

## معدنی‌زدایی و استیل‌شیمیایی ضایعات میگوی موزی (*Penaeus merguensis*) به‌منظور استخراج کیتین و کی‌توسان

چکیده

مطالعه حاضر باهدف تعیین روش مناسب جهت استخراج کیتین و کی‌توسان از ضایعات میگوی موزی (*Penaeus merguensis*) انجام گرفت. در این راستا، از پنج روش پیش‌تیمار اسید استیک، استخراج با اسید و باز، رنگدانه‌زدایی با اتانول، رنگدانه‌زدایی با اتانول-استون و پیش‌تیمار 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 پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی 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 مورد مطالعه، روش اتوکلاو با بازده تولید ۸۶ درصد، به‌عنوان روش بهینه جهت استخراج کی‌توسان تعیین گردید.

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

فاطمه صداقت<sup>۱</sup>مرتضی یوسف زادی<sup>۲\*</sup>حجت تویسرکانی<sup>۳</sup>سهراب نجفی پور<sup>۴</sup>

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.

مقدمه

کیتین بانام علمی پلی  $\beta(1,4)$ - $2$ -استامیدو- $2$ -داکسی-D-گلوکوپیرانوز<sup>۱</sup>، یکی از فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای تجدیدپذیر در طبیعت است که به‌طور برجسته در پوسته سخت‌پوستان، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود. این پلیمر از نظر ساختار مولکولی، حلالیت

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

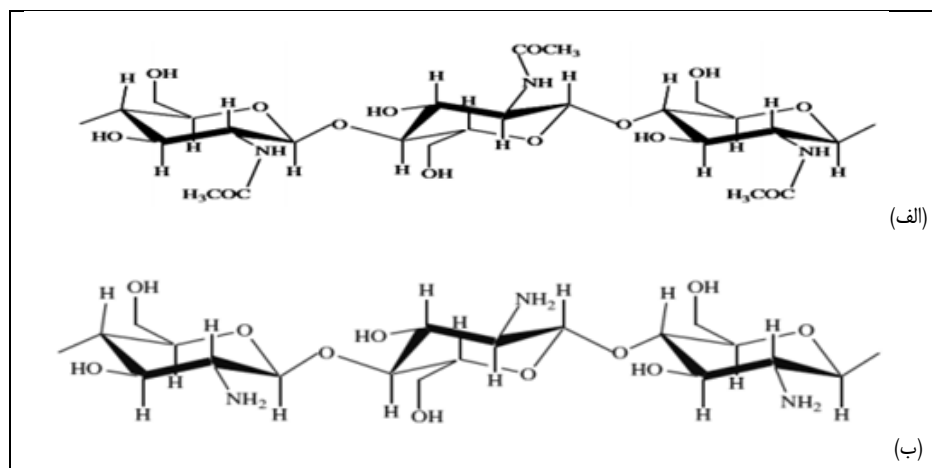
نخستین اکتشاف کیتین در قارچ‌ها و در سال ۱۸۱۱ توسط Henri Bracannot، گیاه‌شناس فرانسوی، انجام پذیرفت. سپس در سال ۱۸۲۳ از حشرات استخراج شد و در این زمان، یک دانشمند فرانسوی بنام Odier آن را کیتین نامید که معنی لغوی آن در زبان یونانی نیام است. کیتین در حالت جامد به سه شکل آلفا، بتا و گاما وجود دارد (Aranaz 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 merguensis*)، یکی از گونه‌های مهم در آب‌های خلیج فارس و دریای عمان است و هر ساله و در طول فصل صید میگو در استان هرمزگان، از لحاظ 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. در نتیجه، استفاده از این ضایعات نه تنها می‌تواند راه‌حلی در برابر مشکلات زیست‌محیطی باشد، بلکه به‌عنوان منبعی برای تهیه ماده بالارزش 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 انجام گرفته 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 در زمینه‌ی صنایع پزشکی و دارویی به خود جلب کرده‌اند، از مهم‌ترین خصوصیات 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 پیدا کرده 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. merguensis*) به‌منظور استخراج کیتین و سپس ارزیابی روش‌های تهیه کی توسان از کیتین حاصل است.



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. merguensis*) 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).

روش چهارم - رنگدانه زدایی با اتانول - استون: از اسید کلریدریک ۰/۲۵ مولار جهت معدنی زدایی و از سدیم هیدروکسید یک مولار جهت پروتئین زدایی پوسته‌ها (شستشو داده شده با آب ۹۵ درجه سانتی گراد) استفاده گردید. سپس ۵۰ میلی لیتر اتانول گرم اضافه شده و جهت خروج ناخالصی‌ها، نمونه حاصل در استون (۳۰ میلی لیتر) جوشانده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آن خشک و کیتین حاصل گردید (Sagheer et al., 2009). روش پنجم - پیش تیمار دما: پوسته‌های میگو (شستشو با آب ۶۰ درجه سانتی گراد)، به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از شستشو و آسیاب کردن پوسته‌ها، به پودر حاصل اسید کلریدریک 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 آن خشک و کیتین به دست آمد (Toan et al., 2006). در تمامی روش‌های به کار گرفته شده، از ۳ گرم پودر پوسته میگو، ۳۰ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید و ۲۴ میلی لیتر هیدروکلریک اسید استفاده گردید. پوسته میگو شستشو داده شده با آب ۶۰ و ۹۵ درجه سانتی گراد نیز به عنوان شاهد در این آزمایش‌ها استفاده شد. فرآیند استیل زدایی کیتین به منظور 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 سانتی گراد در حمام آب (WiseBath، کره جنوبی) قرار گرفت (Mohammed et al., 2013). روش اتوکلاو: سدیم هیدروکسید ۵۰ درصد به نمونه اضافه شده و تحت شرایط دمایی ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو (Kavoosh AV25، ایران) گردید (Hong et al., 2000). روش گرماده‌ی با تابش دهی مایکروویو: استخراج کی توسان با این روش، مطابق با روش Samar و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییر صورت گرفت. بدین صورت 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 مورد استفاده در تمامی آزمایش‌ها ثابت و به ترتیب شامل ۵ گرم و ۶۰ میلی لیتر است). وزن خشک نمونه باقی‌مانده، بعد از قرار دادن نمونه در آن (Memmert UNB 400، آلمان) ۶۰ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد به مدت ۳ ساعت گرما داده شد (A.O.A.C., 1990). در نهایت، درصد خاکستر از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{وزن نمونه اولیه}) / (\text{وزن خاکستر}) = \text{خاکستر } (\%)$$

به منظور سنجش محتوی پروتئین نمونه (کیتین و پوسته‌ی میگو)، به نمونه (۰/۰۵ گرم)، سدیم هیدروکسید ۵ درصد اضافه شد (۱۰ میلی لیتر) و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد 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.

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

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

که  $X_O$  و  $X_R$  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 تحت فشار به قرص تبدیل شد و طیف FT-IR با اسکن در محدوده ۵۰۰ و ۴۰۰ بر سانتی‌متر حاصل گردید. نهایتاً، تجزیه و تحلیل 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 داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، 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 به‌طور کلی، اختلاف معنی‌داری بین میزان وزن خشک، پروتئین و خاکستر در نمونه‌های حاصل از روش‌های مختلف به کار گرفته شده در این مطالعه مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

**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*	$3/11 \pm 0/03^a$	$66 \pm 0/01^a$	$1/2 \pm 0/03^a$
روش اول	$1/30 \pm 0/11^c$	$18 \pm 0/01^c$	$0/64 \pm 0/01^b$
روش سوم	$0/83 \pm 0/02^d$	$10 \pm 0/02^d$	$0/16 \pm 0/02^d$
روش پنجم	$1/83 \pm 0/04^b$	$31 \pm 0/01^b$	$0/29 \pm 0/02^c$
شاهد ۲**	-	$40 \pm 0/01^a$	$0/81 \pm 0/04^a$
روش دوم	$1/74 \pm 0/07^b$	$37 \pm 0/01^b$	$0/11 \pm 0/05^c$
روش چهارم	$1/25 \pm 0/01^c$	$34 \pm 0/01^c$	$0/16 \pm 0/01^b$

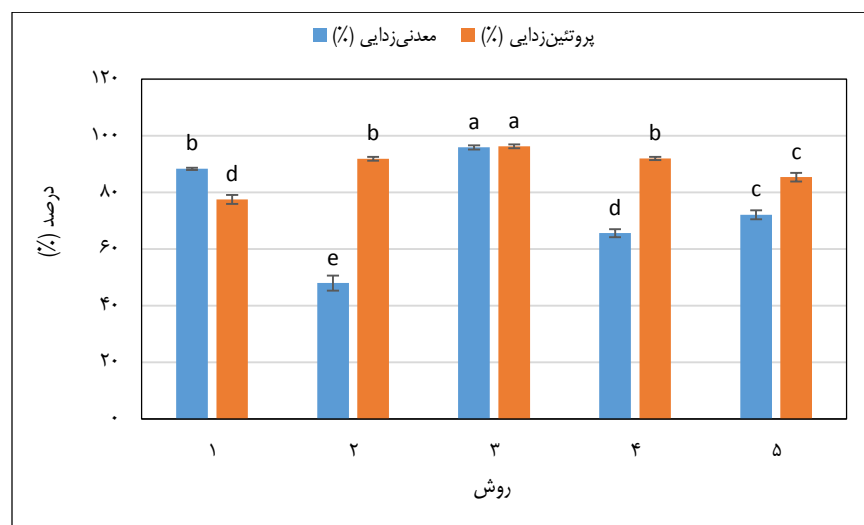
حروف یکسان، عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

\* پوسته‌ی شستشو داده شده با آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد

\*\* پوسته‌ی شستشو داده شده با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد

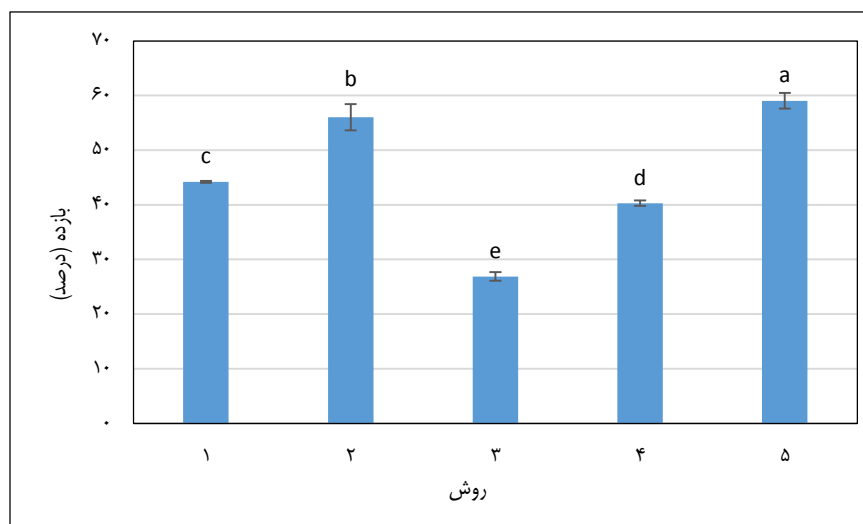
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است در تمامی روش‌های به کار گرفته شده جهت استخراج کیتین، خروج مواد معدنی و پروتئینی به میزان قابل توجهی مشاهده گردید. در بین روش‌های به کار گرفته شده، نمونه حاصل از روش سوم (استفاده از ماکزیمم مقدار اسید و باز جهت استخراج

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 قابل توجهی رسید که از نظر 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. به‌طور کلی نتایج آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین میزان این دو پارامتر در نمونه‌های حاصل از روش‌های شیمیایی مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۲: درصد معدنی زدایی و پروتئین زدایی در نمونه‌های حاصل از روش‌های پیش تیمار استیک اسید (۱)، استخراج با اسید و باز (۲)، رنگدانه زدایی با اتانول (۳)، رنگدانه زدایی با اتانول - استون (۴) 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 گرفته شده جهت استخراج کیتین، از نظر 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. از نظر آماری نیز در حالت کلی، اختلاف معنی‌داری بین بازده تولید در روش‌های مختلف مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳: بازده تولید کیتین در روش‌های پیش تیمار استیک اسید (۱)، استخراج با اسید و باز (۲)، رنگدانه‌زدایی با اتانول (۳)، رنگدانه‌زدایی با اتانول - استون (۴) و پیش تیمار دما (۵). حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

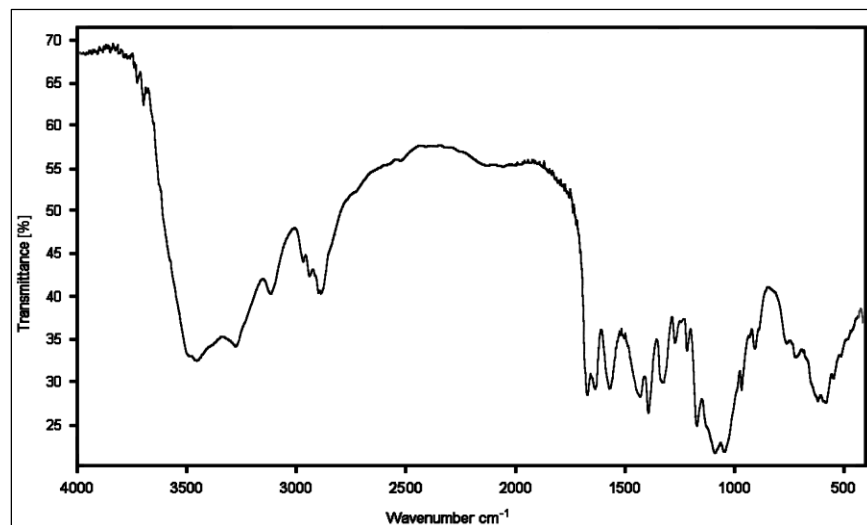
بنابراین، طبق نتایج به‌دست آمده، از بین ۵ روش شیمیایی به کار گرفته شده جهت استخراج کیتین، روش سوم با بالاترین درصد حذف مواد معدنی و پروتئینی، منجر به تولید کیتینی با خلوص بیش‌تر و روش پنجم منجر به تولید ماکزیم مقدار کیتین گردید. نتایج حاصل از بررسی بازده تولید کی توسان با روش‌های مختلف نیز، در جدول ۲ 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 گرفته شده در این مطالعه، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ).

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

روش	بازده (درصد)
گرماده‌ی حرارتی	$76/53 \pm 2/69^b$
اتوکلاو	$87/69 \pm 1/54^a$
مایکروویو	$43/84 \pm 2/31^c$

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  $3300 - 3400$  ترکیبی از پیک‌های مربوط به گروه‌های کششی O-H و پیوندهای درون‌مولکولی هیدروژنی‌اند و پیک  $1654$  در کی توسان مربوط به گروه‌های R-CO-NH<sub>2</sub> است.



شکل ۴: آنالیز FT-IR کی توسان.

### بحث و نتیجه گیری

بیوپلیمر کاتیونی کیتین، به طور مؤثری می تواند به وسیله 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 استخراج کننده املاح و پروتئین، هیدروکلریک اسید (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH) می باشند (غیاث الدین 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 به منظور 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 داده شده با آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به میزان قابل توجهی کم تر 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 می کند؛ به طوری که 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 در روش پیش تیمار اسید استیک و پیش تیمار دما با غلظت‌های یکسان سدیم هیدروکسید، پروتئین زدایی به میزان قابل توجهی متفاوت است (شکل ۲)؛ که این احتمالاً به این دلیل است که قرار دادن پوسته‌ها در دمای محیط به مدت ۴۸ ساعت و فاسد شدن آن‌ها قبل از تیمار اصلی (روش پیش تیمار دما)، باعث تجزیه‌ی بخش قابل توجهی از پروتئین‌های موجود در پوسته که با شستشو قابل جداسازی است، می شود. 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، می گردد. در واقع، این تیمار منجر به تبدیل کلسیم کربنات نامحلول به کلسیم کلراید محلول می شود که از طریق شستشو می تواند از محیط حذف گردد. طبق نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط مستقیمی بین غلظت هیدروکلریک



اسید و میزان معدنی زدایی مشاهده گردید؛ به طوری که 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، از نظر 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؛ به طوری که در غلظت‌های یکسان هیدروکلریک اسید در روش پیش تیمار اسید استیک (اول) و پیش تیمار دما (پنجم)، میزان معدنی زدایی در روش اول به ۸۸ درصد رسید که به‌طور قابل‌توجهی میزان این پارامتر را در روش 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 در نتیجه 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 ارگانسیم، تغییرات فصلی، نوع گونه و روش مورد استفاده، 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 این که 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 در روش 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 میکروویو، اتوکلاو و روش گرماده‌ی حرارتی استفاده گردید. در بین روش‌های مورد آزمایش، روش اتوکلاو و روش میکروویو 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؛ ماکزیم مقدار کی توسان در روش 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، از جمله 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.

## 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.، شجاع‌الساداتی، 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. 13<sup>th</sup> ed, Washington, DC, 1094 p.
- Aranaz, I., Mengibar, 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 by the 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.

- 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, *Iranian 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.

