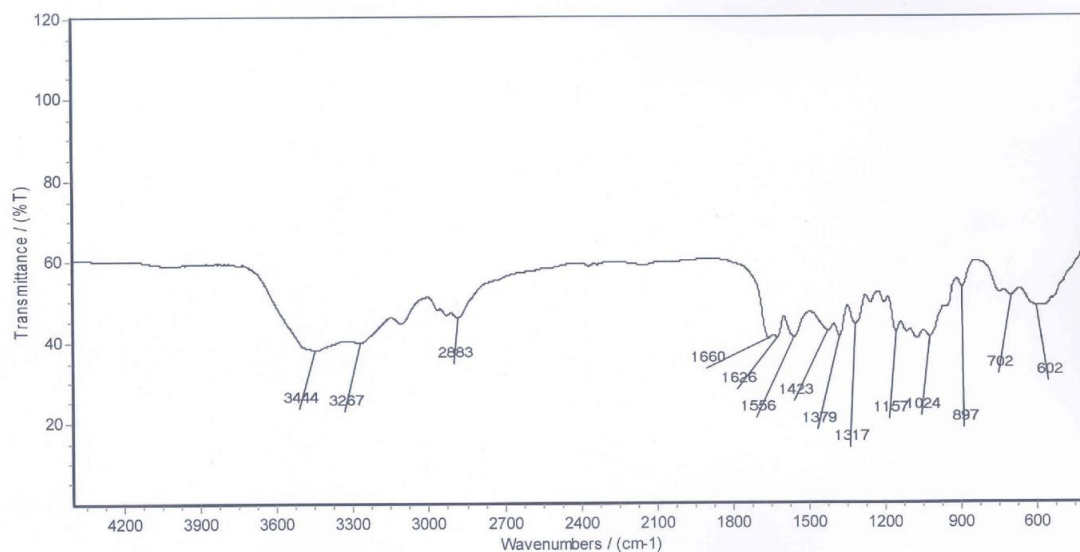
نویسندگان از کارشناس محترم آزمایشگاه شیمی دانشگاه شاهرود، سرکار خانم دکتر راحله دوستی به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

بتوان تفاوت‌های بین آن‌ها را مشاهده کرد. البته اختلاف کم بین این نمونه‌ها را به شکل بهتر می‌توان در مقادیر جذب نمونه‌ها در طول موج‌های مختلف، که از دستگاه FTIR در قالب جداولی در Excel ارایه می‌شود نیز مشاهده کرد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

در مطالعه Beany و همکاران (۲۰۰۵) درجه استیلاسیون نمونه‌های کیتین و کیتوزان تولیدشده از پوسته میگو با روش Brugnerotto و همکاران (۲۰۰۱) محاسبه شد، که درصد استیلاسیون نمونه‌های کیتین بین ۶۷-۷۱ و درجه استیلاسیون نمونه‌های کیتوزان بین ۱۹-۱۷ محاسبه گردید (۱۴). در مطالعه حاضر درجه استیلاسیون نمونه‌های کیتوزان (۲۲-۱۸ درصد) نزدیک به درجه استیلاسیون در تحقیق Beany و همکاران (۲۰۰۵) محاسبه گردید. برای طیف FTIR کیتوزان استاندارد هفت پیک اصلی در دامنه ۸۹۳، ۱۰۲۱، ۱۲۵۵، ۱۴۲۰، ۱۵۸۱ و 3404 cm^{-1} ثبت شده است. نمونه‌ای از طیف‌های FTIR گرفته‌شده از کیتوزان در شکل ۲ ارایه شده است. آبیان تولیدی در اکوسیستم عظیم دریا ارزان‌ترین و اقتصادی‌ترین غذای مردمان جهان را می‌سازند. میگو، خرچنگ و لابستر از مهم‌ترین آبیان هستند که هر ساله صید هزاران تن از آن‌ها ضایعات بسیاری در کارخانجات عمل‌آوری به جا می‌گذارد. کیتین از مهم‌ترین اجزا این ضایعات است که کاربردهای بسیار گسترده‌ای دارد. عمده این مراکز از ارزش واقعی این

جدول ۱- روش تولید کیتین و کیتوزان به همراه درجه استیلایسیون و درصد استحصال نمونه‌های کیتوزان

پارامترها	اسید کلریدریک						لاکتیک اسید					
	نرمال ۲			نرمال ۱			نرمال ۲			نرمال ۱		
غلظت اسید	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰
نسبت پوسته به اسید	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰	۱:۱۰	۱:۱۵	۱:۲۰
غلظت سود	سدیم هیدروکسید ۱ نرمال						سدیم هیدروکسید ۱ نرمال					
درصد استحصال کیتوزان	۱۴/۶٪	۱۷/۰٪	۱۲/۶٪	۱۶/۰٪	۱۷/۳٪	۱۸/۸٪	۱۵/۵٪	۱۰/۲٪	۸/۲٪	۱۱/۵٪	۱۷/۳٪	۱۷/۷٪
درجه استیلایسیون کیتوزان	۱۶۰/۴۰	۸۰/۷	۲۲/۶	۶۶/۶	۸۳/۶	۱۸۱/۰	۶۳۶/۶	۷۵۷/۶	۵۳۲/۰	۲۰۵/۰	۱۹/۵	۶۶/۰



Instrument model=WQF-520 resolution=4 scan times=10

شکل ۲- طیف FTIR گرفته شده از نمونه کیتوزان تهیه شده با استفاده از اسید لاکتیک ۲ نرمال و سود ۱ نرمال با نسبت ۱:۲۵ با دستگاه FTIR مدل RAYLEIGH WQF-510A می‌باشد.

منابع

Pharmaceutical Research, Vol. 15, pp.1326-1331.

3. Chien, P.J., Sheu, F., Yang, F.H., 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. Journal of Food Engineering, Vol. 78, pp.225-229.
1. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V., 2004. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. Journal of Scientific & Industrial Research, Vol. 63, pp.20-31.
2. Ilium, L., 1998. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient.

9. Chang, K.L., Tsai, G., 1997. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melanthro*) shell waste. *J. Agric. Food Chemistry*, Vol. 45, pp.1900-1904.
10. Brugnerotto, J., lizard, J., Goycoolea, F.M., Monal, W.A., Desbrieres, J., Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, Vol. 42, pp. 3569-3580.
11. Garcia Alonos, I., Peniche-Covas, C., Nieto, J.M., 1983. Determination of The Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by Thermal analysis. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 28, pp.189-193.
12. Heu, M.S., Kim, J.S., Shahidi, F., 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by products. *Food Chemistry*, Vol. 82, pp.235-242.
13. Beaney, P., Mendoza, J.L., Healy, M., 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Vol. 80, pp.145-150.
4. Ramnani, S.P., Sabharwal, S., 2006. Adsorption behavior of Cr(VI) onto radiation cross linked chitosan and its possible application for the treatment of wastewater containing Cr(VI). *Reactive and Functional Polymers*, Vol. 66, pp.902-909.
5. Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Line, K.Y., Wang, Y., 2002. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, Vol. 70, pp.399-421.
6. Alder, E., 1997. Chitin natural macromolecules. *Chem. of Macromolecules*. Internet. Pdf. <http://www.seaborne.com/chitinguide.htm>. p.10.
7. Pagel, D., 1999. Chitin Production from Lobster and Crab in: *NatlAcademy Press, Island.*, pp. 61-68.
8. Takiguchi, Y., 1991. Chitosan-Jikken Manual, *Advances in chitin science, Proceedings from the Asia-Pacific*. In: Chen R.H. and Chen H. C. (ed) *Physical properties of chitinous material Chitin*, Gihodou Shupan Kabushki Kaisha, Japan, pp.1-7.