



مقایسه ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی و تعیین خصوصیات کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) به دو شیوه مرسوم

پروا سفری^۱، اسحق زکی پور رحیم آبادی^{۲*}، محمدرضا واعظی جزء^۳، علی اصغر بهنام‌قادر^۴

۱. دانشجوی دکتری عمل‌آوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۳. دانشیار گروه پژوهشی مواد نانو، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

۴. دانشیار گروه پژوهشی مواد زیستی، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۷

چکیده

هدف از تحقیق حاضر، بررسی تاثیر روش‌های مختلف استخراج بر خصوصیات فیزیکی-شیمیایی و بررسی سایر خصوصیات کیتوزان استخراجی از ضایعات میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) بود. در این تحقیق، از دو روش مرسوم استخراج کیتین استفاده گردید. کیتین استحصال از ضایعات عمل‌آوری میگو به کیتوزان تبدیل شد. ویژگی‌های ساختاری و فیزیکی-شیمیایی کیتوزان به دست آمده از دو روش استخراجی، توسط فناوری‌های مختلف FTIR (طیف‌سنجی مادون قرمز فوری)، XRD (پراش اشعه‌ی ایکس)، و به علاوه میزان خاکستر، میزان حلالیت و درجه‌ی داستیلاسیون آن بررسی گردید. شاخص تبلور (%) کیتوزان حاصل از دو روش استخراج به ترتیب تقریباً ۳۴ و ۳۶ درصد به دست آمد. نتایج نشان داد که درجه‌ی داستیلاسیون کیتوزان حاصل از دو روش مرسوم به ترتیب ۹۴ و ۸۹ درصد بود که تفاوت چندانی نشان نداد. وجود گروه‌های آمین در کیتوزان‌های سنتز شده توسط طیف‌سنجی FTIR تأیید گردید.

واژگان کلیدی: کیتین، کیتوزان، درجه‌ی داستیلاسیون، FTIR، میگوی ببری سیاه.



Physico-chemical properties and characterization of chitosan extracted from *Penaeus monodon* wastes via two different conventional extraction method

Parva Safari¹, Eshagh Zakipour Rahimabadi^{2*}, Mohammadreza Vaezi³, Aliasghar Behnamghader⁴

1. PhD Student in Seafood Processing, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
2. Associated Professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
3. Associated professor, Research Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran
4. Associated professor, Research Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

Received: 05-Feb-2020

Accepted: 15-Mar-2021

Abstract

The aim of present study was to evaluate the effect of different extraction methods on physicochemical properties and characterization of chitosan extracted from waste of black tiger shrimp (*P. monodon*). For this purpose, the extracted chitin from by-products of shrimp processing plant was deacetylated to chitosan, which was soluble in dilute acid. Structural and physicochemical properties of chitosan were evaluated, with FTIR (Fourier infrared spectroscopy) and XRD (X-ray diffraction), and in addition the amount of ash, solubility and degree of deacetylation were evaluated. Crystallization index (%) of chitosan obtained by two different conventional methods was ~ 34% and 36%, respectively. The results showed that the degree of chitosan deacetylation obtained by conventional methods (Hydrochloric acid and acetic acid) were 94% and 89%, respectively, which did not show much difference. The presence of amine groups in the synthesized chitosan was confirmed by the FTIR spectrum.

Keywords: Chitin, Chitosan, Degree of deacetylation, FTIR, *Penaeus monodon*.

۱. مقدمه

عمل آوری میگو و سخت پوستان حجم زیادی از مواد زاید (محصولات ضمنی) را ایجاد می‌نماید. استفاده از مواد خام به دست آمده از عمل آوری آبزیان در صنعت تولید محصولات شیلاتی بسیار مهم است، زیرا می‌توان حداکثر بهره‌برداری اقتصادی، تغذیه‌ای و محیط زیستی را کسب نمود. از این مواد خام و زاید حاصل از عمل آوری آبزیان می‌توان در تولید محصولات بسیار با ارزش استفاده نمود. ضایعات میگو نیز شامل تعداد زیادی از مواد شیمیایی با ارزش از جمله پلیمر کیتین‌اند، برای مثال سر و کاراپاس میگو به طور متوسط حاوی ۱۷ در صد کیتین، ۴۱ در صد پروتئین و ۱۴۸ میکروگرم کاروتن در گرم بر مبنای وزن مرطوب است. به طور تقریبی ۳۵ تا ۴۵ درصد از وزن میگوی خام، هنگام عمل آوری و تبدیل آن به محصول فاقد سر به صورت ضایعات دور ریخته می‌شوند (Charoenvuttitham et al., 2006).

کیتین به لحاظ فراوانی در واقع دومین گروه فراوان از بیوپلیمرهای طبیعی بوده که در اسکلت خارجی سخت پوستان و همچنین دیواره سلولی قارچ‌ها، حشرات و دیاتومه‌های دریایی وجود دارد. کیتین را می‌توان هم‌چنین یکی از مشتقات سلولز دانست که در آن گروه هیدروکسیل در جایگاه C-2 توسط یک گروه آمینو استیل جایگزین گردیده است. متداول‌ترین فرم آن α -chitin است و همانند سلولز، این پلیمر طبیعی، یک پلی‌ساکاریدی ساختاری محسوب می‌شود (Abdou et al., 2008). کیتین دارای مشتقات متعددی است، که کیتوزان، اولیگومرهای کیتین و کیتوزان، گلوکزآمین و غیره از آن جمله‌اند (Venugopal, 2011). کیتوزان، یک پلیمر طبیعی، غیرسمی، زیست تخریب پذیر و یک کوپلیمر متشکل از گلوکزآمین و ان-استیل گلوکزآمین بوده که از فرایند داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید. کاربردها و پتانسیل‌های مطرح کیتین، کیتوزان و مشتقات آن‌ها بیشتر از ۲۰۰ مورد تخمین زده شده است. این ترکیب، دامنه گسترده‌ای از کاربردهای مختلف را در صنایع آرایشی-

بهداشتی، کشاورزی، غذایی، زیست‌داروها و بافت، به عنوان عامل‌های شلاته‌کننده، ارتوپدی، دندانپزشکی، مهندسی بافت، التیام زخم، انتقال دارو/ژن دارا ست (Khor and Lim, 2003; Charoenvuttitham et al., 2006). روش‌های مختلفی برای استخراج و استحصال کیتین و کیتوزان از منابع مختلف آبزیان گزارش گردیده است (Percot et al., 2003; Charoenvuttitham et al., 2006; Abdou et al., 2008; Radwan et al., 2012; De Queiroz Antonino et al., 2017). به طور کل، فرآیند تولید کیتین شامل خرد کردن پوسته، جدا کردن مواد معدنی و مواد پروتئینی و سپس رنگ‌بری محصول است. تولید یک محصول با کیفیت کیتین که دارای بالاترین وزن مولکولی و پایین‌ترین میزان محتوای خاکستر باشد به عوامل مختلفی بستگی دارد. برای تهیه کیتوزان نیز به طور معمول از استیل زدایی کیتین با هیدروکسید سدیم یا پتاسیم استفاده می‌گردد. کیفیت کیتوزان نیز به وزن مولکولی محصول و درجه استیل زدایی بستگی دارد. معمول‌ترین روش برای استخراج کیتین، فرایند شیمیایی است که شامل دو مرحله اصلی، حذف مواد معدنی توسط اسید و به دنبال آن حذف مواد پروتئینی توسط محیط قلیا می‌باشند که به طور مرسوم با تیمار پوسته‌ها در محلول‌های آبی NaOH و یا KOH انجام می‌شود. تاثیرگذاری پروتئین زدایی به دمای فرایند، غلظت قلیا و نسبت محلول به پوسته‌ها بستگی دارد. روش جایگزین فرایند شیمیایی، فرایند بیولوژیکی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای پروتئین زدایی نیز بررسی شده است. در مطالعات مختلف، برای حذف مواد پروتئینی از NaOH در غلظتی بین ۰/۵ تا ۳ نرمال و برای حذف مواد معدنی از HCl در غلظتی بین ۰/۵ تا ۶ نرمال استفاده گردیده است (Rinaudo, 2006; Mahdy Samar et al., 2013; Hajji et al., 2014; Kumari et al., 2017; Srinivasan et al., 2018). تحقیقات فوق به وضوح به تاثیر شرایط استخراج بر خصوصیات عملکردی کیتین و کیتوزان تاکید دارد. از آنجایی که از این ترکیبات در تولید محصولات بهداشتی، پزشکی، دارویی و غیره استفاده می‌گردد، لذا، شناخت خصوصیات ساختاری و خصوصیات فیزیکی- شیمیایی

۲.۲.۲. مرحله‌ی معدنی‌زدایی

ترکیب اصلی معدنی (غیرارگانیک) پوسته میگوها را کربنات کلسیم تشکیل می‌دهد که برای جدا سازی آن از یک اسید رقیق بهره گرفته شد تا از فرایند هیدرولیز کیتین جلوگیری به عمل آید.

همان‌طور که بیان گردید در این تحقیق از دو روش برای استخراج کیتین استفاده گردید. معدنی‌زدایی در روش اول، مطابق روش معمول در دمای اتاق و با استفاده از حمام اسید هیدروکلریک انجام گردید (Benhabiles et al., 2012; Hajji et al., 2014). در روش دوم جهت معدنی‌زدایی از ترکیب دو اسید ضعیف تر (ترکیب فرمیک/اسید سیتریک) (Charoenvuttitham et al., 2006). جهت ملاحظات زیست محیطی استفاده گردید.

تیمارها در دمای اتاق تحت هم‌زدن مداوم با استفاده از هم‌زن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰-۳۰۰ rpm صورت پذیرفتند. آزاد شدن گاز دی‌اکسید کربن به‌عنوان اندیکاتوری تقریباً مهم برای انجام واکنش مد نظر قرار گرفت (Hajji et al., 2014). نمونه‌های معدنی‌زدایی شده با یک جداکننده از محلول اسیدی جدا شد و پس از چندین بار شست‌وشو با آب به اسیدیته‌ی خنثی رسیدند. باقیمانده‌های خنثی شده در یک آون با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در طول شب قرار داده شدند. میزان معدنی‌زدایی با اندازه‌گیری میزان خاکستر در نمونه‌ها محاسبه گردید.

۲.۲.۳. مرحله‌ی پروتئین‌زدایی

پروتئین‌زدایی با استفاده از تیمار محلول قلیایی سدیم هیدروکسید در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گردید. هر تیمار به مدت ۱ ساعت انجام شد. برای بررسی ادامه‌ی مراحل پروتئین‌زدایی، از روش بیورت استفاده شد. نمونه‌ها بعد از جداسازی توسط یک فیلتر جداکننده، با آب به اسیدیته‌ی خنثی رسید. بعد از این مرحله نمونه‌ها در آون خشک گردید. در این مرحله کیتین جدا شده از پوسته‌های میگو به رنگ زرد روشن تا سفید بود که نشان از

کیتوزان حاصله جهت بهبود کیفیت محصول و تولید ماده اولیه با کیفیت در تولیدات پزشکی دارای اهمیت است. در تحقیق حاضر، ویژگی‌های فیزیکو-شیمیایی و خصوصیات ساختاری کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین میگوهای پرورشی در کشور، به منظور بررسی کیفیت آن جهت تولید محصولات مختلف بهداشتی و پزشکی مورد مطالعه قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد شیمیایی

اسید هیدروکلریک (۳۷٪)، اسید استیک (۹۹٪)، سدیم هیدروکسید (گرانول)، اتانول و تمامی مواد شیمیایی در این مطالعه از نوع آزمایشگاهی با خلوص نزدیک صد درصد، ساخت شرکت‌های مرک، سیگما و مجللی تهیه گردید.

۲.۲. مراحل مختلف کار جهت تهیه کیتین

۲.۲.۱. پیش تیمار مواد خام

در این تحقیق، از ضایعات پوسته میگوی ببری سیاه (*P. monodon*) برای استخراج کیتین استفاده گردید. مواد خام به صورت جامد از کارخانه‌ی فرآوری آبزیان تهیه گردید، پوسته‌ها با آب گرم شیر شست‌وشو داده شد تا تمامی مواد ارگانیک و پروتئین‌های چسبیده و دیگر ناخالصی‌ها از ضایعات، شست‌وشو و پاک‌سازی شود. در مرحله‌ی بعد به منظور زدودن تمامی بافت‌ها چسبیده، پوسته‌ها به مدت چندساعت در آب جوشیده شد. سپس در دمای اتاق آبگیری گردید (Abdou et al., 2008; Benhabiles et al., 2012). در مرحله بعد پوسته‌ها در آون ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا خشک و شکننده شده و همچنین ساختار کریستاله‌ی کیتین تخریب گردد. پوسته‌های خشک شده با خردکن الکتریکی (مولینکس، مدل A320R1) به قطعات کوچک و سپس پودر تبدیل گردید.

۲.۳.۲. تعیین میزان حلالیت کیتوزان

حلالیت کیتوزان در محلول رقیق اسیداستیک ۱ درصد در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برر سی گردید. کیتوزان استحصال شده در اسیداستیک ۱ درصد حل گردید (Rinaudo, 2006).

$$\text{درصد حلالیت} = \frac{\text{وزن کیتوزان حل‌نشده} - \text{کیتوزان اولیه}}{\text{وزن کیتوزان اولیه}} \times 100 \quad (\text{معادله ۲})$$

۲.۳.۳. طیف سنجی مادون فوریه (FTIR)

طیف نمونه‌های کیتوزان توسط یک دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه (مدل Perkin-Elmer 2000) با استفاده از قرص‌های KBr در دامنه فرکانسی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد. درجه‌ی داستیلاسیون نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر FTIR محاسبه گردید. از شدت جذب باندها در طیف 1655 cm^{-1} (باند آمید) همراه با طیف 3450 cm^{-1} (باند هیدروکسیل) به عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید. درجه‌ی داستیلاسیون نمونه‌ها با استفاده از طیف‌های شناسایی شده و براساس معادله‌ی Baxter محاسبه گردید (El Knidri et al., 2016).

(معادله ۳)

$$DD=100-[A_{1655}/A_{3450} \times (100/1.33)]$$

A_{1655} و A_{3450} طیف‌های جذبی بود که به ترتیب بیانگر باند آمید I به عنوان مقیاسی از محتوای گروه‌های اناستیل و باندهای هیدروکسیل‌اند.

۲.۳.۴. پراش اشعه ایکس (XRD)

مشخصه‌نمایی پلیمر با استفاده از پراش‌گر اشعه‌ی ایکس در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و ۴۰ میلی‌آمپر انجام گردید. شدت نسبی در محدوده‌ی پراکندگی 2θ ، ۵-۴۰ درجه ثبت شد. خطای این روش ± 1 درجه است. تبلور نسبی پلیمر براساس تقسیم پیک‌های کریستالی به مناطق کلی زیر منحنی محاسبه گردید (Hajji et al., 2014).

رنگدانه‌زدایی کافی داشت. محتوای کیتین از اختلاف وزن مواد خام و میزان کیتین به دست آمده از تیمارهای اسیدی و قلیایی محاسبه گردید (Benhabiles et al., 2012).

۲.۲.۴. مرحله‌ی رنگ‌زدایی

باقیمانده‌ی مواد تحت عنوان کیتین در نظر گرفته شد و با نسبت ۱:۱۰ با حلال استون به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید، پس از خشک شدن در دمای اتاق با محلول ۰.۳۱۵ درصد NaOCl به مدت ۵ دقیقه با نسبت مشابه شست‌وشو داده شد. کیتین رنگ‌زدایی شده شسته و به مانند مراحل قبلی فیلتر گردید، محصول نهایی به رنگ زرد بسیار روشن تا سفید بود (Hajji et al., 2014).

۲.۲.۵. مرحله‌ی استیل‌زدایی کیتین و تولید کیتوزان

داستیلاسیون با انجام فرایند رفلکس در محلول غلیظ سدیم هیدروکسید تحت فشار اتمسفر نرمال انجام گردید. فرایند داستیلاسیون در یک حمام آبی با دمای ۹۰-۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت و با شدت ۳۰۰ rpm هم‌زدن، انجام گردید. ماده‌ی نهایی فیلتر گردید، با آب و در صورت لزوم با الکل ۸۰ درصد (v/v) شست‌وشو داده شد تا به اسیدیته‌ی خنثی برسد. سپس در یک آون در طول شب با دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک گردید (Abdou et al., 2008).

۲.۳. ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی کیتوزان

۲.۳.۱. تعیین میزان خاکستر و بازده محصول

میزان خاکستر (%/ براساس روش AOAC (1995) محاسبه گردید. میزان بازده کیتوزان، از نسبت میزان گرم تبدیل کیتین به کیتوزان بر اساس معادله زیر محاسبه گردید (Kucukgulmez et al., 2011; Shin et al., 2019).

(معادله ۱) = درصد بازده

$$= \frac{\text{وزن کیتین حل‌نشده} - \text{وزن کیتوزان}}{\text{وزن کیتین اولیه}} \times 100$$

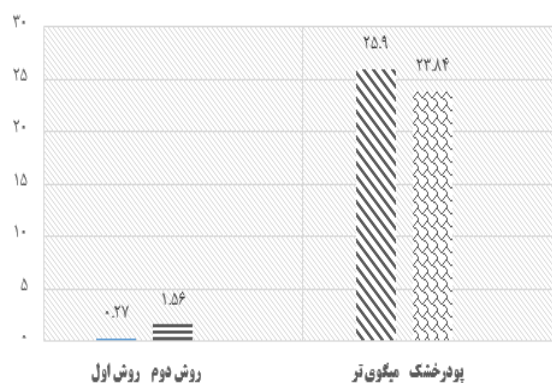
(El Knidri et al., 2016).

۳. نتایج

۳.۱. میزان خاکستر

نتایج اندازه‌گیری میزان خاکستر نمونه‌های خام و کیتوزان استحصال‌شده به دو روش مذکور در نمودار ۱ آورده شده است. میزان خاکستر نمونه‌های کیتوزان در روش اول و روش دوم، به ترتیب $0.27 \pm 0.27\%$ و $1.56 \pm 0.20\%$ درصد بود که براساس آنالیزهای آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$).

%میزان خاکستر تیمارهای کیتوزان و مواد خام اولیه



نمودار ۱: میزان خاکستر مواد خام و کیتوزان‌های استخراج‌شده از میگوی ببری سیاه (*P. monodon*): روش اول (استخراج اسید کلریدریک)، روش دوم (استخراج ترکیب اسید سیتریک/اسیدفرمیک)

۳.۲. طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه

نتایج طیف‌سنجی FTIR کیتوزان به دست آمده از دو روش در شکل (۱) نشان داده شده است. ساختار کیتوزان تولیدشده توسط آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه تأیید شد.

۳.۳. درجه استیل‌زدایی

میزان درجه‌ی استیل‌زدایی با توجه به آنچه در بخش روش کار آورده شده است، محاسبه گردید که با استفاده از نسبت باندهای 1655 cm^{-1} و 3450 cm^{-1} به دست آمد. براساس معادله‌ی Baxter، درجه‌ی استیل‌زدایی در روش اول و دوم به ترتیب $93.9 \pm 0.8\%$ و $88.1 \pm 1.8\%$ محاسبه گردید.

۳.۴. میزان بازده محصول کیتوزان

میزان بازده کیتوزان از پوسته‌های خشک میگوی ببری سیاه *P. monodon* پس از فرایند استیل‌زدایی در روش اول و دوم، نسبت به ماده‌ی خشک به ترتیب، $38.5 \pm 0.1\%$ و $34.9 \pm 1.6\%$ بوده است (نمودار شماره ۲) که میزان اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$).

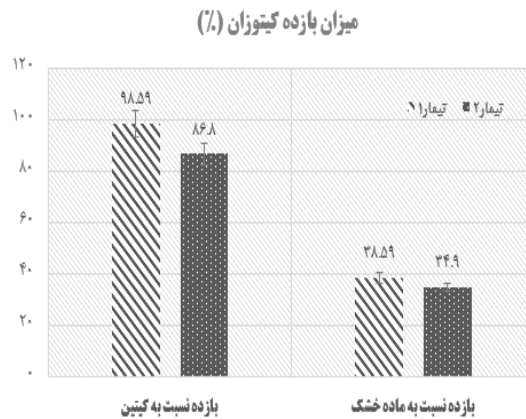
۳.۵. انحلال‌پذیری کیتوزان

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتوزان استحصال‌شده از روش‌های مختلف در جدول ۱ آورده شده است. ماده‌ی حاصل از استیل‌زدایی یعنی کیتوزان در هر دو روش، به طور کامل در محلول اسیداستیک ۱٪ حل گردید.

۳.۶. پراش اشعه‌ی ایکس

آنالیز XRD برای بررسی و شناسایی کیتوزان استخراج شده از میگوی *P. monodon* استفاده گردید. همچنین

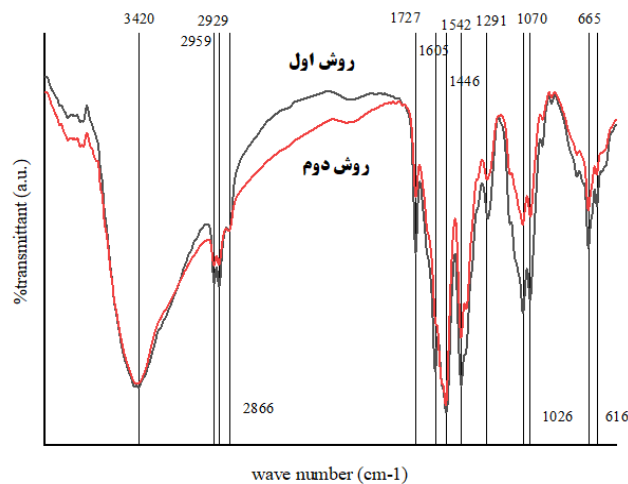
میزان تبلور نسبی کیتوزان‌های استخراجی به تفکیک محاسبه شد که در جدول شماره (۱) ارائه گردیده است. در شکل ۲، الگوی پراش اشعه‌ی ایکس کیتوزان‌های استخراج شده آورده شده است.



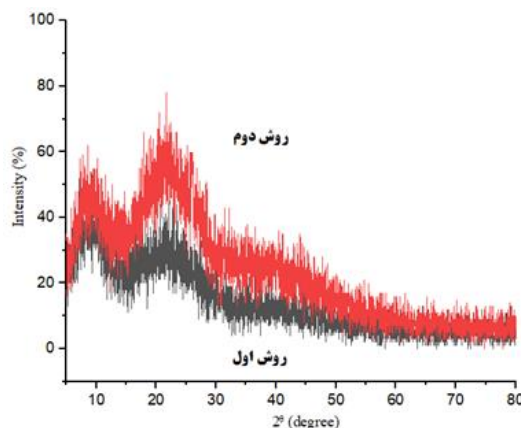
نمودار ۲: میزان بازده استحصال کیتوزان نسبت به کیتین و نسبت به ماده‌ی خشک اولیه از میگوی ببری سیاه (*P.monodon*): روش اول (استخراج اسیدکلریدریک)، روش دوم (استخراج ترکیب اسید سیتریک/اسیدفرمیک)

جدول ۱ - میزان داستیلاسیون و خصوصیات عملکردی کیتوزان استخراجی از میگوی ببری سیاه

| روش دوم | روش اول | کیتوزان (استخراج مرسوم) |
|---------------------|---------------------|-------------------------------------|
| ۳۶ ~ | ۳۴ ~ | میزان تبلور (%) |
| $89/84 \pm 0/05^b$ | $93/16 \pm 0/03^a$ | درجه داستیلاسیون (%) |
| ۱۰۰ / غیرقابل توزین | ۱۰۰ / غیرقابل توزین | میزان حلالیت/میزان مواد حل نشده (%) |



شکل ۱ - طیف‌های FTIR کیتوزان استخراج شده از میگوی ببری سیاه به دو روش مرسوم استخراج



شکل ۲- نمودارهای XRD کیتوزان‌های استخراج شده از میگوی ببری سیاه به دو روش استخراج مرسوم

کاهش دهد (Mohanasrinivasan *et al.*, 2014).

۴.۲. میزان بازده محصول کیتوزان

Hajji و همکاران (۲۰۱۴) میزان بازده کیتین و کیتوزان را از ضایعات پوسته میگوی *P. monodon* به ترتیب ۳۰ و ۳۵ درصد گزارش نمودند که براساس بازده کیتین نسبت به وزن کلی پوسته‌های خشک میگو محاسبه گردید. این میزان پس از فرایند داستیلاسیون در محدوده‌ی ۳۵ درصد گزارش شد (Hajji *et al.*, 2014). این میزان با مقادیر محاسبه شده در این مطالعه نیز همخوانی داشت. از مسائل مهم مرتبط با تهیه کیتین خالص، حفظ ساختار بود که تا حد امکان به فرم طبیعی آن نزدیک باشد تا میزان داستیلاسیون جزئی و تخریب زنجیره ناشی از معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی را در طول فرایند تیمار مواد خام، به حداقل برساند (Srinivasan *et al.*, 2018). میزان پروتئین‌زدایی بستگی به غلظت سدیم‌هیدروکسید و بازه‌ی زمانی داشت و با افزایش نسبی این شاخص‌ها، افزایش نشان داد. میزان پروتئین‌زدایی در مطالعه‌ی Benhabiles و همکاران (۲۰۱۲) در حالت بهینه‌ی شرایط تا ۹۶ درصد گزارش گردیده است. این نتایج می‌تواند به دلیل آن باشد که پروتئین توسط باندهای کوالانسی به کیتین متصل است و کمپلکس پایداری را تشکیل می‌دهد که رسیدن به بازه‌ی ۱۰۰ درصد را مشکل می‌نماید (Benhabiles *et al.*, 2012).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۴.۱. میزان خاکستر

میزان خاکستر نمونه‌های کیتوزان استحصال شده به شیوه‌ی مرسوم در روش اول و روش دوم، کم و به ترتیب ۰/۲۷ و ۱/۵۶ درصد بود. گزارش گردیده است که کیتوزان با درجه تجاری می‌بایست میزان خاکستری کمتر از ۱ درصد داشته باشد (Benhabiles *et al.*, 2012)، که این میزان با نمونه‌ی استخراج شده در روش اول در این مطالعه هم‌خوانی دارد. میزان خاکستر روش دوم مقادیر بیشتری را نشان می‌دهد که این می‌تواند به طور مستقیم در رابطه با نوع اسیدهای به‌کار رفته در فرایند معدنی‌زدایی ماده باشد. به‌علاوه در روش دوم از غلظت‌های پایین اسیدها استفاده گردید که با افزایش غلظت، امکان افزایش کارایی وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که در فرایند معدنی‌زدایی با اسید جایگزین، افزودن اسید سیتریک در ترکیب با دیگر اسیدهای ارگانیک مانند اسیدفرمیک و اسیداستیک در نسبت‌های مختلف می‌تواند میزان بازده را به سطح قابل قبولی در مقایسه با اسیدهیدروکلریک برساند (Charoenvuttitham *et al.*, 2006). میزان خاکستر کیتوزان به طور عمده متأثر از مواد اولیه و ترکیب آن‌ها دارد. میزان خاکستر پایین می‌تواند دلیلی برای میزان حلالیت بهتر کیتوزان باشد. مقادیر بالای خاکستر می‌تواند ویسکوزیته و متوسط وزن مولکولی را

۴.۳. انحلال پذیری کیتوزان

این فاکتور به مفهوم میزان بالای داستیلاسیون کیتین اولیه است که کیفیت بالاتری از کیتوزان را نشان می‌دهد (Abdou *et al.*, 2008). انحلال‌پذیری کیتوزان یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای سنجش کیفیت کیتوزان است. کیفیت کیتوزان نیز بسته به درجه‌ی داستیلاسیون آن داشته که به‌طور متقابل میزان انحلال‌پذیری را تحت تأثیر قرار خواهد داد (Kumari *et al.*, 2017). همکاران (Kumari *et al.*, 2017) میزان داستیلاسیون نمونه‌های استحصالی از ماهی، میگو و خرچنگ را به ترتیب ۷۵، ۷۸ و ۷۰ درصد گزارش کردند که میزان انحلال‌پذیری آن‌ها به ترتیب ۶۰، ۷۸ و ۷۰ درصد به‌دست آمد. انحلال‌پذیری کیتوزان تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله دما و زمان داستیلاسیون، غلظت قلیا، نسبت کیتین به محلول قلیایی و اندازه‌ی ذرات تغییر می‌کند (Hossain and Iqbal, 2014). انحلال‌پذیری کمتر کیتوزان، می‌تواند به دلیل نا کامل بودن فرایند داستیلاسیون باشد. انحلال کیتوزان وابسته به حذف گروه‌های استیل در فرایند داستیلاسیون خواهد بود و میزان داستیلاسیون کمتر می‌تواند اثرات تداخلی معکوسی بر نتایج داشته باشد (Austin *et al.*, 1981; Mahdy Samar *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2017).

۴.۴. طیف سنجی مادون قرمز فوریه

پیک‌های FTIR در 3441 cm^{-1} ، 2918 cm^{-1} ، 1603 cm^{-1} و 1624 cm^{-1} ، 1593 cm^{-1} ، 1420 cm^{-1} ، 1362 cm^{-1} و 1010 cm^{-1} به ترتیب مربوط به تغییر شکل زاویه‌ای OH موجود در ساختار کیتوزان، کشش CH-، حرکت‌های لرزشی آمید I، لرزش خمشی NH- در گروه آمین، لرزش OH، CH در حلقه، باندهای اولیه، ثانویه و سوم NH- و کشش C-O در استامید، می‌باشند. در مطالعه حاضر، در هر دو روش استخراج، باندهای مشخصه‌ی کیتوزان، پیک‌های لازم را نشان داده و مشخص نمود که تغییر در اسید در مشخصه‌های طیف‌سنجی مربوط به کیتوزان استحصال‌شده تغییری ایجاد ننموده است و وجود گروه‌های عاملی را در هر دو روش تأیید نموده است.

باندهای مشابهی در گستره‌ی طیف مربوط به ساختار کیتوزان در میگو گزارش شده است. در مطالعه‌ی Mohanasrinivasan و همکاران (2014) طیف FTIR کیتوزان باند جذب گسترده‌ای در ناحیه‌ی 3450 cm^{-1} نشان داد که پاسخی به حرکت کششی آب و هیدروکسیل‌ها و NH گروه‌های آمینی آزاد می‌باشد. باند مشاهده شده در 2924 cm^{-1} و 2852 cm^{-1} مربوط به کشش خمشی CH_3 و CH_2 در کیتوزان می‌باشد. پیک قوی در اطراف 1629 cm^{-1} که مرتبط با لرزش خمشی NH_2 بوده که ویژگی مشخصه‌ی پلی ساکارید کیتوزان نشان از وقوع فرایند استیل‌زدایی دارد (Mohanasrinivasan *et al.*, 2014). طیف FTIR کیتوزان نشان می‌دهد که باندهای جذب شده در 3380 cm^{-1} ، 3400 cm^{-1} ، 3270 cm^{-1} ، 3290 cm^{-1} و 2960 cm^{-1} ، 2870 cm^{-1} مرتبط با نواحی کششی OH، NH و CH کیتوزان بوده که با بررسی شکل ۱ وجود باندهای ساختاری در کیتوزان استحصالی در هر دو روش اول و دوم مشخص گردیده است. باندهای موجود در اطراف پیک‌های 1654 cm^{-1} ، 1550 cm^{-1} و 1307 cm^{-1} به ترتیب مرتبط با آمید I، II و III می‌باشد، درحالی‌که باندهای مشخصه‌ی ساختارهای ساکاریدی در اطراف 1153 cm^{-1} پدیدار می‌گردند. کشش نامتقارن پل C-O-C و کشش C-O ساختار، در طیف 1010 cm^{-1} و 1065 cm^{-1} بوده که براساس آنچه در مقالات آمده است، می‌باشد (El Knidri *et al.*, 2016). Srinivasan و همکاران (2018) نشان دادند که کیتوزان میگوی *P. longirostris* پیک‌های مشخصه‌ی خود را در 3428 cm^{-1} ، 2921 cm^{-1} ، 1636 cm^{-1} ، 1420 cm^{-1} و 1096 cm^{-1} نشان می‌دهد و تبدیل کیتین به کیتوزان با افزایش گروه‌های عملکردی NH_2 (708 cm^{-1} ، 1572 cm^{-1} و 3111 cm^{-1}) و کاهش گروه‌های عملکردی C=O ($1661,7\text{ cm}^{-1}$) همراه است (Srinivasan *et al.*, 2018).

۴.۵. درجه‌ی استیل‌زدایی

درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان فاکتور بسیار مهمی است، زیرا این فاکتور می‌تواند ویژگی‌های فیزیکی،

از دیگر فاکتور هایی که می‌توانند میزان درجه‌ی استیل‌زدائی را تحت تأثیر قرار دهند می‌توان به منبع، نوع گونه‌ی سخت‌پوست و روش‌های آماده‌سازی اشاره نمود. این عوامل می‌توانند درجه‌ی استیل‌زدائی را در محدوده‌ای بین ۵۶-۹۹٪ قرار دهد که دارای میانگینی در حدود ۸۰٪ می‌باشد (Mohanasrinivasan et al., 2014; Kumari et al., 2017). میزان درجه‌ی استیل‌زدائی کیتوزان‌هایی که به‌طور تجاری در دسترس می‌باشند مقادیری بین ۷۵ تا ۸۵٪ داشته و بسته به فاکتورهای ذکرشده، درجه‌ی استیل‌زدائی می‌تواند مقادیری کمتر یا بیشتر از این محدوده داشته باشد (Mohanasrinivasan et al., 2014).

۴.۶. پراش اشعه‌ی ایکس

برای بررسی ساختار آلفا-کیتین، تحلیل پراش اشعه‌ی ایکس مورد استفاده قرار می‌گیرد. همانطور که مشخص گردیده است هر دو نمونه‌ی پیک‌های شاخص کیتوزان را به خوبی نشان می‌دهند. این پیک‌ها در $21/71^\circ$ و $9/65^\circ$ درجه 2θ پدیدار شده‌اند، که مطابقت بسیار خوبی را در هر روش جهت تأیید استحصال کیتوزان نشان می‌دهد. همانطور که از شکل ۲ مشخص می‌باشد الگوی پراش هر دو روش پیک‌های انکساری پهن مربوط به کیتوزان را در 20° ، در 10° و 20° درجه نشان می‌دهد که اثر انگشت‌های ساختار نیمه‌کریستالی کیتوزان می‌باشد که مرتبط با کریستال I و کریستال II در ساختار کیتوزان می‌باشد (Mohanasrinivasan et al., 2014). در گزارش‌های علمی، بسیاری از الگوهای XRD مربوط به نمونه‌های کیتین و کیتوزان را با دو پیک مشخص در 20° ، حول و حوش $9-10^\circ$ درجه و 20° اطراف $21-20^\circ$ درجه و رفلکس‌های اندکی در مقادیر بالاتر 20° مانند $26/4^\circ$ و بالاتر نشان می‌دهند. باند $9/9^\circ$ در ارتباط با فاصله‌ی d به اندازه‌ی $8/92^\circ$ آنگستروم بوده که به سبب مشارکت اتصال مولکول‌های آب در داخل شبکه‌ی کریستال می‌باشد. رفلکس در 20° ، محدوده‌ی $20-19/4^\circ$ درجه، مرتبط با فاصله‌ی d به اندازه $4/41^\circ$ آنگستروم می‌باشد. گزارش شده باند 20° در $9/9^\circ$ بعد

شیمیایی و بیولوژیکی کیتوزان مانند مشخصه‌های الکترواستاتیک، زیست‌تخریب‌پذیری، خواص جذب و قابلیت شلاته‌کنندگی آن را تحت تأثیر قرار دهد. درجه‌ی استیل‌زدائی اغلب میزان گروه‌های آمینی آزاد در پلی‌ساکاریدها را تعیین می‌کند. در این مطالعه از طیف‌سنجی FTIR برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدائی کیتوزان استخراج شده، استفاده گردید. محاسبه‌ی درجه استیل‌زدائی کیتوزان استخراج‌شده از ضایعات پوست میگو براساس معادله‌ی Baxter، $81/5\%$ گزارش گردید (El Knidri et al., 2016). به‌علاوه، درجه‌ی استیل‌زدائی کیتوزان استحصال شده از طریق روش طیف‌سنجی، 78% گزارش گردید (Kumari et al., 2017). Mohanasrinivasan و همکاران (۲۰۱۴)، درجه‌ی داستیلاسیون نمونه‌ی کیتوزان ضایعات میگو را $72/82\%$ درصد گزارش نمودند (Mohanasrinivasan et al., 2014). مقایسه‌ی میزان درجه‌ی استیل‌زدائی بین تیمارهای مطالعه و سایر محققین نشان می‌دهد هرچند میزان اختلاف درجه‌ی استیل‌زدائی بین روش اول و دوم معنی‌دار بوده ($p < 0/05$)، اما هنوز مقادیر به‌دست آمده در هر دو روش از مقدار بسیار خوبی برخوردار بوده و با سایر مطالعات همخوانی نشان می‌دهد و تغییر اسید میزان درجه‌ی داستیلاسیون را تحت تأثیر قرار نداده است. بر اساس آنچه در مقالات علمی آمده است گروه‌های استیل می‌بایست توسط هیدرولیز پلی‌ساکارید حذف گردند و این فرایند نیازمند به‌کارگیری روش‌های قلیایی جهت استیل‌زدائی می‌باشد. این فرایند شامل حذف گروه‌های استیل از کیتین بوده که در ناحیه‌ی پشتی یک گروه آمینه‌ی کامل ($-NH_2$) قرار دارد (Kumari et al., 2017). گروه‌های استیل متصل در کیتین به سختی برداشته و حذف می‌گردند. بنابراین نیازمند مقادیر بالای غلظت سدیم/پتاسیم هیدروکسید، دماهای بالا و زمان مناسب می‌باشد. بسیاری از مقالات گزارش کردند که استحصال کیتوزان با درجه بالاتر استیل‌زدائی نیاز به غلظتی در حدود 60% دارد (Kumar et al., 2004; Kurita, 2006; Rinaudo, 2006).

که نشان دهنده درصد پایین مواد معدنی می‌باشد.

۴.۷. نتیجه گیری

کیتوزان با استفاده از دو روش که شامل تغییر اسید هیدروکلریک در روش اول به ترکیب اسیدسیتریک/اسیدفرمیک در روش دوم بود، استخراج گردید. کیتوزان استحصال از هر دو روش ویژگی ساختاری و فیزیکی شیمیایی مشخصه کیتوزان را نشان دادند. بررسی آنالیزهای مختلف از جمله FTIR و XRD این موضوع را تأیید نمود. همچنین هر دو نمونه میزان حلالیت بسیار خوبی را نشان دادند. بررسی میزان درجه‌ی استیلایون، بازده و میزان مواد معدنی تفاوت‌های اندک، اما معنی‌داری را در مقایسه‌ی بین دو نمونه نمایان نمود و نشان داد که روش اول و استفاده از اسید هیدروکلریک نتایج بهتری داشته است، اما این تفاوت نمی‌تواند کارایی نمونه‌ی روش دوم را نادیده بگیرد. بنابراین این مطالعه پیشنهاد می‌کند محققین توجه بیشتری را نسبت به اسیدهای آلی معطوف داشته که بتواند جایگزین مناسبی برای اسید هیدروکلریک که دارای معضلات عدم تطابق با معیارهای زیست‌محیطی است، باشد.

از فرایند استیل‌زدائی کاهش می‌یابد که با کاهش چشمگیری در درصد تبلور همراه است (Abdou *et al.*, 2008; El Knidri *et al.*, 2016) و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که کیتوزان میگو پیک مشخصه‌ی خود را در ۲۰ درجه نشان می‌دهد (Kumari *et al.*, 2017). آن‌ها میزان تبلور کیتوزان استخراجی را ۸۲٪ گزارش نمودند. به‌علاوه El Knidri و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش کردند که کیتوزان استخراج شده دارای دو پیک مشخصه‌ی تبلور در ۱۰/۹۹-۱۰/۱۰ درجه و ۱۹/۹۸-۲۰/۲۱ درجه در ۲^θ می‌باشند (El Knidri *et al.*, 2016). همچنین گزارش گردیده است که کیتوزان دارای دو پیک ۲۰/۲ و ۲۲/۴ در ۲^θ می‌باشد (Kucukgulmez *et al.*, 2011). دلیل اینکه کیتوزان‌های مختلف، پیک‌های مشخصه‌ی متفاوتی نشان می‌دهند، می‌تواند وابسته به منبع کیتین باشد (Sagheer *et al.*, 2009; El Knidri *et al.*, 2016). پیک XRD در ۳۵ درجه مرتبط با ترکیبات $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ می‌باشد که یک ماده شیمیایی مرتبط با ترکیبات معدنی استخوان و بافت‌های سخت در جانوران است. پیک خیلی کوچک در ۳۰ درجه نیز می‌تواند در الگوی XRD پوسته‌های میگو مشاهده گردد.

References

۵. منابع

- Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., Elsabee, M.Z., 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99, 1359-1367.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E., Zikakis, J.P., 1981. Chitin: New facets of research. *Science* 212, 749.
- Benhabiles, M.S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A., Mameri, N., 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids* 29, 48-56.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569-3580.
- Charoenvuttitham, P., Shi, J., Mittal, G.S., 2006. Chitin Extraction from Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Waste using Organic Acids. *Separation Science and Technology* 41, 1135-1153.
- De Queiroz Antonino, R.S., Lia Fook, B.R., De Oliveira Lima, V.A., De Farias Rached, R.Í., Lima, E.P., Da Silva Lima, R.J., Peniche Covas, C.A., Lia Fook, M.V., 2017. Preparation and Characterization of Chitosan Obtained from Shells of Shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine Drugs* 15.

- El Knidri, H., Dahmani, J., Addaou, A., Laajeb, A., Lahsini, A., 2019. Rapid and efficient extraction of chitin and chitosan for scale-up production: Effect of process parameters on deacetylation degree and molecular weight. *International Journal of Biological Macromolecules* 139, 1092-1102.
- El Knidri, H., El Khalfaouy, R., Laajeb, A., Addaou, A., Lahsini, A., 2016. Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. *Process Safety and Environmental Protection* 104, 395-405.
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., Jellouli, K., 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules* 65, 298-306.
- Hossain, M., Iqbal, A., 2014. Production and characterization of chitosan from shrimp waste. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 12, 153-160.
- Khor, E., Lim, L.Y., 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24, 2339-2349.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H., Kadak, A.E., 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*.
- Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J., 2004. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews* 104, 6017-6084.
- Kumari, S., Kumar Annamareddy, S.H., Abanti, S., Kumar Rath, P., 2017. Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules* 104, 1697-1705.
- Kurita, K., 2006. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology* 8, 203.
- Mahdy Samar, M., El-Kalyoubi, M.H., Khalaf, M.M., Abd El-Razik, M.M., 2013. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences* 58, 33-41.
- Minke, R., Blackwell, J., 1978. The structure of α -chitin. *Journal of Molecular Biology* 120, 167-181.
- Mohanasrinivasan, V., Mishra, M., Paliwal, J.S., Singh, S.K., Selvarajan, E., Suganthi, V., Subathra Devi, C., 2014. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. *3 Biotech* 4, 167-175.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A., 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules* 4, 12-18.
- Radwan, M.A., Farrag, S.A.A., Abu-Elamayem, M.M., Ahmed, N.S., 2012. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils* 48, 463-468.
- Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
- Sagheer, F.A.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers* 77, 410-419.
- Shin, C.-S., Kim, D.-Y., Shin, W.-S., 2019. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 125, 72-77.
- Srinivasan, H., Kanayairam, V., Ravichandran, R., 2018. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules* 107, 662-667.
- Venugopal, V., 2011. Marine polysaccharides: Food applications. CRC press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, USA, 372 pages.