وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان:

استحصال کیتین وکیتوزان از پوسته سیست آرتمیا ارومیانا با روش های بیولوژیکی و شیمیایی

مجری :
یوسفعلی اسدپور

شماره ثبت
٤٧٦٦٨

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

عنوان پروژه : استحصال کیتین وکیتوزان از پوسته سیست آرتمیا ارومیانا با روش های بیولوژیکی وشیمیایی
شماره مصوب پروژه : ۹۲۱۴۹-۱۲-۷۹-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : یوسفعلی اسدپور
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : یوسفعلی اسدپور
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : احمد غرقی، عباسعلی مطلبی ، امین ایمانی فر ، سید عباس شجاع الساداتی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : اصغر خسرو شاهی اصل، محمد رضا کلباسی
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :
محل اجرا : استان آذربایجان غربی
تاریخ شروع : ۹۲/۱/۱
مدت اجرا : ۲ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : استحصال کیتین وکیتوزان از پوسته سیست آرتمیا ارومیانا با روش های بیولوژیکی وشیمیایی

کد مصوب : ۹۲۱۴۹-۱۲-۷۹-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۶۶۸ تاریخ : ۹۴/۶/۱۲

با مسئولیت اجرایی جناب آقای یوسفعلی اسدپور دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته فرآوری محصولات شیلاتی می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان در تاریخ ۹۴/۵/۵ مورد ارزیابی و رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در مرکز تحقیقات آرتمیای کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱-کلیات ۳
۱-۲- ساختمان شیمیایی کیتوزان ۶
۱-۳- مروری بر مطالعات پیشین ۹
۱-۴- سابقه روشهای مورد استفاده برای استخراج کیتین ۱۰
۱-۵- سابقه بکارگیری روش‌های زیستی ۱۲
۱-۶- سابقه استخراج کیتین و کیتوزان در ایران ۱۵
۱-۷- مروری به روشهای تعیین کیمیت و کیفیت کیتین و کیتوزان ۱۵
۲- مواد و روشها ۱۸
۲-۱- لوازم و دستگاههای مورد استفاده ۱۸
۲-۲- مواد مصرفی ۱۸
۲-۳- لوازم غیر مصرفی و دستگاههای مورد استفاده ۱۸
۲-۴- روش آزمایش‌های تعیین کیفیت کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا ۲۴
۲-۵- آنالیزهای تشخیص کیفیت مقایسه‌ای ۳ نوع کیتین ۲۵
۲-۶- روش شیمیایی بهینه تبدیل کیتین به کیتوزان ۲۶
۲-۷- روش آنالیزهای تعیین کیفیت کیتوزان ۲۶
۲-۸- روش آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت مقایسه‌ای ۲۶
۲-۹- روش زیستی استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان ۲۷
۲-۱۰- آزمایش تعیین کمیت و کیفیت کیتین استخراج شده با روش زیستی ۳۱
۲-۱۱-آزمایش‌های تعیین کمیت و کیفیت مقایسه‌ای چهار نوع کیتین و مقایسه آنها باهم ۳۱
۲-۱۲- روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان ۳۲
۲-۱۳- آنالیز تعیین کمیت و کیفیت کیتوزان حاصله از روش زیستی ۳۴
۲-۱۴-آنالیز تعیین کمیت ۴ نمونه کیتوزان و مقایسه آن ها باهم ۳۴
۲-۱۵- روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها ۳۴
۳- نتایج ۳۵
۳-۱- نتایج تجزیه شیمیایی پوسته سیست آرتمیا ۳۵
۳-۲- نتایج تجزیه شیمیایی پوسته سیست آرتمیا ۳۵

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۳-۳- نتایج تعیین نوع و درصد ترکیب مواد معدنی تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا ۳۶
۳-۴- نتایج استخراج کتین به روش شیمیایی بهینه شده ۳۶
۳-۵- نتایج آنالیزهای تعیین کیفیت و کمیت ۴۰
۳-۶-نتایج تبدیل کیتین به کیتوزان با روش شیمیایی ۴۲
۳-۷- نتایج انجام آنالیزهای تشخیص کمی و کیفی مقایسه ای ۳ نوع کیتوزان ۴۵
۳-۸- نتایج روشهای زیستی ۴۷
۳-۹- نتایج حذف مواد پروتئینی به روش آنزیمی ۵۰
۳-۱۰- نتایج تبدیل کتین به کیتوزان با روش زیستی ۵۱
۳-۱۱- نتایج مقاسه دو نوع کتین استخراج شده با روش شیمیایی و زیستی ۵۴
۴- بحث ۵۷
۵- نتیجه گیری نهایی ۶۲
پیشنهادها ۶۵
منابع ۶۶
واژه نامه ۷۰
پیوست ۷۲
چکیده انگلیسی ۷۴

چکیده

کیتین وکیتوزان ۲ فرآورده بسیار مهم از بیوپلیمرهایی هستند که در صنایع مصارف بسیار بالایی دارند، ولی منابع تولید آنها بسیار محدود است، در این پژوهش از پوسته‌های سیست آرتمیا اورمیانا (*Artemia urmiana*) که در مرکز تحقیقات آرتمیای کشور طی سال های قبل جمع آوری و به مقدار زیاد انبار شده است، به مقدار ۲۰ کیلوگرم نمونه برداشت شده سپس این نمونه ها تمیز، جداسازی و خشک شد، برای استخراج کیتین وکیتوزان آنها به آزمایشگاه مرکز تحقیقات آرتمیای کشور منتقل شد،کیتین وکیتوزان آن ابتدا با روش های رایج شیمیایی در دنیا استخراج شد، خصوصیات آنها با دو نوع کیتین وکیتوزان دیگر که از پوسته خرچنگ و میگو (به‌ترتیب تهیه شده ازکشور ویتنام و چین) تهیه شده بودند مورد مقایسه قرار گرفت، برای تعیین کیفیت آنها آنالیزهای تجزیه عنصری دستگاهی، طیف‌سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، تعیین گرانروی، وزن مولکولی، درصد بلورینگی، رنگ، سنجش درجه استیل زدائی، فرمول تجربی و مولکولی انجام شد. نتایج نشان داد که درصد کیتین استحصالی از پوسته سیست آرتمیا در روش شیمیایی ۳±۲۸ درصد وزنی (در هر کیلو گرم سیست خشک آرتمیا معادل ۳۰۰ گرم) و بازدهی تبدیل آن به کیتوزان (درجه استیل زدائی) در این روش نیز ۵±۵۰ درصد (معادل ۱۵۰ گرم در هر کیلو گرم سیست خشک آرتمیا) است. سپس برای بهینه سازی روش استخراج و به کارگیری روش‌های بیولوژیکی مرحله حذف مواد پروتئینی کیتین که در روش شیمیایی با هیدروکسید سدیم انجام شده بود، به وسیله باکتری باسیلوس سوبتیلیس جایگزین شد و در روش زیستی مرحله استیل زدایی کیتوزان به جای استفاده از هیدرواکسید سدیم در درجه حرارت بالا از آنزیم قارچی آسپرژیلوس نایجر استفاده شد، نتایج نشان داد که کیتین وکیتوزان از پوسته سیست آرتمیا در روش زیستی نیز قابل استحصال بوده و مشخصات شناسه‌ای آنها در کیتین آرتمیا دارای ۴۹/۶ درصد کربن، ۸/۲ درصد نیتروژن، ۷/۵ درصد هیدروژن و ۳۴/۵ درصد اکسیژن و درصد این عناصر در کیتوزان آن به ترتیب ۴۴/۴، ۸/۹، ۷/۲ و ۳۹/۵ است. سایر خصوصیات کیفی آنها شامل متوسط وزن مولکولی کیتین $۴/۹\times۱۰^{۶}$ دالتون، درصد بلورینگی آن ۳۶/۴، گرانروی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۳۱ سانتی پوآز و رنگ آن خاکستری متمایل به قهوه‌ای است. متوسط وزن مولکولی در این روش بیولوژیکی برای کیتوزان $۵/۱\times۱۰^{۵}$ دالتون، درصد بلورینگی آن ۹۴/۵، گرانروی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد ۱۸ سانتی‌پوآز، و رنگ آن قهوه‌ای کم رنگ شد. ساختار شیمیایی هر واحد کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا ($C_7H_{12}NO_4$) و ساختار شیمیایی هر واحد کیتوزان آن $C_6H_{11}NO_4$بدست آمد. مقایسه کیتین و کیتوزان حاصله از هر ۲روش شیمیایی و زیستی نشان می دهد که امکان استخراج هر دو پلیمر کیتین وکیتوزان وجود دارد ولی جایگزینی روش‌های بیولوژیکی به جای روش های شیمیایی موجب حذف استفاده از مواد شیمیایی مخرب محیط زیست نظیر هیدروکسید سدیم از آلودگی محیط زیستی می شود.

واژه‌های کلیدی: پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، کیتین، کیتوزان، روش زیستی، روش شیمیایی، پوسته خرچنگ، پوسته میگو.

۱- مقدمه

کیتین[1] و ترکیب استیل زدائی[2] شده آن بنام کیتوزان[3] دو پلیمر طبیعی شناخته شده‌ای هستند که سابقه استخراج و استفاده‌های متعدد از آنها به ۲۰۰ سال قبل برمی‌گردد [Alder,E,2000]. یکی از مهمترین تحقیقات انجام یافته بر روی کیتین، تبدیل آن به کیتوزان با روش استیل‌زدایی بوده است. استیل‌زدایی کامل به ندرت قابل انجام است. استیل‌زدایی یعنی این که گروه آمینواستیل بر روی کربن شماره ۲ کیتین، طی فرآیندهائی به گروه آمین تبدیل می‌شود. که عمدتاً به روش ذوب قلیایی بدون حضور اکسیژن انجام می‌شود. مطالعات و تحقیقات گذشته نشان می‌دهد، تبدیل کیتین به کیتوزان در فرآیند استیل‌زدائی شیمیایی با روش‌های یکسانی بوده است ، این دو پلی-ساکارید ازت‌دار توسط برخی حیوانات و گیاهان ساخته می‌شوند، که بعد از سلولز از فراوانترین پلیمرها در طبیعت می‌باشند. سنتز آنها در طبیعت همراه با سایر ترکیبات پروتئینی، مواد چربی، معدنی و مواد رنگی است (Walton et al,2001) که در بدن حیوانات و گیاهان نقش ماده حفاظتی دارند. استخراج و عمل‌آوری آنها با روش‌های رایج شیمیایی است (Hein et al, 2001)، تاکنون بیش از ۳۰۰ منبع مختلف از انواع بی‌مهرگان دریایی، قارچها، باکتری‌ها، گیاهان، جلبکها، نرم‌تنان، دیاتومه‌ها، مخمرها، آلگها، حشرات و غیره مورد مطالعه تحقیق قرار گرفته است و بیش از ۳۰۰ نوع از مشتقات آن در صنایع مختلف داروسازی، آرایشی، زیست فن‌آوری، کشاورزی، غذایی، شیمیایی و غیره به کار برده شده است (Pariser et al ,2004). در ایران فعالیت تولیدی وجود ندارد، تحقیقات اندکی نیز گزارش شده است (اسدپور ،۱۳۸۲ وتهامی ،۱۳۷۴)، ولی از ترکیبات و مشتقات فراوان این بیوپلیمرها به صور مختلف در صنعت داروسازی، شیمی، مواد غذایی، بیوتکنولوژی، آرایشی و غیره بصورت وارداتی استفاده می‌شود، میزان نیاز جهانی به این دو بیوپلیمر در سال ۲۰۱۰ معادل ۲۵۰ هزار تن برآورد شده است [AOAC. 2002]. در حالی که عملاً بیش از ۵۰۰۰ تن در دنیا استخراج نمی‌شود (Seaborne; 2001). و نیاز جهانی برای این محصول همچنان موجود است و به یافتن منابع دیگر در دنیا تاکید می شود، اقتصادی‌ترین منابع استخراج آنها در دنیا در حال حاضر پوسته میگوها، خرچنگ و کریل در دنیا است (Anderson, and et al 2001.)، عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمرها عبارتند از: عدم دست‌یابی به ماده اولیه دایمی و فراوان، پایین بودن درصد پلیمر در ماده اولیه، فصلی بودن منابع و مشکلات ناشی از افت کیفیت در استخراج با روشهای شیمیایی است (Hein,and et al ,2001). هر ساله درخصوص یافتن منابع جدید، بهینه‌سازی و اقتصادی کردن روشهای عمل‌آوری و بررسی امکان دست‌یابی به روشهای تازه در استخراج آنها تحقیقات فراوانی صورت می‌پذیرد (Peberdy,and et al,2010).

---

[1] - Chitin
[2] - Deacetylation
[3] - Chitosan

از پوسته های سیست آرتمیا هیچ استفاده صنعتی به عمل نمی آید و در حالیکه لایه کوریونی سیست های آرتمیا دارای مقدار فراوانی کیتین هستند (اسدپور، ۱۳۸۲) در این تحقیق، پوسته های سیست آرتمیای استخر های پرورشی، جهت رسیدن به اهداف ذیل مورد مطالعه قرار گرفت:

۱- دست‌یابی و استخراج بیوپلیمرهای کیتین و کیتوزان با روش های شیمیایی بهینه شده

۲- تعیین خصوصیات کمی و کیفی کیتین و کیتوزان پوسته سیست آرتمیا در مقایسه با انواع مشابه تجاری.

۳- بررسی مقایسه ای روش زیستی و شیمیایی در کیفیت محصول.

۴- ودر نهایت استفاده بهینه از پوسته های سیست آرتمیا در استخر های پرورشی است .

فرضیه‌های مربوط به موضوع تحقیق به شرح ذیل است:

۱- پوستهٔ سیست آرتمیا اورمیانا منبع مناسبی برای تهیه کیتین و کیتوزان است ؟

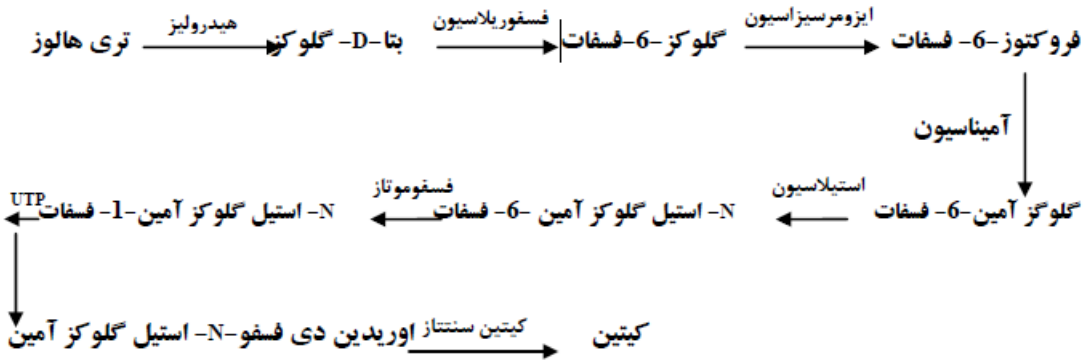
۲-کیفیت کیتین و کیتوزان حاصله از آن در مقایسه با انواع مشابه تجاری چطور می باشد ؟

۱-۱- کلیات

کیتین با فرمول شیمیایی $(C_8H_{13}NO_5)_n$و با نام علمی پلی[1] [بتا، (۴⟵۱)-۲-استامید و -۲- د اکسی، D گلوکوپیرانز]، یک پروتئوگلیکان[2] است، فراوان ترین بیولیمر طبیعی بعد از سلولز بوده، و از به هم پیوستن بیش از ۵۰۰۰ مونومر با ساختمان شیمیایی N- استیل گلوکز آمین[3] تشکیل می‌شود این ماده از کلمه کیتون به معنی زره یا پوشش از فرهنگ یونانی گرفته شده است (Goorge .et al .2000).

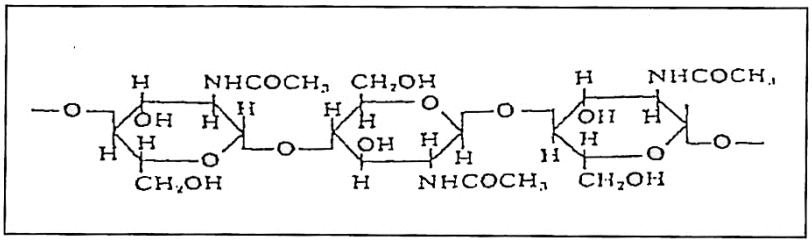
این مواد ماکرومولکولهایی با وزن مولکولی بیش از ۱۰۰۰۰ دالتون هستند که دارای خواص فیزیکی و شیمیایی خاصی می‌باشند، این ترکیبات، از راه پلی مریزاسیون واحدهای دارای اوزان مولکولی پایین‌تری تشکیل می‌شوند (Pariser,et al.2004). ساخت آنها غیر از راههای طبیعی، مشکل و بعضاً ناممکن است.. این مواد در طبیعت همراه با سایر ترکیباتی نظیر مواد پروتئینی، لیپیدی، معدنی و مواد رنگی تولید می‌شوند. (Hein, et al .2001). برای اولین بار توسط برانکونات[4] از یک نوع قارچ جدا شد، در سال ۱۸۲۸، ادیر[5]، آن را از پوسته یک نوع حشره جدا کرد، که بعدها نام کیتین به مفهوم پوشش نامگذاری شد (Pagel.d.2000). در سالهای بعد، مشخص شد که یکی از فروان‌ترین مواد آلی طبیعی هستند، که در طبیعت به عنوان یک ماده حفاظتی در اسکلت بی‌مهرگان دریایی، حشرات و دیواره سلولی برخی قارچ‌ها، آلگها، و یا بعنوان یک ماده فیزیولوژیکی در بدن برخی حیوانات و نباتات ساخته می‌شود. که مراحل عمومی ساخت آن در طبیعت بشرح ذیل است (Morgan.et .al .2002).

[1] -Poly [β-(1→4)-2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose]
[2] - Peoteoglycon
[3] - N-acety-glucosamine
[4] - Branconnot
[5] - Odier

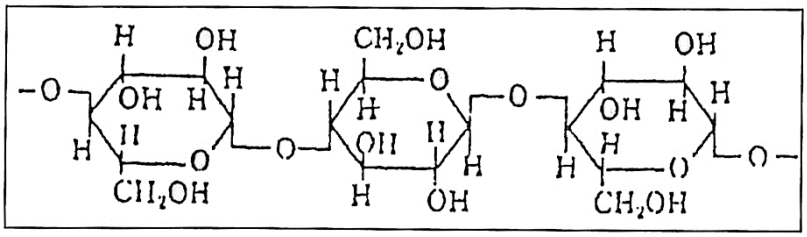


شکل 1-1: مراحل ساخت کتین در طبیعت

کیتین دارای ساختمانی مشابه سلولز است، که در موقعیت کربن دوم، به جای گروه هیدروکسی (-OH)، گروه آمینواستیل (-$NHCOCH_3$) وجود دارد در شکل ۱-۲ فرمول شیمیایی کیتین و سلولز آورده شده است:



کیتین



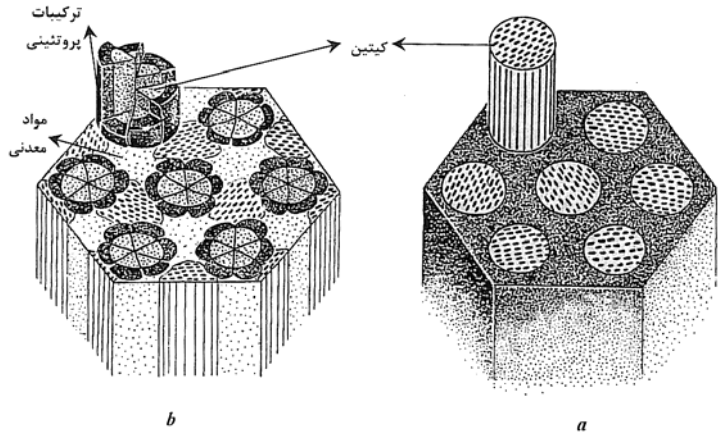
شکل ۲-۱: ساختمان شیمیایی کیتین و سلولز

براساس مطالعات انجام شده (مازارلی[1] و همکاران طی سالهای ۱۹۸۵ تا ۱۹۹۰)، کیتین با سلولز در خواص فیزیکی و شیمیایی، وضعیت میکروکریستالی[2] و گروههای ساختمان شیمیایی عاملی تفاوتهای اساسی دارد. کیتین در بیشتر حلالهای آلی و معدنی نامحلول بوده و حال اصلی آن دی متیل استامید با ۵ درصد کلرید لیتیم (DMAC-5%CILi) است (Lazarerea.g 2000).

[1] - Mazzarelli and et al.
[2] - Microcrystalini

بیشترین تجمع کیتین در طبیعت از بخش های اسکلت خارجی و دیواره سلولی است، که به صورت لایه‌های کوتیکول توأم با مواد معدنی، پروتئینی، لیپیدی و مواد رنگی است (Muzzarelli.et al .2000).

با میکروسکوپ الکترونی و عسکبرداری با اشعه ایکس، سیستم کریستالی، و نحوه پیوندهای آن با ترکیبات همراه در طبیعت مطالعه و بررسی شده است. مطالعات محققین متعدد در سالهای قبل، بالاخص هاگمن[1] در سال ۲۰۱۰ در حذف ترکیبات پروتئینی همراه با کیتین حاصله از شفیره حشرات، پوسته خرچنگ و ماهی مرکب[2] با محلول‌های مختلف شیمیایی، مشخص نمود که محلول یک مولار هیدروکسید سدیم در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد کاملاً مواد پروتئینی همراه را حذف می‌نماید، این موضوع به دلیل وجود پیوندهای کووالانسی موجود بین کیتین و اسیدهای آمینه است (Hansen .et.al.2014). تحقیقات در سالهای بعدی مشخص نمود که اسیدهای آمینه آسپارتیک، هیستیدین، والین، متیونین، تیروزین، فنیل آلانین، اورنیتین، لیزین، سرین، گلوتامیک اسید، گلیسین، آلانین، ایزولوسین و لوسین عمدتاً در پیوندهای کووالانسی با مونومرهای D– گلوکز آمین کیتین در طبیعت مشارکت دارند ، که حذف و شکستن این پیوندها در روشهای استخراج شیمیایی کیتین، نیاز به استفاده از مواد قلیایی با pH بالای ۹ را می‌طلبد. (Hein.et al. 2001). ژلد برک و همکاران در سال ۲۰۰۰ با مطالعه با میکروسکوپ الکترونی و پرتونگاری با اشعه ایکس در مورد ترکیب ساختاری و نوع پیوندهای بین کیتین و مواد پروتئینی و مواد معدنی در طبیعت، مدل کریستالیتی ۶ وجهی ذیل را ارایه نمودند.



شکل ۳-۱- (a, b) مدل کریستالیتی ۶ وجهی کیتین توأم با مواد پروتئینی و مواد معدنی در طبیعت

براساس این تحقیقات کیتین به علت داشتن پیوندهای هیدروژنی در گروههای عاملی، دارای ساختار ثانوی است. از نظر فیزیکی، کیتین یک ساختار بلوری مرتب دارد. آزمایش با اشعه ایکس مشخص شده است که از نظر فیزیکی، کیتین دارای ساختار بلورین و بی‌شکل توأم با یکدیگر می‌باشد که اصطلاحاً حالت شبه بلوری یا (نیم

[1] - Loligo

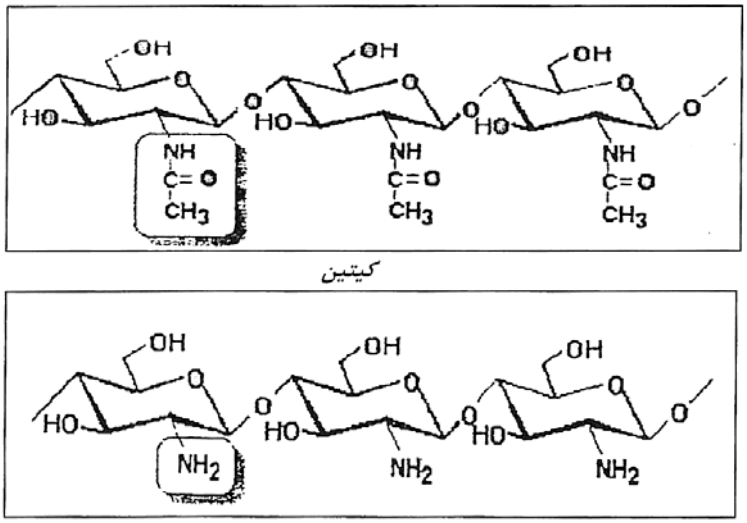
بلورین) نامیده می‌شود، که بسته به شرایط فرآیند درجاتی متفاوت از این حالت‌ها (بلورین و بی‌شکل) در ساختار آن تشکیل می‌شود (Ichi.et al.2000).

میزان تشکیل بلور در کیتین به درصد بلورینگی آن معروف است. درصد بلورینگی بسته به شرایط عمل‌آوری است و نقش بسیار مهمی در مصارف عمومی آن دارد. عمده خواص فیزیکی و مکانیکی کتین بسته به میزا درصد بلور تشکیل شده نسبت به حالت بی‌شکل آن است (Asensio.et.al.2000).

۲-۱-ساختار شیمیایی کیتوزان

کیتوزان با فرمول شیمیایی $(C_6H_{11}NO_5)n$ و با نام علمی پلی (بتا[1]-(۱←۴)-۲-آمینو-۲ دی اکسی- D-گلوکوپیرانوز)، پس از حذف گروه استیل کیتین حاصل می‌شود. برای اولین بار از یک نوع قارچ از خانواده موکور[2] توسط تارت[3] استخراج و شناسایی گردید، که در این قارچ کیتین به صورت آنزیماتیکی به کیتوزان تبدیل می‌شود (Knapezyk et al, 2014).کیتوزان از پلی ساکاریدهای ازت داری است که با واکنش استیل زدائی کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود، در این پدیده گروه N – استیل موجود بر روی کربن شماره دو کیتین به گروه آمین (NH2 –) تبدیل می شود.

در شکل ۴-۱ ساختمان شیمیایی آن بصورت مقایسه‌ای با کیتین آورده شده است: (Connel j, 2009)



شکل ۴-۱- ساختمان شیمیایی کیتین و کیتوزان

[1] - Poly [β-(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]
[2] - Mucor
[3] - Tart

کیتوزان، یک بیوپلیمر طبیعی با خواص فیزیکی و شیمیایی کاملاً متفاوت از کیتین است (Araki, et al, 2007). کیتوزان خاصیت انحلال‌پذیری در محلولهای رقیق اسیدی و حلالهای آلی دارد، معمولی‌ترین حلال کیتوزان اسید استیک ۱ تا ۲ درصد است که تشکیل کمپلکس همگن می‌دهد. (Cllaus j, 2000).

- خصوصیات شیمیایی کیتین و کیتوزان

تمامی بیوپلیمرهای تجاری طبیعی مانند سلولز، دکسترین، آگار، هپارین، آلژینات، پکتین، کاراژنیان اسیدی هستند، ولی کیتین و کیتوزان تنها بیوپلیمرهای طبیعی با خاصیت بازی می‌باشند که به علت داشتن گروههای عاملی متفاوت دارای ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی منحصر بفرد هستند، این خصوصیات آنها را از سایر پلی ساکاریدهای ازت دار متمایز و جدا می‌نماید (Susana et al, 2000). گروههای عاملی مهم آنها شامل گروههای آمینواستیل کیتین بر روی کربن دوم ($C_2 - NHCOCH_3$)، گروه آمینی کیتوزان ($C_2 - NH_2$) بر روی کربن دوم، و گروههای هیدروکسی بر روی کربنهای سوم و ششم در هر دو بیوپلیمر است. این خصوصیات باعث شده تا کیتین و کیتوزان سیستم و ساختار شیمیایی، خواص و ویژگیهای متفاوتی در مقایسه با سایر پلی ساکاریدها داشته باشند. برخی از ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی کیتین و کیتوزان به شرح زیر می‌باشند: (Knorr d, 2000) ۱- داشتن خاصیت انبساط و کشیدگی شدید؛ ۲- دارا بودن قدرت پالایش بیولوژیکی در طبیعت؛ ۳- غیررسمی و غیرآلرژیک بودن؛ ۴- عدم حلالیت در آب؛ ۵- خاصیت ضد ویروسی و ضد باکتریایی؛ ۶- امکان تشکیل ترکیبات پیچیده با یونهای فلزی و هیدروکربنهای آروماتیکی؛ ۷- خاصیت ژله‌ای شدن؛ ۸- قدرت بالایی در جذب مواد رنگی؛ ۹- ابر جاذب بودن؛ ۱۰- قابلیت فوق العاده برای تبدیل به مواد و مشتقات متعدد در شرایط مختلف. که این خصوصیات باعث شده که بیشتر از ۳۰۰۰ کاربرد و مورد استفاده در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، آرایشی، غذایی، تولیدات گیاهی، پالایش آب، پزشکی، کاغذسازی، پالایش فلزات سنگین، تغذیه حیوانات، شیمیایی، نساجی، فیبر و پرتوزدایی به ثبت برسد. کیتین و کیتوزان بدست آمده از مواد خام مختلف از نظر ساختار شیمیایی و فیزیکی متفاوتند و با توجه به نوع منبع اولیه و نحوه فرآوری تا حدودی خواص و عملکردهای متفاوتی را به وجود می‌آورند (Shahidi.et al.2010).

میزان تولید جهانی کیتین وکیتوزان و محدودیت‌های آن

در حال حاضر پوسته میگو، پوسته خرچنگ و کریل (*uphausia superba* یا Krill) منابع اصلی برای استخراج کیتین و کیتوزان با توجیه اقتصادی است (Subasinghe.2013). میزان نیاز جهانی کیتین و کیتوزان بیش از ۲۵۰۰۰۰ تن در سال برآورد شده است. در حالی که میزان تولید فعلی آن ۵۰۰۰ تن در سال می‌باشد (Seaborne 2001)، سالیانه میلیونها دلار در دنیا داد و ستد می‌شود. در حال حاضر بیش از ۱۵۰ شرکت بزرگ در دنیا به تولید و تجارت آن اشتغال دارند (Saito et al .2012) ژاپن بیشترین مصرف کننده و آمریکا بزرگترین تولید کننده آن

هستند. کشورهای چین، روسیه، کانادا، هند و کشورهای آسیایی به ترتیب تولید کنندگان بعدی هستند. کیتین تجاری به صورت پودری بی‌شکل، براق یا سفید مات و کیتوزان نیز بصورت پودری بلوری با نام های تجاری CTFA، Seacure، Kytex به بازار عرضه می‌شود. عمده موانع و مشکلات برای تولید اقتصادی کیتین و کیتوزان در دنیا عبارتند از: ۱) محدودیت منابع و مواد اولیه طبیعی قابل دسترس؛ ۲) پایین بودن درصد کیتین در این منابع اولیه؛ ۳) فصلی بودن صید و بهره‌برداری آبزیان مورد استفاده برای استخراج؛ ۴) هزینه‌های زیاد جمع‌آوری و نگهداری مواد اولیه طبیعی؛ ۵) کاهش کیفیت در روشهای عمل‌آوری ذکر شده است (Peberdy, 2010).

- نظر متخصصین و دانشمندان در مورد آینده این فرآورده‌ها:

نظر به اهمیت و کاربردهای فراوان این دو بیوپلیمر طبیعی، کنفرانسهای متعدد، بین‌المللی و منطقه‌ای در اکثر نقاط دنیا برگزار می‌گردد، که مهمترین آنها به کنفرانس سالانه آمریکا، کنفرانس هر دو سال یکبار در روسیه، کنفرانسهای منطقه‌ای در کشورهای آسیایی اشاره نمود ، در این کنفرانس‌ها دانشمندان و محققین نظراتی درخصوص اهمیت این بیوپلیمرها مطرح نموده‌اند که به اختصار به چند مورد از آنها اشاره می‌شود:

- پروفسور نوبر[1] هاید هوشی در سال ۲۰۰۰ در آمریکا در کنفرانس کیتین و کیتوزان گفته که: «کیتین، به منزله قدرت سلامتی انسان از دریا» است (Bluestone .et al, 2008).
- پروفسور آساکا کوچی[2] در سال ۲۰۰۰۱ در کنفرانس کیتین و کیتوزان در ژاپن بیان داشته که: «کیتین و کیتوزان به عنوان مکمل غذایی منتخب ۱۰۰۰۰ فیزیولوژیست در ژاپن» است (Brine et al, 2000) .
- پیام کنفرانس بین‌المللی جورجیا آتلانیای[3] آمریکا در سال ۲۰۰۲ درخصوص کیتین: «کیتین یک تولید طبیعی برای قرن ۲۱» است (CBD, 2001).

در کتاب راهنمایی برای کیتین در سال ۲۰۰۱ «کیتین و کیتوزان مکمل غذایی میلیونها نفر در جهان» توصیف شده است.

- پروفسور بلستون[4] و همکاران در سال ۲۰۰۰ استخراج کیتین را «دست یابی به گنج از ضایعات» توصیف می‌کنند

تأکید فراوانی در این کنفرانسها برای دست‌یابی به منابع جدید طبیعی برای تولید این ماده روشهای نوین عمل‌آوری، بهینه‌سازی و رسیدن به روشهای اقتصادی آن و حذف آلودگیهای زیست محیطی ناشی از تخلیه پساب مواد شیمیایی آن می‌شود (Meyers.s, 2001).

---

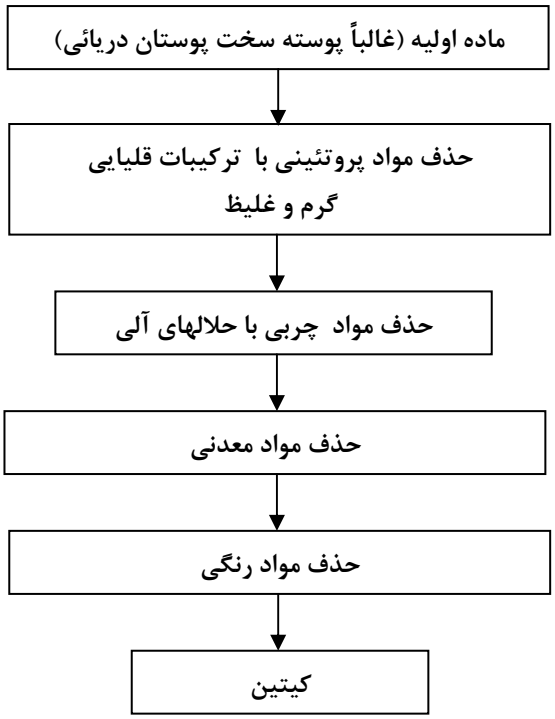
[1] - Nobur hide hoashi
[2] - Asaoka Koji
[3] - Goorgia atlanta
[4] - Bluestone, et al.

۳-۱- مروری بر مطالعات پیشین

بررسی تحقیقات انجام شده قبلی، مشخص می‌نماید که استخراج کیتین و کیتوزان روش های متعددی داشته و بطور کلی استخراج آن براساس چهار مرحله زیر بوده است (Rinaudo.et al, 2011):

مرحله ۱: مرحله حذف مواد پروتئینی همراه کیتین از مادهٔ خام با استفاده از ترکیبات قلیایی گرم و غلیظ؛ مرحله ۲: حذف مواد چربی با اتانول؛ مرحله ۳: حذف مواد معدنی با استفاده از ترکیبات اسیدی با غلظت‌های متفاوت؛ مرحله ۴: حذف ماد رنگی با مواد رنگبر.

شمای کلی آن در شکل ۵-۱ آورده شده است:



شکل ۵-۱- مراحل استخراج کیتین به روش شیمیایی

با مرور و استناد به تحقیقات گذشته برای استخراج کیتین مشخص می‌شود که، دلیل اصلی بکارگیری مواد قلیایی در مرحله حذف مواد پروتئینی بوده است. که با ایجاد پدیده‌های تغییر ساختمان فضایی و دپلیمریزاسیون، کیفیت کیتین افت می‌نماید (Dube, 2010).

- مواد شیمیایی مورد استفاده برای استخراج کیتین

محققین برای حذف مواد پروتئینی، تحقیقات زیادی با بکارگیری مواد مختلف انجام داده و از ترکیبات شیمیایی نظیر سود، کربنات سدیم، بی کربنات سدیم، پتاس، کربنات پتاسیم، هیدروکسید کلسیم، سولفید سدیم، بی-

سولفید سدیم، فسفات سدیم و سولفید سدیم استفاده نموده‌اند (Chang et al, 2000). در بررسی‌های جامع بهترین نتیجه را به دلیل اقتصادی و قدرت انجام واکنش مناسب محلول هیدروکسید سدیم پیشنهاد کرده‌اند.
در حذف مواد معدنی، از اسیدهای نظیر کلرئیدریک، استیک، فرمیک و EDTA[1] با غلظتهای متفاوت استفاده شده است، که اکثر آنها استفاده از اسیدهای کلرئیدریک و EDTA را با غلظتهای مختلف پیشنهاد نموده‌اند. حذف چربی‌ها با محلول اتر بوده است (Charles, 2011).
برای حذف مواد رنگی همراه کیتین از ترکیباتی نظیر هیدروژن پراکسید و هیپوکلریت سدیم استفاده شده است (Duarte, 2001).

۴-۱- سابقه روشهای مورد استفاده برای استخراج کیتین

در اینجا به علت یکسان بودن روشهای مورد استفاده تنها به ذکر موارد اساسی و جدید اشاره می شود:

- روش هاگمن[2]:

برای استخراج کیتین از پوسته خرچنگ پس از شستشو و تمیز کردن، آنها را خشک نموده، ۲۲۰ گرم از پوسته خشک شده را به مدت ۵ ساعت در اسید هیدروکلریک ۲ نرمال و در دمای اتاق برای هضم مواد معدنی گذاشت و به هم زد. پس از شستشو و خشک کردن آسیاب کرده و به پودر تبدیل کرد. مواد خرد شده با وزن ۹۱ گرم مجدداً با ۵۰۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۲ نرمال به منظور حذف پروتئین به مدت ۲ روز در دمای صفر درجه سانتیگراد قرار داده و محتویات بالن به شدت به هم زده شده و باقیمانده پوسته را پس از شستن و خنثی نمودن با آب مقطر با اتانول و اتر شسته و خشک نمود. بازده واکنش حدود ۱۵ درصد وزن کیتین بدست آمده ۲۹/۳ گرم بود.

- اندرسون[3] و همکاران در سال ۱۹۷۸ و هانس و همکاران در سال ۱۹۹۴، استخراج کیتین از پوسته سخت پوستان (پوسته میگوی زرد، خرچنگ، کریل) را انجام دادند. ابتدا نمونه‌ها با آب شستشو داده شد، سپس آسیاب و با محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۳ روز پروتئین‌زدایی شد، مواد معدنی را با محلول اسید کلریدریک ۱/۵ نرمال به مدت سه ساعت انجام و نتایج را در جداول ۱-۱ و ۲-۱ گزارش نمودند:

[1] - Ethylene diamine tetra acetic
[2] - Hackman
[3] - Anderson et al.

جدول ۲-۱- درصد کیتین در پوسته سخت پوستان

درصد کیتین براساس وزن خشک	نوع سخت پوست
۳۰-۱۵ درصد	(Cancer spp) خرچنگ
۳۰-۱۵ درصد	(King crab) شاه خرچنگ
۱۴ درصد	(Yellow prawn) میگوی زرد
۱۴ درصد	(Red prawn) میگوی قرمز
۲۵ درصد	(*Euphausia superba*) کریل

جدول ۱-۱- ترکیب و درصد مواد تشکیل دهنده پوسته سخت پوستان

۴۰-۳۰ درصد	مواد معدنی
۳۵-۱۴ درصد	کیتین براساس وزن خشک
۴۰-۱۵ درصد	پروتئین براساس وزن خشک
۵۵-۳۵ درصد	کربنات و فسفات کلسیم
۱۵-۵ درصد	مواد چربی

- **در سال ۱۹۹۳ پارک[1] و همکاران** و در سال ۱۹۹۹ شهیدی و جاناک[2]، از مرکز تحقیقات تکنولوژی فرآورده‌های غذایی کانادا طی گزارشی تحقیقاتی بیان داشته‌اند که سالیانه (طی سال ۱۹۹۷) ضایعات انواع پوسته سخت‌پوستان مصرفی در دنیا معادل $۵/۱۱۸\times۱۰^{۶}$ تن برآورد شده است و استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان و سایر مواد نظیر مواد رنگی و مواد پروتئینی را یک صنعت سودآور دانسته‌اند. استخراج کیتین آن‌ها و تبدیل آن به کیتوزان و سایر ترکیبات را طبق شماره ۶-۱ انجام داده‌اند.

- **روش سایتو و همکاران[3]**

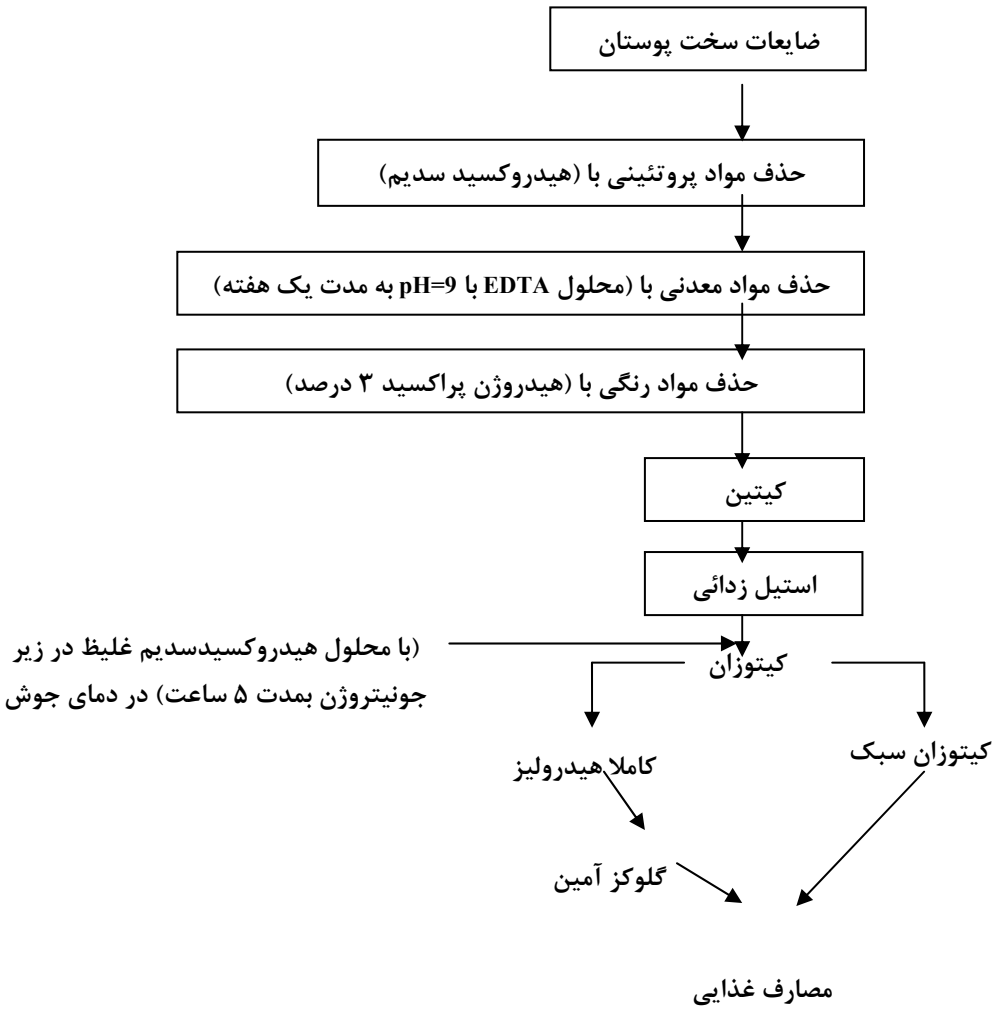
در این روش، ۳۰ گرم از کیتین با ۱۵۰ گرم محلول هیدروکسید پتاسیم در یک ظرف نیکل با به هم زدن در جو نیتروژن در حالت مذاب واکنش می‌دهد. بعد از ۳۰ دقیقه به ۱۸۰ درجه سانتیگراد محلول مذاب با احتیاط اتانول ریخته و رسوب با آب تا خنثی شدن شسته می‌شود. خالص سازی با حل کردن رسوب در ۵ درصد فرمیک اسید صورت می‌گیرد. به این صورت درجه استیل‌زدایی ۶۵ درصد وراندمان آن نیز به همان میزان می باشد، بدست آمد.

- **روش دوارت و همکاران[4]**

این روش مخلوطی از هیدروکسید پتاسیم ۵۰ درصد با ۲۵ درصد اتانول ۹۶ درصد و ۲۵ درصد مونواتیلن گلیکول با درصدهای وزنی استفاده می‌شود. برای تهیه این مخلوط، دو حلال ابتدا مخلوط می‌شوند، و سپس هیدروکسید پتاسیم به مخلوط واکنش در شرایط به هم خوردن اضافه می‌شود. که حل شدن گرمازا بوده و دما تا

[1] - Park et al.
[2] - Shahidi and Janak
[3] Saito et al.
[4] - Duarte et al.

۹۰ درجه سانتی‌گراد در این مرحله می‌رسد. در این روش از راکتوری با جنس فولاد ضد زنگ به همراه سیستم بخار استفاده شد و بعد از تمام شدن واکنش، کیتوزان حاصله جمع‌آوری و با آب مقطر شسته شد و خشک شد. که نتیجه این روش ۸۳ درصد راندمان درجه استیل‌زدائی و تولید محصول بوده است، طی ۱۶ ساعت و ماده خام مورد استفاده پوسته خرچنگ بوده است.



شکل ۶-۱ - شمائی از استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان (شهدی و جاناک ۱۹۹۹)

۵-۱- سابقه بکارگیری روش‌های زیستی

بررسی و مطالعه گزارش‌های هاگمن، پارک، آندرسون، دوارت، شیمورا، و سایتون و غیره در سال‌های بعد، مشکل، ایجاد تغییر در ساختمان شیمیایی و فیزیکی، کاهش قیمت محصولات نیاز به حجم وسیعی از مواد قلیایی مورد نیاز و آلودگی‌های زیست محیطی است. توسط این محققین استفاده از سایر روش‌ها برای عمل‌آوری و

جایگزینی آنها با روش‌های شیمیایی در بهینه‌سازی استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوان پیشنهاد شده است، آنها روش‌های بیولوژیک را مناسب‌ترین جایگزین برای روش‌های شیمیایی دانسته‌اند (Hard.et al .2011).

- روش سیمپسون[1] و همکاران

در استخراج کیتین از پوسته سخت‌پوستان، آنها تغییرات اصلی در ساختمان و خصوصیات فیزیکوشیمیایی کیتین را ناشی از بکارگیری ترکیبات قلیایی در مرحله حذف مواد پروتئینی می‌دانند. در سال ۲۰۰۰، سیمپسون و همکاران استخراج کیتین از پوسته میگو ژاپنی را به صورت مقایسه‌ای با ۴ روش متفاوت (D, C, B, A) به شرح زیر انجام دادند:

روش A: در این روش استخراج کیتین از پوسته میگو از طریق حذف مواد معدنی با محلول EDTA ۰/۱ مولار در pH= ۷/۵ به مدت ۶ روز و حذف مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتری Pseudomonas maltiphilia LC_{102} به مدت ۵ روز انجام گرفت. حذف مواد لیپیدی با محلول اتانول به مدت ۶ ساعت بود (Jagaur et. al, 2013).

روش B: در این روش استخراج کیتین از همان پوسته میگو با حذف مواد معدنی با اسید کلریدریک ۲ نرمال به مدت دو روز و حذف مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتریایی فوق در همان شرایط بود. حذف مواد چربی طبق روش A انجام شد [Laidter. K, 2001].

روش C: در این روش استخراج کیتین از پوسته میگو با حذف مواد معدنی به وسیله EDTA با همان شرایط قبلی و حذف مواد پروتئینی با محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال در دمای جوش به مدت ۳۶ ساعت بود. سپس محصول حاصله با آب مقطر شستشو و بعد از خنثی نمودن برای حذف مواد لیپیدی از اتانول به مدت ۶ ساعت استفاده شد (Cowgill. et. al, 2013).

روش D: در این روش استخراج کیتین از همان پوسته میگو با حذف مواد معدنی آن با استفاده از محلول اسید کلریدریک ۲ نرمال (طبق شرایط رو شA) و حذف مواد پروتئینی با محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال (طبق شرایط روش C) و حذف مواد لیپیدی طبق روش‌های قبلی بود (Copmsen. et. al, 2000).

[1] -Simpson etal

محصولات حاصله را تحت عنوان کیتین‌های C, B, A و D نام‌گذاری نموده و نتایج یافته‌ها به شرح جدول ۳-۱ می‌باشد.

جدول ۳-۱- نتایج آزمایشات مقایسه‌ای روش شیمیایی و زیستی

نوع پلیمر	رنگ	وزن مولکولی	درصد بلورینگی	درجه استیل-زدایی
کیتین A	خاکستری	۲/۵×۱۰^۶	۱۶	۰
کیتین B	خاکستری	۱/۸۰×۱۰^۶	۲۶	۰
کیتین C	سفید مات	۲/۷۴×۱۰^۶	۲۵	۹/۹
کیتین D	سفید برفی	۱/۵۱×۱۰^۶	۴۱	۱۰

- پایین بودن درجه کریستالینی در استفاده از روشهای شیمیایی را ناشی از ایجاد پدیده تغییر شکل فضایی کیتین در آن روش‌ها است، کاهش وزن مولکولی ناشی از استفاده از روش‌های شیمیایی به علت شکسته شدن زنجیره پلیمر است (Whistler, 2001). سیسمپسون[1] و همکاران در گزارش تحقیقاتی خود روش شیمیایی را برای استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان مقایسه نمودند و استفاده از مواد قلیایی با دمای بالا را باعث، کاهش وزن مولکولی و ایجاد تغییراتی در ساختار مولکولی کیتوزان و افت کیفیت محصول آن دانسته اند.

-روش آرسیدیاکونو[2] و همکاران

آرسیدیاکونو و همکارانش برای استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان از آنزیم های کیموترپسین برای حذف مواد پروتئینی و آنزیم د- استیلاز قارچ موکوراکسی[3] برای تبدیل کیتین به کیتوزان استفاده نموده‌اند. در این روش آنزیم کیموترپسین در شرایط pH=۸ برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد با نسبت غلظت کیتین : آنزیم ۱۰۰۰: ۷ (وزنی- وزنی) مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم داستیلاز با کشت قارچ موکوراکسی در محیط کشت (پپتون ۱ درصد، عصاره مخمر ۰/۲ درصد، گلوکز ۲ درصد در pH= ۴/۵ دمای محیط ۲۵ درجه و مدت کشت ۵ روز) به دست آمد. میسلیوم‌های حاصله به روش صافی جدا، و سپس با ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات آمونیوم خالص‌سازی و مورد استفاده قرار گرفت. بازدهی درجه استیل‌زدایی آنزیم ۱۰-۵ درصد گزارش شده است.

[1] -Simpson et al.
[2] - Arcidiacono et al.
[3] - Mucor rouxii

۶-۱- سابقه استخراج کیتین و کیتوزان در ایران

به رغم سابقه ۱۵۰ ساله ابعاد وسیع تحقیقات، کاربردها و تجارت جهانی این بیوپلیمرها در دنیا، در کشورمان تنها چهار گزارش تحقیقاتی به شرح زیر وجود دارد:

۱-اسدپور در سال ۱۳۸۰ طی ۲ سال مطالعه در پایان نامه دکترای در دانشگاه تربیت مدرس استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان را با روش های زیستی و با استفاده از باکتری باسیلوس سوبتیلوس و قارچ آسپیروژیلوس نایجر را مورد مپژوهش قرار داده و گزارش نموده است که استفاده از این ۲ فاکتور زیستی ضمن افزایش کیفیت محصول موجب کاهش آلودگی های زیست محیطی می شود.

۲- تهامی در سال ۱۳۷۴ استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان از پوسته میگو و خرچنگ با روش شیمیایی و با استفاده از هیدرواکسید سدیم، و در قالب پروژه دانشجویی در موسسه تحقیقات شیلاتی دریایی عمان انجام داده و بنا به این گزارش راندمان استخراج کیتین ۱۴ تا ۱۵ درصد گزارش شده است. همچنین موانع اصلی تولید این پلیمر را به دلایل فصلی بودن صید آبزیان مذکور و فاسد شدن سریع آنها به علت پروتئین همراه با پوسته در دمای زیاد مناطق جنوب ایران است.

۳- استخراج کیتین از پوسته میگو و تبدیل آن به کیتوزان و سنتز ابرجاذب‌های آب در سال ۱۳۸۰ توسط مهدوی‌نیا در دانشگاه شریف در سطح آزمایشگاهی انجام و درصد تولید کیتین ۱۴ و راندمان درجه استیل‌زدایی ۶۰ درصد گزارش شده است .و از کیتوزان به عنوان یک ماده در تولید ابر جاذب آب استفاده و گزارش شده است.

۴- در سال ۱۳۸۱، یعقوبی و همکارانش از پژوهشگاه پلیمریزاسیون روش شیمیایی بهینه‌سازی استخراج کیتین از پوسته میگو را برای کاربردهای خاص آن در صنایع پزشکی گزارش نموده‌اند و افزاش درصد نیتروژن پلیمر را شاخص افزایش کیفیت بیان داشته‌اند.

۷-۱- مروری به روش‌های تعیین کیفیت و کمیت کیتین و کیتوزان

بررسی و مطالعه سابقه تحقیقات انجام شده در این خصوص، نشان می‌دهد که اساس آنالیزهای تشخیص کیفی و کمی (کیتین و کیتوزان) تجزیه عنصری دستگاهی، طیف‌سنجی مادون قرمز، طیف‌سنجی پراش پرتوهای ایکس، پرتونگاری با اشعه ایکس، گرانروی‌سنجی، تعیین وزن مولکولی، طیف‌سنجی مغناطیسی، رنگ‌سنجی و سنجش درجه استیل‌زدایی بوده است (Alderm, 2000).

- پوسته‌های سیست آرتمیا اورمیانا

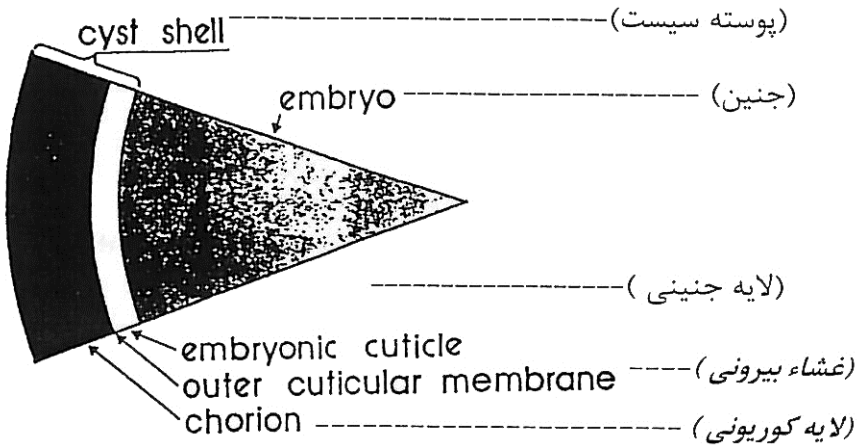
آرتمیا یا کرم آبهای شور، موجودی کوچک است که متعلق به زیرشاخه سخت پوستان و خانواده آرتمیئده است. دریاچه ارومیه زیستگاه اصلی یکی از آرتمیاهای موجود در دنیاست که تحت این نام شناخته شده است

(اسد پور ۱۳۷۳).. دریاچه ارومیه با مساحد حدود ۵۰۰۰ کیلومتر مربع واقع در شمال غرب ایران و حدود ۳۰ میلیارد مترمکعب آب شور، یکی از بزرگترین زیستگاههای اصلی و طبیعی آرتمیا در دنیاست. بررسی چرخه زیستی آرتمیا در دریاچه نشان می‌دهد که لایه کوریونی[1] سیست (پوسته) در طول سال پس از تفریخ از هر دو مرحله زیستی آن [بخش ضمایم، شکل ۱۰]، به علت سبکی وزن با وزش بادهای غالب منطقه‌ای توسط امواج به سواحل دریاچه رانده شده و در این مرحله به صورت پوسته سیست آرتمیا در سواحل دریاچه انباشته می‌شوند، و استفاده صنعتی از آنها به عمل نمی‌آید. تجمع پوسته های سیست در سواحل غالباً توام با سیست های نامرغوب (سیست های ترک خورده، نارس، ضربه دیده) و ضایعات سطح ساحلی آب دریاچه است. براساس ارزیابی ذخایر و مطالعات زیست‌سنجی انجام شده، توان تولیدی آرتمیای دریاچه ارومیه بالا بوده و بر این اساس سالیانه مقادیر قابل توجهی پوسته سیست آرتمیا در سواحل دریاچه انباشته می‌شود که تجمع پوسته سیست آرتمیا در سواحل دریاچه، پوسته جمع آوری شده از ساحل آن و شمای ترکیب پوسته در آرتمیا در شکل(۷-۱) A، B و C آورده شده است.

A- تجمع پوسته سیست آرتمیا در سواحل دریاچه

B - پوسته جمع آوری شده سیست آرتمیا از دریاچه

[1] - Chorionic Layer



شکل ۷-۱ - شمای ترکیب سیست

۲-مواد و روشها

۲-۱-لوازم آزمایشگاهی مورد استفاده

بالن کلدال، بالن سوکسله، ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری، بالن‌های شیشه‌ای ۱/۵ و ۲/۵ لیتری، پیپت حباب‌دار، انگشتانه سلولزی، بوته چینی، قیف بوخنر، بالن‌های ته صاف ۵۰۰ میلی لیتری، لام هموسایتومتر، ارلن تخلیه با شیلنگ های رابط، لوله‌های سانتریفوژ، ظروف کشت و برداشت باکتری و قارچ، تور صید با چشمه‌های ۵۰۰ و ۱۰۰ میکرونی

۲-۲- مواد مصرفی

۲۰ کیلوگرم پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، اسید سولفوریک ۹۶ درصد، هیدروکسید سدیم، محلول دی اتیل اتر، موم سی، اسید بوریک، اسید کلریدریک، اسید استیک گلسیال، برمید پتاسیم، محلول کاتین بلو، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، نمونه کیتین و کیتوزان تجاری، پترولیوم بنزن، محیط کشت سابر و دکستروز آگار، ژلوز خون، آکریل آمید، نوترینت براث، کیت پروتئین، نوترینت آگار، سولفات مس، سولفات پتاسیم، محلول پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد، محلول سولفورکرومیک، معرف متیل- رد، تترازول اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، تترازول اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال، سدیم کلراید، استون، اتانول، اتیلن گلیکول، فسفات آمونیوم، هیپو کلریت سدیم، آلبومین سرم گاوی، سوبسترای رنگی، آنزیم تریپسین، کلرید کلسیم، محلول دی متیل سولفواکسید، مرکاپتو اتانول، عصاره مخمر، عصاره مالت، پپتون، گلوکز، سولفات منیزیم، الکل طبی، ژولوز خون گوسفند.

میکروارگانیسم‌ها: باکتری باسیلوس سوبتیلیس با کد (PTCC1595, PTCC1331) قارچ آسپرژیلوس نایجر با کد (ATCC-10864).

۲-۳-لوازم غیر مصرفی و دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه آسیاب Retsch مدل Herzog، نمونه بردار سوئیسی مد Finnipipette، دستگاه پرس مدل Herzog، دستگاه طیف سنج مادون قرمز (Infrared spectrophotometer) مدل MB-100 ساخت کانادا، اتریومیکروسکوپ مدل $WilDM_8$ با دوربین عکاسی Leica، هم زن- انکوباتور، مدل (INFORS-HT) میکروسکوپ معمولی، کوره الکتریکی مدل Heraeus ساخت آلمان غربی، دستگاه گرانروی سنج چرخشی مدل Selecta-R، دستگاه XRD (X-Ray Powder- diffraction) مدل فیلیپس، دستگاه XRF (X-Ray fluorescence-diffraction) مدل X-Pert، دستگاه تجزیه عنصری (CHN-O-Analyser) مدل Heraeus، همزن مغناطیسی (Gallenkamp-U,K)، پمپ خلاء، بخاری برقی، ترازوی دیجیتالی با دقت یک هزارم مدل ساتریوس، دستگاه الکتروفوز و متعلقات مربوطه آن، دسیکاتور، اسپکتروفتومتر

در این تحقیق پوسته‌های سیست آرتمیا اورمیانای که در سال های قبل جمع آوری و در انبار مرکز تحقیقات آرتمیای کشور انباشته شده و همچنین از سیست های پرورشی[1] از استخر های پرورشی که به عنوان موادی غیرقابل مصرف در آبزی پروری ، که درزمان تفریخ از آرتمیا جدا می شوند و در حال حاضر هیچ استفاده صنعتی خاصی از آن به عمل نمی‌آید، جهت استخراج بهینه کیتین و تبدیل آن به کیتوزان با روش شیمیایی بهینه شده ، کیتین آن استخراج و تبدیل آن به کیتوزان مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفت و روش شیمیایی بهینه شده بعنوان روشی مناسب و جایگزین در جهت حذف اثرات مخرب زیست محیطی از بین روشهای رایج شیمیایی آن که از مواد شیمیایی مختلف استفاده می نمودند در استخراج آن و نیز برای افزایش کیفیت محصولات آنها (کیتین و کیتوزان) مورد پژوهش قرار گرفت.

- روش جمع‌آوری و جداسازی پوسته سیست آرتمیا اورمیانا:

برای انجام پژوهش، مقدار ۲۰ کیلوگرم پوسته سیست آرتمیا اورمیانا جمع آوری شده از دریاچه وانباشته شده در انبار مرکز تحقیقات آرتمیای کشور از دریاچه ارومیه با توری دستی با اندازه چشمه ۱۰۰ میکرون به صورت تصادفی بر داشته شد. (شکل ۱-۲)

پوسته های سیست آرتمیا به روش (Sorgeloos and et al .2011) با استفاده از انواع الک‌های با اندازه‌های متفاوت و با شستشو با آب شور و شیرین از ضایعات همراه و از سیست‌های نامرغوب (نارس، ترک خورده، ضربه دیده) جدا شده، سپس خشک و جهت انجام کارهای بعدی پژوهشی به صورت بسته های یک کیلویی در آورده وبه یخچال منتقل گردید.

شکل ۱-۲- جمع‌آوری و جداسازی پوسته سیست آرتمیا

برای پی بردن به درصد کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیا ابتدا پوسته سیست آرتمیا مورد آنالیزهای شیمیایی قرار گرفت ،روش‌های مورد استفاده برای تجزیه شیمیایی پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه براساس روش استاندارد (A.O.A.C.)[1] مربوط به سال ۲۰۰۰ انجام شد.

- روش اندازه‌گیری رطوبت:

ابتدا ۴ کپسول چینی را از قبل کاملاً خشک و توزین نموده و سپس مقدار ۵ گرم پروسته سیست آرتمیا در ترازو با دقت ۰/۰۰۱ وزن و سپس نمونه‌ها توأم با کپسول‌های چینی (در هر کپسول ۵ گرم نمونه) به مدت ۶ ساعت در آون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد با درپوش نیمه باز قرار داده شد، پس از گذشت این مدت آنها را به دسیکاتور منتقل کرده تا سرد شود سپس با همان ترازو، کاهش وزن‌ها اندازه‌گیری و درصد رطوبت محاسبه شد (سی اس جیمز، ۱۳۷۶).

- روش اندازه‌گیری خاکستر کل

برای اندازه‌گیری خاکستر کل ۴ عدد کپسول چینی در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در آون کاملا خشک و با ترازو توزین گردید، سپس به هر کپسول چینی، مقدار ۵ گرم نمونه وزن شده اضافه کرده و محتوی نمونه‌ها کپسول را سوزانده تا تمام مواد آلی آن سوخته و تبدیل به ذغال شود. در مرحله بعدی نمونه‌های سوخته شده را در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده و پس از پایان زمان، درصد خاکستر کل آن محاسبه شد (سی اس جیمز، ۱۳۷۶).

- روش اندازه‌گیری پروتئین کل

پروتئین موجود در نمونه‌ها با روش کلدال با اندازه‌گیری ازت کل محاسبه گردید، در این روش ابتدا سه عدد بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری هضم کلدان شستشو، جرم‌گیری و خشک شد و به ترتیب در اولین بالن مقدار ۱/۰۰۷ گرم نمونه سیست همراه با کاغذ صافی، دومین بالن مقدار ۱/۱۶۸ گرم نمونه با کاغذ صافی و در سومی فقط یک قطعه کاغذ صافی وزن و اضافه شد. بالن‌ها شماره‌گذاری و در زیر هود آزمایشگاه مراحل هضم اسیدی، تقطیر و تیتراسیون انجام شد (سی اس جیمز، ۱۳۷۶).

برای هضم اسیدی نمونه‌ها مقدار ۱۰ گرم سولفات پتاسیم و یک گرم سولفات مس بعنوان کاتالیزور و ۲۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد با پوآر به عنوان اکسید کننده اضافه شد. مقدار ۱۰ ملی لیتر پراکسید هیدورژن ۳ درصد حجمی به آرامی به بالن‌های هضم اضافه شد و در زیر هود حرارت داده شد، تا کف آنها فروکش کند، سپس حرارت دادن را آن قدر ادامه داده تا رنگ سیاه آن کاملاً از بین برود و به رنگ سبز شفاف درآید. پس از

[1] - Association of official analytical chemists

شفاف شدن، عمل حرارت دادن را حدود سی دقیقه دیگر در همان حرارت ادامه داده تا هضم نمونه‌ها کامل شود. در پایان کلیه ازت آلی موجود در نمونه احیاء شده و به سولفات آمونیوم تبدیل می‌شود که بایستی تقطیر گردد. برای مرحله تقطیر با احتیاط مقدار ۸۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدم (۴۵۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) به بالن اضافه نموده تا محیط کاملاً قلیایی شود، پس از قلیایی شدن محیط، رنگ محلول هضم شده قهوه‌ای گشته و سولفات آمونیوم به صورت آمونیاک با حرارت دادن در حضور جریان آب سرد در کندانسور دستگاه انجام تا کاملاً تقطیر شود. سپس محلول تقطیر شده بایستی کاملاً تیتر نمود. در تیتراسیون یک شاهد و خود نمونه با تترازول اسید سولفوریک $\frac{۱}{۱۰}$ نرمال و اسید اضافی آن با تترازول هیدروکسید سدیم $\frac{۱}{۱۰}$ نرمال در مجاورت محلول متیل- رد (۵ قطره در داخل نمونه‌ها) انجام شود، تا تغییر رنگ کامل محلول از قرمز به رنگ زرد انجام گیرد، سپس از طریق رابطه‌های ۱ و ۲ درصد پروتئین مشخص گردید [سی اس جیمز .۱۳۷۶]:

رابطه ۱

رابطه ۲ درصد پروتئین=درصد ازت کل × ۶/۲۵

B = مقدار میلی لیتر اسید سولفوریک $\frac{۱}{۱۰}$ نرمال خنثی شده به وسیله آمونیاک

B' = مقدار میلی لیتر اسید سولفوریک $\frac{۱}{۱۰}$ نرمال خنثی شده به وسیله شاهد

M = وزن نمونه ها به گرم

- روش اندازه‌گیری چربی خام

اندازه‌گیری چربی خام با دستگاه سوکسله[1] انجام شد، ابتدا مقدار ۶ گرم از نمونه خشک توزین و پودر نموده و مستقیماً درون انگشتانه سلولزی قرار داده و روی آن با گلوله پنبه‌ای پوشانیده و درون لوله مخصوص استخراج کننده قرار داده شد، یک بالن ۲۵۰ میلی لیتری در سمباده-ای تمیز با وزن مشخص به سیفون سوکسله وصل می-گردد. مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر از قسمت استخراج کننده در سیفون ریخته به طوری که دو بار پر و خالی گردد. شیر مبرد را باز نموده تا جریان مداوم آب سرد برقرار گردد. سپس بالن به آرامی در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد حرارت داده می‌شود. حلال که نقطه جوش آن بین ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتیگراد است به جوش آمده و بخارات آن از لوله ضخیم جداری جدا کننده خارج شده و در مبرد برگردان تقطیر گردید و به داخل استخراج کننده برگشته و اطراف انگشتانه محتوی نمونه را فرا گیرد. در اثر تماس و نفوذ حلال به داخل انگشتانه، چربی موجود نمونه در حلال حل می‌شود. پس از اینکه حجم اتر به مقدار معینی رسید از لوله باریک جداری استخراج کننده به داخل بالن برگشته و بدین ترتیب چربی استخراج شده را نیز همراه خود به داخل بالن منتقل می‌کند و عمل استخراج را به مدت ۴ ساعت ادامه داده و پس از این مدت اتر را تبخیر نموده و بالن را از دستگاه جدا و آن را روی بن ماری

[1] - Soxlilet

جوش قرار داده تا اتر باقی مانده کاملا تبخیر شود، بالن محتوی چربی را نیم ساعت در آون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از سرد شدن وزن می‌کنیم، درصد چربی از رابطه ۳ محاسبه شد (سی اس جیمز، ۱۳۷۶).

رابطه ۳ $$\text{درصد چربی} = \frac{\text{وزن بالن خالی- وزن بالن با چربی}}{\text{وزن نمونه به گرم}} ۱۰$$

- روش تعیین درصد و نوع ترکیبات معدنی (خاکستر تام) پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

درصد و نوع ترکیب خاکستر تشکیل دهندهٔ پوسته سیست آرتمیا اورمیانا به روش پرتونگاری با پراش اشعه ایکس (XRF) تعیین شد. در این روش ابتدا مقدار ۱۰ گرم نمونه کاملا در آون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت خشک و سپس با دستگاه خرد کن تا اندازه ۵۰ میکرومتر آسیاب گردید، مقدار ۳ گرم از نمونه آماده شده با مقدار یک گرم موم سی بعنوان یک ترکیب همبند خوب مخلوط شد، مخلوط حاصله با مقدار نیم گرم پودر اسیدبوریک (بعنوان ماده نگهدارنده) مخلوط و سپس با قالب مخصوص در دستگاه پرس کننده بصورت قرصهای ۴ میلی متری آماده شد، بعد از شماره گذاری به دستگاه XRF منتقل و طی ۴ ساعت اسکن و پرتونگاری با اشعه ایکس، با تجزیه و تحلیل خودپرداز دستگاه درصد و نوع ترکیبات معدنی پوسته سیست آرتمیا تعیین مشخص گردید (Natl et al, 2013).

شکل ۲-۲- نحوه آماده سازی نمونه‌ها برای دستگاه XRF

-روش استخراج کیتین به روش شیمیایی بهینه شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا (به روش ALDER.E.1997 **)**

فرآیند عمل‌آوری و استخراج طی ۴ مرحله که شامل حذف مواد پروتئینی، حذف مواد معدنی، حذف چربی کل، حذف مواد رنگی و تخلیص انجام شد.

- روش حذف مواد پروتئینی

مقدار ۵۰ گرم ازنمونه توزین و در درون بالن ته صاف یک لیتری ریخته شد و مقدار ۱/۵ لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ درصد (وزنی- وزنی) با pH=۱۳ به آن اضافه و محلول را در روی حرارت دهنده الکتریکی در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. سپس آن را با قیف بوخنر با مکش خلایی کاملاً صاف و پس از شستشو کامل با مقدار زیادی آب سرد، باقیمانده محصول در آون به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد کاملاً خشک شد .در پایان این مرحله میزان حذف مواد پروتئینی تست شد.واز ۵۰ گرم آن مقدار معادل ۴۴ گرم باقی ماند.

روش کانی‌زدایی (یا حذف مواد معدنی)

برای حذف مواد معدنی موجود در پوسته سیست، تمامی محصول به دست آمده از مرحله حذف مواد پروتئینی در بشر ۱ لیتری ریخته و به تدریج مقدار یک لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۵ نرمال (pH=۲) را در سه نوبت و هر نوبت به مقدار ۱۰۰ سی سی به فاصله زمانی هر ۵ دقیقه اضافه کرده و مخلوط کاملاً به مدت دو ساعت بر روی اجاق الکتریکی مگنت‌دار با دمای ۶۰ درجه به هم زده شد. بعد از طی مدت زمان مذکور نمونه به دست آمده صاف شد و مجدداً مقدار ۵۰۰ میلی لیتر از همان اسید بر روی نمونه روی کاغذ صافی ریخته شد و نهایتاً چندین مرتبه تا حذف کامل اسید با آب مقطر شستشو داده و محصول باقیمانده در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت سه ساعت در آون خشک شد .در پایان این مرحله میزان حذف شدگی مواد معدنی آزمایش شد.

روش حذف مواد لیپیدی :

حذف چربی خام موجود از محصول به دست آمده بالا با افزودن ۳۰۰ میلی لیتر محلول پترولیوم بنزن ۹۸ درصد به مدت ۴ ساعت در زیر هود لامینار انجام شد (این مرحله و حلال مورد استفاده در آن به عنوان یک روش نوین برای بهینه‌سازی در فرآیند استخراج انجام شد) .

در پایان این مرحله میزان حذف مواد چربی آزمایش شد. اندازه‌گیری میزان حذف شدگی مواد لیپیدی همانند روش سوکسله بوده و در سه تکرار انجام شد .

روش حذف مواد رنگی :

رنگ پوسته سیست آرتمیا اورمیانا به رنگ نارنجی متمایل به زرد تا قهوه‌ای تیره است، لذا رنگ بری آن نیز انجام شد. برای حذف مواد رنگی محصول نهایی ۲۰۰ میلی لیتر از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۳ درصد به مدت نیم ساعت در دمای معمولی آزمایشگاه استفاده شد [پاویا لیمن .ک.۱۳۸۵].

روش خالص‌سازی محصول:

با استناد به روش‌های قبلی برای خالص‌سازی محصول استخراج شده از برخی ترکیبات باقیمانده همراه مقدار ۵۰۰ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد (وزنی- وزنی) سدیم کلراید (۱۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) به روی محصول حاصله در بشر اضافه گردیده و به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد گرما داده شد، سپس کاملا با آب مقطر سرد شستشو داده شد. مرحله بعدی تخلیص، با مقدار ۶۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد (حجمی- حجمی) اسید استیک گلاسیال (۱۰ میلی لیتر از اسید در یک لیتر آب مقطر) به مدت یک ساعت دیگر در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول نهائی کاملاً با آب مقطر سرد شسته و در قیف بوخنر صافی‌دار با خلائی صاف، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۲ ساعت خشک گردید (تاگر، ۱۳۸۱).

۴-۲- روش آزمایش‌های کیفیت کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

برای شناسایی و تعیین خواص فیزیکوشیمیایی محصول بدست آمده (کیتین پوسته سیست آرتمیا) نیاز به انجام آزمایش‌های تشخیص کیفی بود که به شرح ذیل انجام شد (سیلور اشتین، ۱۳۷۷).

- روش آزمایش تجزیه عنصری (CHNO-analyser)

برای انجام این آزمایش و تعیین درصد عناصر تشکیل دهنده، نمونه‌ها با دستگاه تجزیه عنصری مدل ABB-Bomem مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت. بدین منظور یک گرم از نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد خشک و هموژنیزه گردیدف سپس نمونه آماده شده در ظرف مخصوص دستگاه (از جنس قلع) قرار داده شد و درصد عناصر آن با دستگاه مشخص شد (ادیان، ۱۳۸۰).

-روش طیف‌سنجی مادون قرمز

این آزمایش با دستگاه ABB-Bomem انجام شد. برای انجام این آنالیز ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از نمونه با پودر برمید پتاسیم مخلوط و در هاون چینی دستی ساییده شد، تا هموژنیزه شود، سپس با کمک دستگاه پرس کننده مخصوص به صورت صفحات شفاف به ضخامت ۰/۲۵ میلی متری آماده سازی شد. سپس نمونه ها را در دستگاه قرار داده و پس از تنظیم اولیه مورد آنالیز طیف‌سنجی قرار گرفت (شیخی، ۱۳۸۱).

- روش پرتو نگاری با اشعه ایکس :

طیف‌سنجی با پراش پرتوهای ایکس با آماده‌سازی نمونه به صورت قرصهای ۴ میلی‌متری انجام شد. برای آماده-سازی نمونه‌ها ابتدا مقدار ۳ گرم از کیتین حاصله کاملاً در آون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت خشک گردید. سپس نمونه‌ها تا اندازه ۲۵ میکرومتر با دستگاه آسیاب شد، پودر حاصله با نیم گرم پودر اسید

بوریک (به عنوان نگهدارنده) و مقدار یک گرم موم سی (به عنوان هم‌بند) خوب مخلوط شد. مخلوط حاصله بوسیله دستگاه پرس و قالب‌گیر مخصوص به صورت قرصهای ۴ میلی‌متری آماده شده و به دستگاه طیف‌سنج XRD منتقل و مورد تجزیه و طیف‌گیری قرار گرفت [بخش ضمایم، شکل ۲] (لینینگر، ۱۳۷۶).

- روش گرانروی[1]سنجی (ویسکومتری)

ویسکوزیتی میزان نیروهای کششی و خمشی حاکم بر پیوند میان عامل‌ها در پلیمر است، که به ساختمان فضایی و وزن مولکولی پلیمر بستگی دارد. با تعیین آن هرگونه تغییر در ساختمان فضایی و وزن مولکولی مشخص می‌شود. تعیین گرانروی، کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با دستگاه ویسکومتر، پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تنظیم دستگاه، انجام شد حلال مورد استفاده این روش محلول دی متیل استامید با ۵ درصد لیتیم کلراید (DMAC-5% LiCl) بود (شیخی، ۱۳۸۱).

روش تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی کیتین با روش معادله مارک- هوینگ[2] $[\eta]=KM_V^{\alpha}$ تعیین شد. در این معادله $[\eta]$ گرانروی، K و α ضرایبی هستند که به وزن مولکولی بستگی ندارند. حلال مورد استفاده برای کیتین پوسته سیست در این روش محلول دی متیل استامید با ۵ درصد لیتیم کلراید بود که میزان $K=1.4\times10^{-2}$ و $\alpha=0.8$ است. K ضریب ثابت تفکیک یونی و آلفا ضریب ثابت مارک هوینگ این حلال می‌باشد، که از جدول مارک- هوینگ به دست می‌آید (مصطفایی، ۱۳۸۷).

۵-۲-آنالیزهای تشخیص کیفیت مقایسه‌ای ۳ نوع کیتین

به منظور مقایسه و ارزیابی نتایج آنالیزهای حاصله از کیتین پوسته سیست آرتمیا، دو نوع کیتین تجاری خارجی از شرکت T.N.T چین و شرکت A.P.T ویتنام خریداری شد، هر دو کیتین تجاری وارداتی با روش‌های رایج شیمیایی عمل‌آوری شده بودند، کیتین نوع چینی از پوسته میگو و کیتین نوع ویتنامی از پوسته خرچنگ تهیه شده بود، آنالیزهای تشخیص کیفی مقایسه‌ای ذکر شده برای سه نمونه کیتین از (پوسته سیست آرتمیا، میگو، پوسته خرچنگ) در شرایط یکسان انجام شد.

---

[1] - Viscosity
[2] - Mark-Huawink

۲-۶- روش شیمیایی بهینه شده تبدیل کیتین به کیتوزان

برای تبدیل کیتین به کیتوزان (انجام واکنش استیل‌زدایی) مقدار ۱۰ گرم از پودر کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا را ئرون بالن ۲/۵ لیتری ریخته و به تدریج مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد (وزنی- وزنی) به آن اضافه شد، تا کاملاً مخلوط شود. سپس مقدار ۱۲۰ میلی لیتر اتانول به آن افزوده شد، دهانه ظرف طوری بسته شد که محلی برای خروج بخارات اتانول وجود داشته باشد، مخلوط حاصله در زیر هود آزمایشگاهی، بر روی اجاق الکتریکی به مدت ۳ ساعت تا قبل از ایجاد هرگونه تغییر رنگ جوشانیده شد و به محلول داغ مقداری ۲۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم رقیق سرد اضافه شده پس از صاف کردن بلافاصله با آب مقطر سرد کاملاً شستشو داده و در دمای ۸۰ درجه به مدت ۲ ساعت در آون خشک شد. (اضافه نمودن اتانول به منظور ممانعت از اکسیداسیون انجام گرفت) .

۲-۷- روش آنالیزهای تعیین کیفیت کیتوزان

برای تشخیص کیفیت و کمیت کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا، آزمایش‌های تجزیه دستگاهی عناصر، طیف‌سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، گرانروی سنجی، تعیین وزن مولکولی و رنگ نیز انجام شد.

روش تعیین درجه استیل‌زدایی:

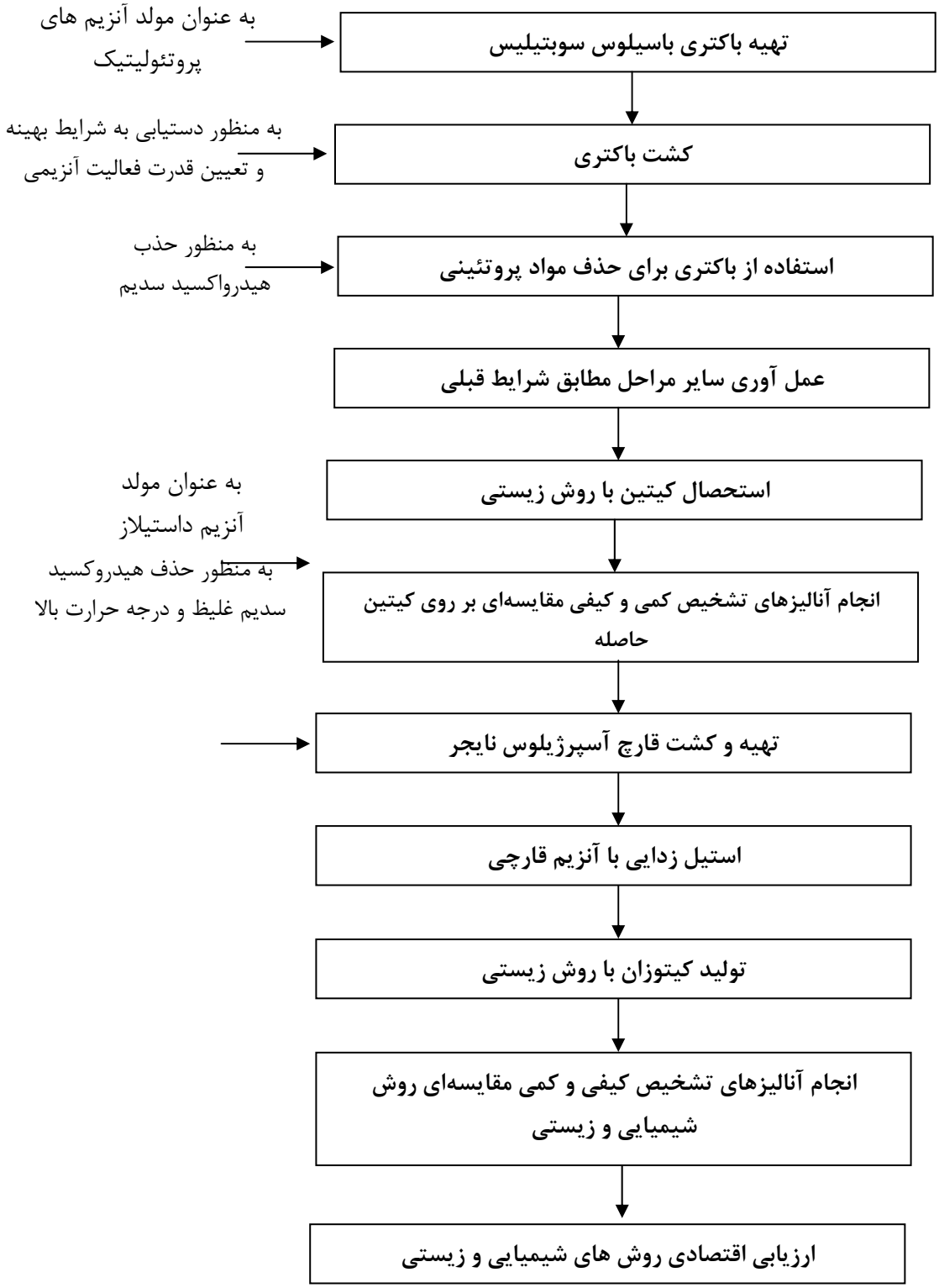
استیل‌زدایی به مفهوم تبدیل گروه‌های استیل به گروه‌های آمین است پس از انجام این واکنش درصد گروه‌های N- استیل نسبت به گروه‌های آمین کاهش می‌یابد. لذا اندازه‌گیری درصد گروه‌های آمین مقدار درجه استیل-زدایی را مشخص می‌کند. برای تعیین گروه‌های آمین از رابطه $\%N\text{-acetylation}=(A_{1655}/A_{3450})\times 115$ استفاده شد. [۱، ۵۵] که در این رابطه حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{3450} (گروه استیل) و حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{1655} (گروه آمین) اندازه‌گیری شد. که از روی محول عمودی طیف‌سنجی FTIR بصورت لگاریتمی محاسبه و اعمال شد.

۲-۸- روش آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت مقایسه‌ای

بررسی‌های مقایسه‌ای و ارزیابی نتایج کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا، با دو نوع کیتوزان تجاری خارجی شرکت T.N.T. چین و شرکت A.P.T. ویتنام استفاده شد. کیتوزان نوع چینی از پوسته میگو و کیتوزان نوع ویتنامی از پوسته خرچنگ به دست آمده است. آنالیزهای تشخیص کیفی مقایسه‌ای بالا در شرایط یکسان با سه نمونه کیتوزان (پوسته سیست آرتمیا، پوسته میگو و پوسته خرچنگ) بعمل آمد.

۹-۲- روش زیستی استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان

برای استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزن، مراحل آن مطابق شکل ۳-۲ به استناد روش‌های سایر محققین طراحی و مورد آزمایش قرار گرفت (A. P. T, 2002).



شکل ۳-۲- مراحل استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان با روش زیستی

- تهیه باکتری

باکتری باسیلوس سوبتیلیس بعنوان تولید کننده آنزیمهای پروتئولیتیک و فاقد آنزیم کیتیتاز (بی‌تأثیر بر روی کیتین) است. این باکتری با کدهای PTCC 1331, PTCC 1595 (۲ سوش از آن باکتری) از سازمان پژوهشهای علمی- صنعتی کشور بصورت لیوفیلیزه تهیه شد (Jacguelyn. et. Al, 2000).

شکل ۴-۲- آمپول لیوفیلیزه باکتری باسیلوس

- کشت اولیه باکتری

آمپولهای لیوفیلیزه شده باکتریهای فوق در زیر هود لامینار استریل و سپس باز شده به هر کدام ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژیکی استریل اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصله روی محیط‌های کشت میکروبی نوترینت آگار و بلاد آگار کشت داده شد. دمای گرماگذاری ۳۷ درجه سانتیگراد و مدت آن تا ۱۲۰ ساعت در شرایط pH ۷/۲ بود (Strikntaiah et Al, 1980).

شکل ۵-۲- کشت اولیه باکتری باسیلوس سوبتیلیس

پس از اطمینان از خلوص کلنی‌ها آزمایش‌های استاندارد بیوشیمیایی باکتریولوژیکی انجام شد و کشت اسلانت تهیه شده بعنوان مخزن ذخیره باکتری برای استفاده، به یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد منتقل شد.

- بررسی سنتیک رشد

پس از تعیین تراکم با روش ملک فارلین مقدار سه میلی لیتر حاوی ۵۴×۱۰^{۸} باکتری زنده از کشت اولیه به دو ارلن هر کدام حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث سترون تلقیح شد، با شاهد بدون باکتری تا مدت ۱۲۰ ساعت بر روی همزن در انکوباتور با دمای $۳۷^{\circ}C$ گرماگذاری شد. برای تعیین نمودار رشد باکتریایی، طی زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از آنها نمونه‌برداری و در لوله‌های سترون حاوی PBS رقت‌سازی شد و با روش شمارش زنده[1]، نمودار رشد باکتری تعیین گردید.

- اندازه‌گیری آزمایش الکتروفورز برای تعیین فعالیت آنزیمی

آزمایش به روش زیموگرام[2] انجام شد. بدین منظور ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع باکتری که حدود ۹۶ ساعت در شرایط بهینه کشت داده شده بود، با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد، همزمان با آن ژل آکریل آمید ۱۰ درصد حاوی پروتئین به عنوان سوبسترای عمومی مواد پروتئینی با غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد. رنگ مورد استفاده بروموفنل بلو R-250 بود (Worthington, 2001).

برای تهیه ژل، مقدار ۳/۶۶ میلی لیتر از آکریل آمید را با ۶ میلی لیتر بافر ژل و ۶ میلی لیتر گلیسرول ۵۰ درصد مخلوط نموده و به آن مقدار ۳ میلی لیتر محلول ژلاتین اضافه شد. سپس بلافاصله مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۲۸ میکرولیتر تمد (TEMED)[3] به آن اضافه و پس از مخلوط کردن بلافاصله به قاب شیشه‌ای ژل الکتروفورژ منتقل گردید و برای یکنواخت شدن سطح بالایی ژل الکل اتیلیک ۵۰ درصد اضافه شد [مصطفایی .۱۳۸۷]. تشکیل ژل بعد از یک ساعت کامل شد. سپس ژل متراکم کننده آکریل آمید را تهیه نموده و به بخش بالایی اضافه شد. بافر مورد استفاده محلول هیدروکلراید تریس ۶۲/۵ میلی مولار با پی اچ معادل ۶/۸ دارای ۲۵ درصد گلیسرول و ۴ درصد SDS[4] و ۰/۰۱ درصد بروموفنل بلو بود. در وهله اول برای کنترل و مشاهده وجود هر گونه فعالیت آنزیم های محیط کشت باکتریایی، مقداری از مایع رویی کشت نمونه گذاری شد، تا فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک با هضم ژلاتین و بی‌رنگ نمودن ژل مشخص گردد. از آنزیم تریپسین به عنوان شاهد استفاده شد (یعقوبی و همکاران، ۱۳۸۱)، ژل متراکم کننده شامل (۲۵۰ میکرولیتر آکریل آمید، ۷۵۰ میکرولیتر بافر ژل، ۰/۵ میلی لیتر ژلاتین، ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر آمونیوم سولفات ۱۰ درصد و ۳ میکرومتر TEMED بود.

---

[1] - Total Count
[2] - Zymogram
[3] - N,N,N,N-tetramethyle-ethylene-diamine
[4] - Sodium dodecyl sulfate

- سنجش قدرت فعالیت آنزیمی

برای سنجش فعالیت آنزیمی از سرعت تغییر رنگ (فعالیت آنزیم بر روی سوبسترای رنگی) دستگاه اسپکتروفتومتر روی طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد (Copmsen et al, 2000). بافر این آزمایش ۱۰۰ میلی مولار تریس با ۱۰ میلی مولار کلرید کلسیم، ۰/۲ دصد BSA (سرم آلبومین گاوی) است. برای سنجش فعالیت آنزیمی به نسبت ۱: ۱: ۱ از (بافر: مایع رویی: سوبسترا) را مخلوط و به درون کووت دستگاه ریخته و بلافاصله پس از صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر به مدت ۳۰ دقیقه تغییرات جذب نوری حاصله از تأثیر آنزیم بر روی سوبسترای، مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از رابطه لووری[1] و همکاران یعنی رابطه $(\frac{\Delta A}{\min} = aL\frac{\Delta C}{\min})$ فعالیت آنزیم‌ها محاسبه شد که در این رابطه L قطر کووت، $\frac{\Delta C}{\min}$ فعالیت آنزیمی در دقیقه، $\frac{\Delta A}{\min}$ تغییرات جذب نوری در دقیقه، a ضریب جذب نوری و ΔC قدرت فعالیت آنزیمی برحسب واحد بین‌المللی (IU) به میکرومول در دقیقه است. سوبسترای این آزمایش شامل محلول ۲۰ میلی لیتر SAAPF-PNA[2] در حلال DMSO [3] است. برای تعیین وزن مولکولی آنزیم های موجود در محیط کشت از روش SDS-PAGE [4] استفاده شد. در این روش مقدار ۳۰ میلی لیتر از مایع رویی محیط شت باکتری به روی غشاء ۱۰ کیلو دالتونی به حجم ۲ میلی لیتر رسانیده و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن با بافر نمونه مخلوط و ۷۰ میکرولیتر از آن به روی ژل نمونه گذاری شد. آزمایش در دو شرایط احیایی با (حضور مرکاپتواتانول) و غیر احیایی (بدون حضور ماده مذکور) انجام شد. در این روش از ۵ میلی لیتر محلول بافر نیم مولار هیدروکلراید تریس با ۴ میلی لیتر SDS ۲۰ درصد در پی اچ ۶/۸ به همراه ۴ میلی لیتر گلیسرول ۵۰ درصد و ۴ میلی گرم بروموفنل بلو و ۶ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. در شرایط غیراحیایی به جای مانده مرکاپتو اتانول از آب مقطر استفاده شد (Yokoi et al, 2011).

- روش زیستی استخراج کیتین به روش (SHIMORA.ET .AL)

به استناد روش شیمورا و همکاران برای استخراج کیتین با روش زیستی تعداد ۲ نمونه ۱۰۰ گرمی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا توزین و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد در مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. سپس نمونه های سترون شده به دو ارلن سترون ۲/۵ لیتری با شرایط ذیل منتقل شد:

ارلن شماره ۱: حاوی ۱۰۰ گرم پوسته سیست سترون آرتمیا، ۱۰ گرم پودر دی پتاسیم هیدروژن فسفات (به عنوان تأمین کننده پتاسیم و فسفر) و یک لیتر آب مقطر. (این آزمایش برای کنترل احتمال استفاده مستقیم باکتری از ترکیبات پروتئینی پوسته است).

---

[1] - Lowery et al.
[2] - N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phep-nitranilide
[3] - Dimethyl-sulfa-oxsamid
[4] - SDS Poly acrylamide gel electrophoreses

ارلن شماره ۲: حاوی ۵۰ گرم پوسته سیست آرتمیا به انضمام یک لیتر محیط کشت سترون نوترینت براث.
ارلن شماره ۳: یک لیتر محیط کشت سترون نوترینت براث به عنوان شاهد بدون باکتری.
پس از تعیین تراکم با لوله‌های مک فارلین به ارلن شماره ۱ و ۲ هر کدام مقدار ۳ میلی لیتر از کشت ۳ روزه باکتری باسیلوس سوبتیلیس تلقیح شد. پی اچ نمونه ها بر روی ۷/۲ کنترل شد، تمامی نمونه‌ها به شیکر- انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۵ روز منتقل و در روز سوم برای کنترل رشد باکتریایی، نمونه برداری انجام شد. پس از روز پنجم، کشت متوقف و پس از سترون نمودن در اتوکلاو در قیف بوخنر با کاغذ صافی جمع آوری سپس شستشو و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد خشک گردید .
مراحل بعدی و خالص سازی آن همانند روش شیمیایی انجام شد.
آزمایش میزان حذف شدگی مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتریایی نیز در این مرحله آزمایش شد.

۱۰-۲- روش آزمایش‌های تعیین کیفیت و کمیت کیتین استخراج شده با روش زیستی

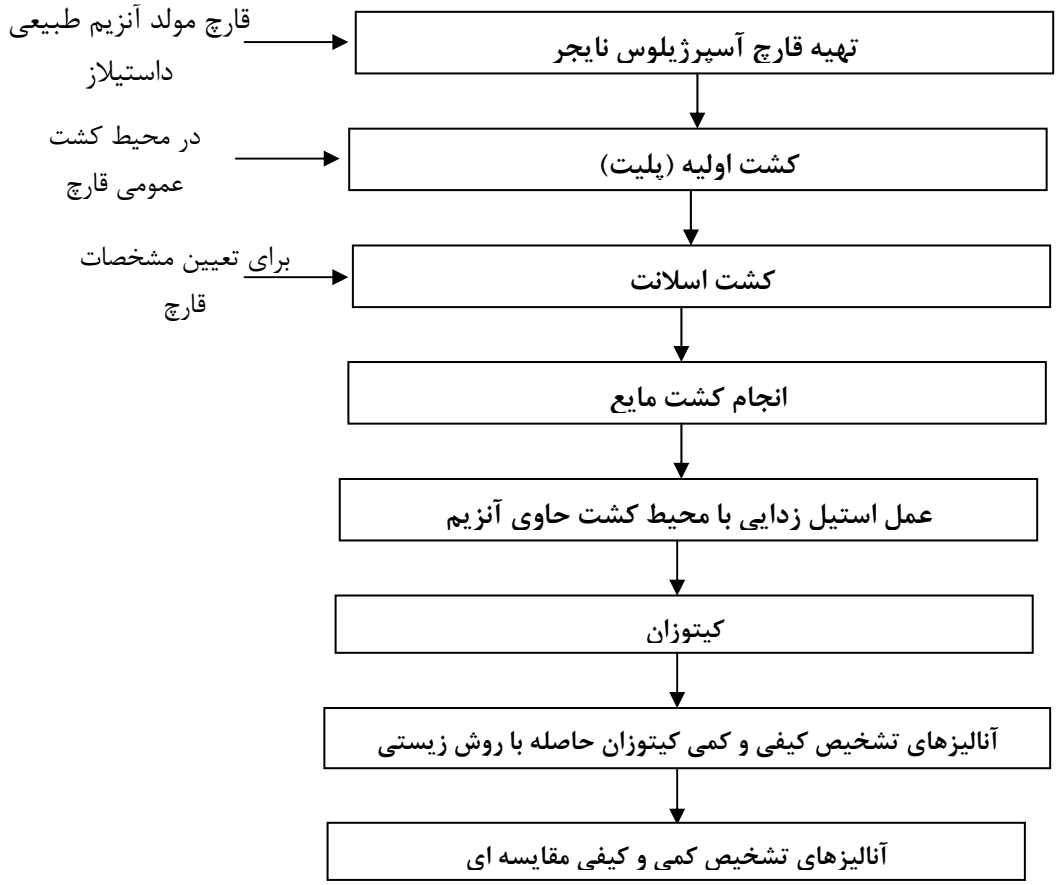
پس از اتمام مرحله خالص سازی روش استخراج زیستی، نمونه ها با شرایط یکسان قبلی جمع آوری و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در آون خشک و آنالیزهای تشخیص کیفی همانند آنچه قبلاً اشاره شد، یعنی (تجزیه عنصری دستگاهی، طیف‌سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، گرانروی سنجی، تعیین وزن مولکولی و رنگ) با شرایط یکسان بر روی کیتین حاصله از روش زیستی نیز انجام شد.

۱۱-۲- روش آزمایش‌های تعیین کیفیت چهار نوع کیتین و مقایسه آن‌ها با هم

برای بررسی های مقایسه ای و ارزیابی نتایج، از ۲ نوع کیتین تجاری اشاره شده در قبل نیز استفاده شد. تمامی آنالیزهای تعیین کیفیت با شرایط یکسان در ۴ نمونه کیتین (A, B, C و D) به عمل آمد که مشخصات نمونه‌ها به شرح ذیل بود:
نمونه A، کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیای اورمیانا با روش شیمیایی بهینه شده
نمونه B، کیتین استخراج شده از پوسته میگو که با روش شیمیایی در کشور ویتنام در شرکت A.P.T .co استخراج شده است .
نمونه C، کیتین استخراج شده از پوسته خرچنگ که با روش شیمیایی در کشور ویتنام در شرکت A.P.T .co استخراج شده است .
استخراج شده است.
نمونه D، کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا که با روش زیستی استخراج شده است .

۱۲-۲- روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان

برای انجام این مرحله از پژوهش و تولید کیتوزان، براساس شکل ۳-۶ اقدام شده:



شکل ۶-۲- روش تبدیل زیستی کیتین به کیتوزان

- تهیه و کشت اولیه قارچ آسپرژیلوس نایجر

قارچ آسپرژیلوس نایجر مولد آنزیم داستیلاز با شماره کد ATCC 10864 از ککسیون قارچی گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی- مهندسی دانشگاه تربیت مدرس به صورت کشت اسلانت مادر تهیه شد برای انجام کشت اولیه از محیط کشت عمومی بیولایف[1](Potato Dextrose Agar) استفاده شد، مقدار ۵ گرم از این محیط کشت در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل شد، و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد و به پلیت‌ها منتقل گردیده پس از رسیدن به دمای مورد نظر مقدار یک سانتی متر مربع از اسپورهای اسلنت مادر به محیط کشت منتقل و به مدت سه روز در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. (به علت گسترش

[1] -Aspirgilus nger

اسپورهای قارچی در محیط آزمایشگاهی و خطرناک بودن آن، نبایستی محیط های کشت حاوی قارچ در هوای آزاد قرار گیرد).

شکل ۷-۲- کشت اولیه قارچ آسپرژیلوس نایجر

- کشت انبوه قارچ برای استیل زدایی

برای تهیه کشت انبوه قارچ برای تولید آنزیم به منظور تبدیل کیتین به کیتوزان از محیط کشت اختصاصی این قارچ شامل: (پپتون ۱ درصد، عصاره مالت ۲ درصد، گلوکز ۲ درصد، منیزیم سولفات آبدار ۲ درصد، عصاره مخمر ۳ درصد) در یک لیتر آب مقطر استفاده شد . آزمایش‌ها در دو روش زیر انجام شد:

روش اول: به استناد روش سیمپ سون و همکاران مقدار ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی مایع قارچ تهیه شد و سپس مقدار یک سانتی مترمربع از اسپورهای قارچ آسپرژیلوس نایجر از محیط کشت پلیت به آن تلقیح شد و به مدت ۵۰ ساعت بر روی شیکر- انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در دور ۱۸۰ در دقیقه گرماگذاری شد، سپس ۲ نمونه ۱۰ گرمی از کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا که به روش زیستی تهیه شده بود، توزین و در روز دوم به محیط های کشت اضافه شد. پس از سه روز، محصول نهایی جداسازی و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد و در آون در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت خشک گردید.

روش دوم: میزان یک سانتی متر مربع از کشت روز سوم پلیت قارچ به ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت اختصاصی مایع آن تلقیح و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در شیکر- انکوباتور گرماگذاری شد. پس از پایان مدت گرماگذاری برای استخراج و خالص سازی آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شده و با ۵ میلی لیتر استات سدیم مخلوط و سپس در دور ۴۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد، مایع فوقانی حاصله از سانتریفوژ جدا شد و به آن مقدار ۱۰ گرم از پودر کیتین استخراجی از پوسته سیست آرتمیا با روش زیستی اضافه شد. مخلوط نهایی در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شیکر- انکوباتور با دور ۱۸۰ در دقیقه قرار داده شد، پس از جداسازی، نمونه چند بار با آب مقطر کاملاً شستشو شده و محصول نهایی در دمای ۸۰ درجه به مدت ۴ ساعت در آون خشک گردید.

- روش تعیین درجه استیل زدایی کیتوزان حاصله با روش زیستی

همان طوری که قبلاً ذکر شد، برای تعیین درجه استیل زدایی (تبدیل گروه های استیل به گروه های آمین) از تغییرات باندهای جذبی، گروه های مذکور در طیف FTIR آنها استفاده شد. این تغییرات مربوط به پیک‌های A_{1655} و A_{3450} اندازه‌گیری و از طریق رابطه مایا و همکاران[1] یعنی معادله $\%N\text{-acetylation}=(A_{1655}/A_{3450})\times 115$ محاسبه شد.

۱۳-۲- آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت کیتوزان حاصله از روش زیستی

کلیه آنالیزهای تشخیص کمی و کیفی (تجزیه عنصری دستگاهی، طیف سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، گـــرانروی سنجی، تعیین وزن مولکـــولی، سنجش درجه استیل زدایی) بر روی
کیتوزان حاصله از روش زیستی، همانند روش های قبلی انجام شد.

۱۴-۲- آنالیزهای تعیین کیفیت ۴ نمونه کیتوزان و مقایسه آن‌ها با هم

جهت ارزیابی نتایج و مقایسه آنها با هم دیگر، آزمایش های تشخیص کیفی و کمی مقایسه‌ای با شرایط یکسان با چهار نمونه کیتوزان (C, B, C و D) به عمل آمد که مشخصات نمونه‌ها به شرح ذیل است:

A، کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیای اورمیانا (روش شیمیایی)

B، کیتوزان استخراج شده از پوسته میگو (روش شیمیایی)

C، کیتوزان استخراج شده از پوسته خرچنگ (روش شیمیایی)

D، کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا (روش زیستی)

چون آنالیزها کیفی است، یک بار تکرار شده و نتایج آنها یک جا به صورت مقایسه ای در بخش نتایج آورده شده است.

۱۵-۲- روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در این تحقیق آزمایش های کمی تعیین درصد کیتین و اجزاء تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا با سه تکرار انجام شده است.

روش آماری و برآورد صحت نتایج آزمایش ها با آزمون تی- تست[2] و از رابطه $\overline{X} \pm t_{\frac{\alpha}{2}(n-1)} \times \frac{S_{td}}{\sqrt{n}}$ با ضرایب اطمینان ۹۵ دصد ($\alpha = 0.05$) با نرم افزار SPSS تعیین و برآورد شده است که در این رابطه: $\overline{X}$ میانگین داده، ($1-\alpha$) ضریب اطمینان، ($\alpha = 0.05$) فاصله اطمینان $n-1=df$ درجه آزادی و $S_{td}=\delta$ انحراف معیار می باشد .

---

[1] - Miya et al. 1992

[2] - T-test

۳- نتایج

۱-۳- نتایج تجزیه شیمیایی پوسته سیست آرتمیا

در این تحقیق مقدار ۲۰ کیلوگرم از پوسته‌ها که به صورت تصادفی برداشت شده و بعد از جداسازی، و تمیز کردن آنها از ضایعات ،شن و....در پایان این مرحله مقدار ۱۶/۵ کیلوگرم پوسته خالص بدست آمد، پوسته سیست آرتمیا دارای رنگ نارنجی متمایل به زرد تا قهوه‌ای و ضخامت ۹ میکرومتر و با وزن متوسط ۲/۵ میکروگرم براساس وزن خشک می باشد.

شکل ۱-۳- تصویر میکروسکوپی پوسته سیست آرتمیای مورد استفاده در پژوهش (بزرگ نمایی ۲۵۰ برابر)

۲-۳- نتایج تجزیه شیمیایی پوسته سیست آرتمیا

ابتدا جهت تعیین اجزاء تشکیل دهنده شیمیایی، پوستهٔ سیست آرتمیای دریاچه مورد تجزیه قرار گرفت، نتایج حاصله در جدول ۱-۳ آورده شده است.

جدول شماره ۱-۳- ترکیب اجزاء تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

نوع ترکیب	مواد پروتئینی	خاکستر تام	چربی کل	مواد رنگی	رطوبت	کیتین
درصد	۳۲±۳	۲۱±۴	۴/۸±۲	۰/۵	۱۱±۲	۲۸±۳

با توجه به مطالعات مروری، این آنالیز به عنوان اولین گزارش تحقیقاتی در این مورد تلقی می‌شود. مقایسه ترکیب و درصد اجزاء پوسته سیست آرتمیا با ترکیب و درصد توده زیستی زنده آرتمیا و ترکیب خود سیست آرتمیا کاملاً متفاوت است.

۳-۳- نتایج تعیین نوع و درصد ترکیب مواد معدنی تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا

پرتو نگاری با اشعه ایکس (XRF) یکی از پیشرفته‌ترین روش‌ها در شناسایی کانی‌ها در علم زمین‌شناسی است، که از این روش در این پژوهش در تعیین نوع ساختار و درصد مواد معدنی تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا استفاده شد که نتایج حاصله در جدول ۲-۳ آورده شده است.

جدول ۲-۳- نوع و درصد ترکیب مواد معدنی موجود در پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

نام ترکیب معدنی	Zn	Na_2O	MgO	SO_3	Cl	K_2O	CaO	Fe_2O_3
درصد تشکیل دهنده	۰/۰۵	۱/۹۲	۱/۱۴	۶/۸۲	۳/۲۳	۲/۱۲	۴/۰۵	۱/۶۸

۴-۳- نتایج استخراج کیتین به روش شیمیایی بهینه شده

مقدار ۵۰ گرم پوسته سیست آرتمیا برای استخراج کیتین مورد آزمایش قرار گرفت و ترکیبات همراه آن حذف گردیدف کارایی روش‌ها در هر مرحله مورد بررسی قرار گرفت که درصد باقیمانده مواد به همراه کیتین به شرح جدول ۳-۳ آورده شده است.

جدول ۳-۳- درصد باقیمانده ترکیبات توام با پوسته سیست آرتمیا در استخراج کیتین به روش شیمیایی

نوع ترکیب	مواد پروتئینی	خاکستر کل	چربی کل	محصول نهایی کیتین به گرم
درصد باقیماندگی	۰/۶۵	۰/۹۴	۰/۰۷	۱۴ ± ۳

در خاتمه محصول نهایی استخراج شده را خشک نموده و پس از توزین مقدار ۱۳ گرم کیتین بدست آمد.
صحت نتیجه نهایی و تعیین درصد وزنی کیتین موجود در پوسته با سه تکرار انجام و همانند آنچه قبلاً اشاره شد روش آزمون آماری T-test تعیین و برآورد گردید. براساس این نتایج پوسته سیست آرتمیا اورمیانا حاوی ۳±۲۸ درصد کیتین است.

- نتایج تجزیه عنصری دستگاهی (CHN-O-analyser) :

عناصر N،O، H و C تشکیل دهنده یک ماده مجهول را می توان با دستگاه تجزیه عنصری تعیین نمود، با انجام این آنالیز فرمول تجربی و مولکولی ماده مجهول نیز شناخته می‌شود (Arcidiaconno, et al, 2010)

مکانیسم کار دستگاه براساس رابطه ۱-۳ بشرح ذیل است که:

$$C_xH_yN_wO_z + O_2 \xrightarrow[\text{اکسید مس}]{} xCO_2 + \frac{y}{2}H_2O + \ldots + ZN_2$$

رابطه۱-۳ حرارت ۶۰۰ درجه سانتیگراد (ماده مجهول)

که به وسیله کاتالیزورها و آشکارسازهای مخصوص در آن دستگاهها درصد عناصر نیتروژن، کربن، ئیدروژن و اکسیژن مشخص می‌شود، و از نتایج حاصله از این رابطه می‌توان فرمول تجربی و مولکولی را محاسبه نمود. این آنالیز بر روی کیتین پوسته سیست آرتمیا به عمل آمد که نتایج آن در جدول ۴-۳ آورده شده است.

جدول شماره ۴-۳- نتایج تجزیه عنصری کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد عنصر	۴۸/۶	۷/۶	۷۸	۳۶/۸

- نتایج تعیین فرمول شیمیایی:

با مشخص شدن درصد عناصر تشکیل‌دهنده یک ماده آلی مجهول فرمول تجربی مونومر آن را می‌توان از روش کرایوسکوپی براساس تعداد مول‌های عناصر موجود در ساختمان آن ماده، به طریقه ذیل بدست آورد:

$$\text{تعداد مول‌های کربن} = \frac{۴۸/۶}{۱۲/۰۱} = ۴/۰۱ \rightarrow ۴/۰۱ \div ۰/۵۴ = ۷/۴$$

$$\text{تعداد مول‌های ئیدروژن} = \frac{۷۸}{۱/۰۰۸} = ۶/۹۴ \rightarrow ۶/۹۴ \div ۰/۵۴ = ۱۲/۸۵$$

$$\text{تعداد مول‌های نیتروژن} = \frac{۷/۶}{۱۴/۰۰۳۱} = ۰/۵۴ \rightarrow ۰/۵۴ \div ۰/۵۴ = ۱$$

$$\text{مقدار مول‌های اکسیژن} = \frac{۳۶}{۱۶} = ۲/۳ \rightarrow ۲/۳ \div ۰/۵۴ = ۴/۲ + ۱$$

در این خصوص فرمول تجربی هر واحد تشکیل دهنده کیتین پوسته سیست آرتمیا برابر ($C_{7.6}H_{12}N\ O_{4.2}$) تعیین شد .

درصد عناصر به دست آمده از تجزیه عنصری کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با درصد مقادیر کیتین استاندارد آن با هم مقایسه شد در جدول ۵-۳ آورده شده است .

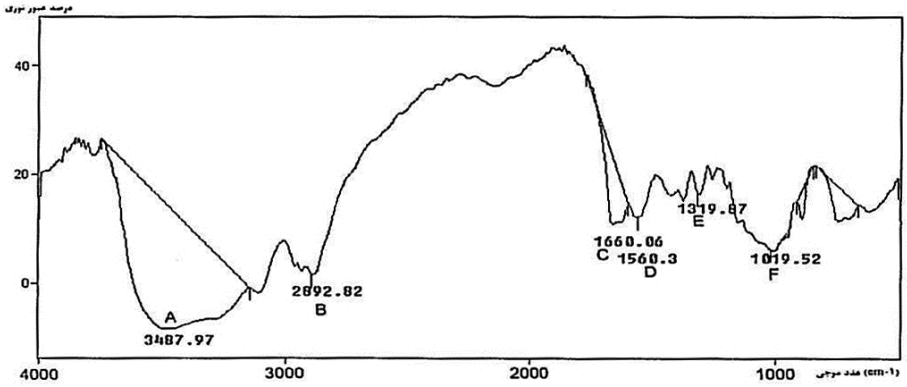
جدول ۵-۳- مقایسه درصد عناصر تشکیل دهنده کیتین به صورت تجربی و تئوری

عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد (کیتین استاندارد)	۴۷/۲۶	۶/۸۹	۶/۴۵	۲۹/۳۸
درصد (کیتین پوسته سیت آرتمیا)	۴۸/۶	۷/۶	۷	۳۶/۸

اختلاف جزیی درصد عناصر، مربوط به منبع اولیه، روش عمل‌آوری، درصد رطوبت و ... است.

- نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز

این آنالیز از پیشرفته‌ترین روش‌ها در تعیین ساختار گروه‌های عاملی و نوع پیند بین مولکول‌ها در ترکیبات شیمیایی آلی (پلیمر) بشمار می‌آید، که درصد جذب اشعه مادون قرمز برای هر گروه عاملی اختصاصی بوده و مختص آن گروه عاملی در پلیمر مجهول است، این آزمایش برای تعیین گروه‌های عاملی موجود بر روی کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه نیز انجام شد، که نتایج آن در شکل ۴-۲ آورده شده است:

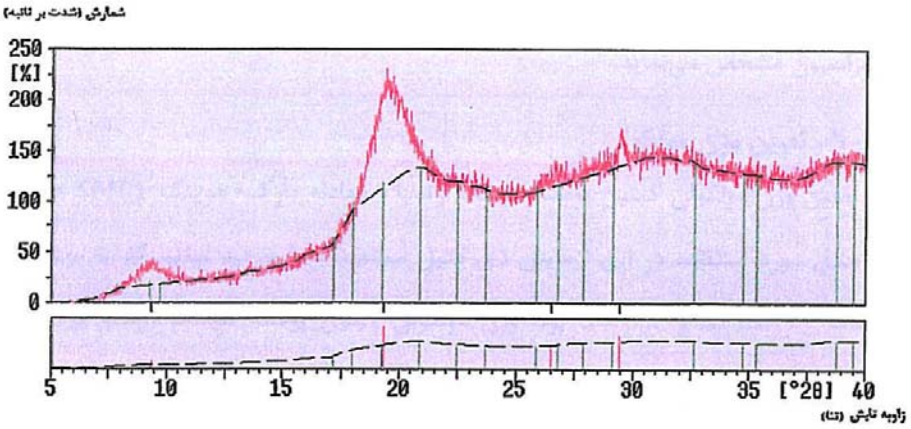


شکل ۲-۳- طیف FTIR نمونه کیتین استخراج شده با روش شیمیایی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

در طیف سنجی FTIR بر روی کیتین پوسته سیست آرتمیا وجود باندهای جذبی cm^{-1} ۳۴۸۷/۹، cm^{-1} ۲۸۹۲/۸، cm^{-1} ۱۵۶۰/۳، cm^{-1} ۱۶۶۵/۶، cm^{-1} ۱۳۱۹، cm^{-1} ۱۰۱۹/۱ وجود گروههای آمینواستیل، C-H-OH در پلیمر کیتین را نشان می دهد.

- نتایج طیف‌سنجی پراش پرتوهای ایکس (XRD)

این روش از پیشرفته‌ترین آزمایش‌ها در تعیین ساختار بلوری ترکیبات و پلیمرها به شمار می‌آید. برای تعیین درصد بلورینگی کیتین، این آنالیز بر روی نمونه آن انجام شد که نتایج آن در شکل ۴-۳ آورده شده است.



D I F F R A C T I O N L I N E S :

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
6.225	14.18688	14.22178	0.200	3	3	0.3	0.80
8.620	10.24979	10.27500	0.640	15	27	1.5	1.26
12.490	7.08126	7.09868	0.480	30	76	2.9	1.09
14.035	6.30502	6.32053	0.160	151	96	14.5	0.99
16.820	5.26680	5.27976	0.200	210	132	20.2	1.87
18.605	4.76533	4.77705	0.480	262	156	25.2	2.05
19.740	4.49382	4.50487	0.320	380	172	36.4	1.24
20.890	4.24896	4.25941	0.080	488	185	46.8	0.75
21.500	4.12976	4.13992	0.200	511	193	49.0	1.07
21.970	4.04247	4.05241	0.240	380	199	36.4	0.79
23.855	3.72713	3.73630	0.560	222	225	21.3	2.89
25.290	3.51880	3.52746	0.400	130	243	12.5	0.89

شکل۳-۳- طیف‌سنجی اشعه ایکس کیتین استخراج شده با روش شیمیایی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

براساس نتایج پراش اشعه ایکس، پیک شاخص در زاویه ۱۹/۵ تتا تشکیل شده است که مختص شاخص بلوری پلیمر کیتین است. براساس نتایج جدول آنالیز پراش اشعه ایکس درصد بلورینگی در پیک ۱۹/۵ به دست آمده است، که درصد آن معادل ۳۶/۴ می‌باشد.

- نتایج اندازه‌گیری گرانروی

گرانروی کیتین پوسته سیست آرتمیا استخراج شده با روش شیمیایی در این آنالیز ۲۷ سانتی‌پوآز تعیین گردید. نتایج حاصله از این آنالیز در بررسی تأثیر مواد شیمیایی در افت کیفیت محصول، حایز اهمیت است، و میزان تأثیر هیدروکسید سدیم را در ایجاد پدیده‌های تغییر ساختمان فضایی و دپلیمزاسیون مشخص می‌نماید.

- نتایج تعیین وزن مولکولی

تعیین وزن مولکولی کیتین پوسته سیست آرتمیا با معادله مارک- هوینگ ($[\eta]=KM_V^{\alpha}$) انجام شد. حلال مورد استفاده در این آزمایش دی متیل استامید با ۵ درصد لیتیم کلراید بود که در آن $K=1.4\times10^{-2}cm^3g^{-1}$ و $\alpha=0.8$ بود. وزن مولکولی کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا در این آزمایش براساس گرانروی حاصله از دستگاه محاسبه و معادل ۴/۱×۱۰^{۶} دالتون تعیین شد. که نحوه محاسبه آن بشرح ذیل است:

1) $[\eta]=KM_V^{\alpha}\Rightarrow 27=1.4\times10^{-2}M_V^{0.8}\Rightarrow$

چون گرانروی دستگاه به سانتی پوآز است پس داریم:

2) $2700=1.4\times10^{-3}M_V^{0.8}\Rightarrow$ 3) $M_V^{0.8}=\dfrac{2700}{1.4\times10^{-3}}=192857.1$

از طرفین رادیکال می‌گیریم، پس داریم:

4) $M_V=\sqrt[0.8]{1928571}\Rightarrow M_V=4541515.6\approx4.1\times10^6$ دالتون

-نتایج رنگ سنجی

در بررسی و تشخیص رنگ، رنگ کیتین پوسته سیست آرتمیا خاکستری متمایل به قهوه‌ای است، در رنگ سنجی ظاهری از گروه تست پانل (از ترکیب پنج نفر) استفاده شد.

۵-۳- نتایج آنالیزهای تعیین کیفیت کمیت

برای انجام تعیین کمیت و کیفیت حاصله از کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا با انواع مشابه دیگر دو نوع کیتین تجاری خریداری شد، که شامل کیتین شرکت T.N.T چین (استخراج شده از پوسته میگو) و شرکت A.P.T ویتنام (استخراج شده از پوسته خرچنگ) بود. هر دوتایی این کیتین ها نیز با روش شیمیایی عمل آوری شده اند. آنالیزهای تشخیص کیفی مقایسه ای بالا در شرایط برابر با سه نوع کیتین مذکور بعمل آمد که نتایج حاصله به شرح جداول های ۶-۳ و ۷-۳ و شکلهای ۴-۳ و ۵-۳ آورده شده است.

جدول ۶-۳- نتایج آنالیز تجزیه عنصری سه نوع کیتین

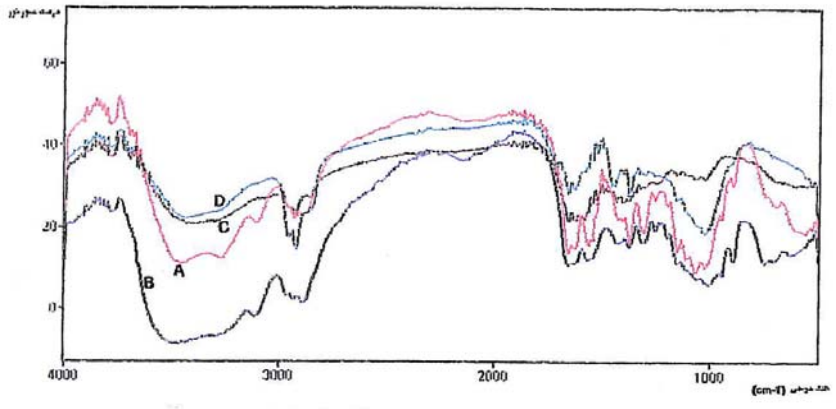
نوع کیتین	درصد کربن ٪C	درصد نیتروژن ٪N	درصد ئیدروژن ٪ H	درصد اکسیژن ٪O
کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا	۴۸/۶	۷/۶	۷/۰	۳۶/۸
کیتن پوسته خرچنگ	۴۴/۸	۶/۲	۶/۶	۴۲/۴
کیتین پوسته میگو	۴۷/۱	۶/۸	۶/۴	۳۹/۴

جدول ۷-۳ : مقایسه خصوصیات وزن مولکولی، گرانروی، و رنگ کیتین بدست آمده از منابع اولیه مختلف

نوع کیتین	متوسط وزن مولکولی (دالتون)	گرنروی (Cps)	رنگ
کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا	۴/۱×۱۰^۶	۲۷	خاکستری متمایل به قهوه‌ای
کیتن پوسته خرچنگ	۳/۲×۱۰^۶	۲۲	سفید مات
کیتین پوسته میگو	۳/۵×۱۰^۶	۲۲	سفید برقی

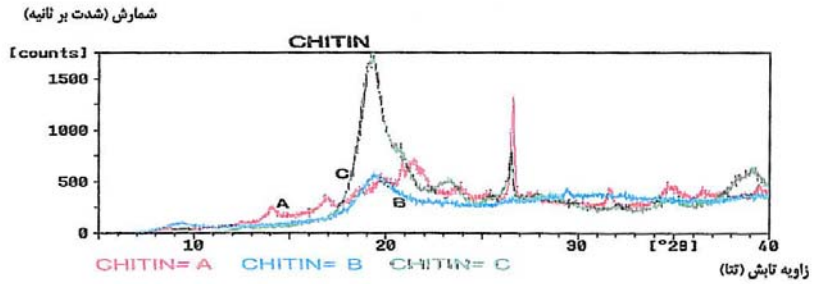
مقایسه اوزان مولکولی نشان می‌دهد که کیتین پوسته سیست آرتمیا، دارای مقدار مونومرهای بیشتر است، لذا ممکن است وجود اختلاف جزئی منجر به ایجاد مشتقات جدید شود. تفاوت وزن مولکولی مربوط به منبع اولیه، روشهای عمل آوری، درصد رطوبت و ... است.

نتایج حاصله از طیف سنجی های مقایسه‌ای FTIR و XRD این نمونه‌های کیتین بشرح اشکال ۴-۴ و ۴-۵ می باشد:



شکل ۴-۳- طیف های FTIR سه نوع کیتین به انضمام طیف استاندارد آدریچ:
A- طیف کیتین آرتمیا B- طیف کیتین ویتنامی C- طیف کیتین استاندارد آدریچ
D- طیف کیتین چینی

به منظور ارزیابیهای دقیق‌تر طیف کیتین استاندارد مؤسسه تحقیقات آدریچ نیز در مقایسه آورده شده است [۵۷].



شکل ۵-۳- طیف های XRD سه نوع کیتین (c, B, A)
A- کیتین پوسته میگو B- کیتین پوسته سیست آرتمیا C- کیتین پوسته خرچنگ

تفاوت‌های جزیی بسته به نوع منبع اولیه استخراجی، روش‌های عمل‌آوری، درصد رطوبت می‌باشد.

۶-۳-نتایج تبدیل کیتین به کیتوزان با روش شیمیایی

برای تبدیل کیتین به کیتوزان مقدار ۱۰ گرم از پودر کیتین حاصله را استیل‌زدایی نموده و در خاتمه مقدار ۵/۵ گرم کیتوزان بدست می‌آید. راندمان تبدیل کیتین به کیتوزان ۵۰±۵ درصد وزنی تعیین شد. راندمان عمل را درجه استیل زدایی[1] (D.D.A) می‌نامند و با استفاده از رابطه $\%N\text{-acetylation}=(A_{1655}/A_{3450})\times 115$ و با اندازه‌گیری حداکثر جذب باندهای مربوط به گروه‌های آمینی و N- استیلی محور عمودی نمودار طیف‌سنجی FTIR به شرح ذیل محاسبه شد:

$$\text{درجه استیل‌زدایی (1} = Log\ \%29 \div Log\ \%7 \times 115 = \frac{-0.58}{-1.015} \times 115 \approx 55$$

برای برسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوازن حاصله از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا آنالیز تعیین کمیت و کیفیت که قبلاً آن اشاره شده، انجام شد که شامل:

- نتایج تجزیه عنصری دستگاهی

از این آزمایش برای شناسایی و تعیین ساختمان مولکولی عناصر تشکیل دهنده کیتوزان استفاده گردید و نتایج حاصله در جدول ۸-۳ آورده شده است:

جدول ۸-۳- نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتوزان پوسته سیست آرتمیا ارومیانا

نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد عنصر	۴۱/۴	۷/۷	۶/۷	۴۴/۲

[1] -Degree of deacetylation

با مشخص شدن درصد عناصر تشکیل دهنده کیتوزان، فرمول تجربی هر مونومر تشکیل دهنده پلیمر کیتوزان با روش کرایوسکوپی، و با تعیین تعداد مولهای کربن، نیتروژن، اکسیژن و ئیدروژن ($C_6H_{11}NO_4$) تعیین شد. فرمول حقیقی آن ضریبی از n مونومر $(C_6H_{11}NO_4)_n$ است.

درصد عناصر به دست آمده از تجزیه عنصری کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با درصد مقادیر کیتوزان صد در صد خالص (استاندارد) آن به صورت مقایسه‌ای در جدول ۴-۱۱آورده شده است [۶، ۲۸].

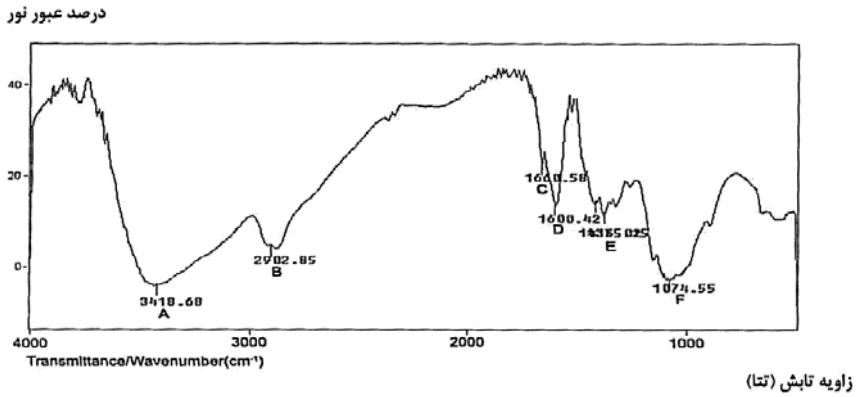
جدول ۹-۳- مقایسه درصد عناصر تشکیل دهنده کیتوزان به صورت تجربی و تئوری

عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد در کیتوزان صد در صد خالص	۴۰/۶	۳/۲	۷/۴	۴۵/۸
درصد در کیتوزان آرتمیا	۴۱/۴	۷/۷	۶/۷	۴۴/۲

اختلاف‌های جزیی از درصد عناصر مربوط، به منبع اولیه مورد استفاده، روش‌های عمل‌آوری و درصد رطوبت و ... است.

- نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز

برای مشخص نمودن گروه‌های عاملی موجود در کیتوزان پوسته سیست آرتمیا، طیف‌سنجی مادون قرمز به عمل آمد که نتایج طیف آن در شکل ۴-۶ آورده شده است.

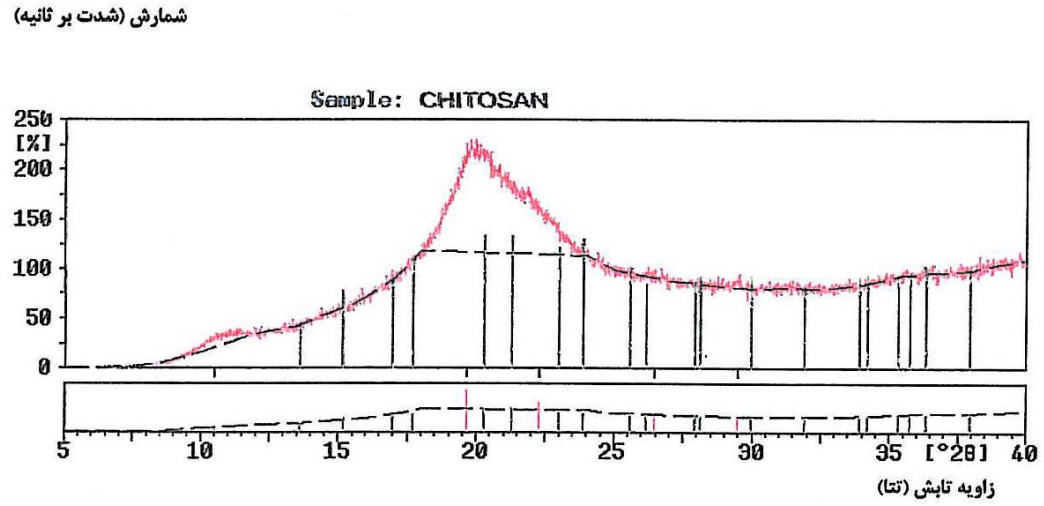


شکل ۶-۳- طیف FTIR کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با روش شیمیایی

پیک های A,B,C,D,E,F به ترتیب مربوط به باندهای جذبی گروه‌ای N – استیلی، آمینی و OH- موجود در پلیمر کیتوزان است.

- نتایج پرتونگاری با پراش اشعه ایکس (XRD)

برای مشخص نمودن ساختار بلوری کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با روش شیمیایی و تعیین درصد بلورینگی آن، طیف‌سنجی پراش پرتوهای ایکس بعمل آمد که نتایج آن در شکل ۷-۳ آورده شده است.



DIFFRACTION LINES:

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
20.100	4.41414	4.42500	0.320	196	428	94.5	0.80
20.710	4.28548	4.29602	0.240	166	424	80.3	0.98
26.515	3.35895	3.36721	0.160	207	216	100.0	5.00

شکل ۷-۳- پرتونگاری با پراش اشعه ایکس از کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه

پیک بدست آمده در ۲۰ تتا شاخص ساختار بلوری پلیمر کیتوزان است. براساس نتایج جدول آنالیز پراش اشعه ایکس بیشترین درصد بلورینگی در اندیس ۲۶/۵ است.

-نتایج اندازه‌گیری گرانروی

برای بررسی کیفیت کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا ارومیانا، میازان گرانروی آن مورد سنجش قرار گرفت، گرانروی کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا با روش شیمیایی در این آنالیز، ۱۶ سانتی پوز تعیین گردید.

-نتایج تعیین وزن مولکولی

تعیین وزن مولکولی کیتوزان از معادله مارک – هوینگ ($[\eta]=KM_V^{\alpha}$) انجام شد. وزن مولکولی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا در این آزمایش $۴/۳\times۱۰^{۵}$ دالتون تعیین شد. که نحوه محاسبه آن بشرح ذیل است:

1) $[\eta]=KM_V^{\alpha} \Rightarrow 16=3.1\times10^{-3}M_V^{1.01}$

2) $1600=3.1\times10^{-3}M_V^{1.01}$

چون گرانروی دستگاه به سانتی پوآز پس داریم:

3) $M_V^{1.01}=\dfrac{1600}{3.1\times10^{3}}=516129$

از طرفین رادیکال می‌گیریم پس داریم:

4) $M_V^{1.01}=\sqrt[1.01]{516129} \Rightarrow M_V=452512.6\approx4.5\times10^{5}$

- نتایج رنگ سنجی

رنگ کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا قهوه‌ای کم رنگ است. در تشخیص رنگ کیتوزان از روش رنگ سنجی ظاهری با استفاده از گروه تست پانل مرکب از پنج نفر استفاده شد.

۷-۳- نتایج انجام آنالیزهای تشخیص کمی و کیفی مقایسه ای ۳ نوع کیتوزان:

برای ارزیابی نتایج حاصله از کیتوان پوسته سیست آرتمیا به روش شیمیایی، آزمایش‌ها در شرایط یکسان بر روی نمونه‌های کیتوزان چینی و ویتنامی نیز انجام شد که نتایج حاصله در جداول ۱۰-۳، ۱۱-۳ و اشکال ۸-۳ و ۹-۳ آورده شده است:

جدول ۱۰-۳- نتایج آنالیز عنصری سه نوع کیتوزان مورد مطالعه

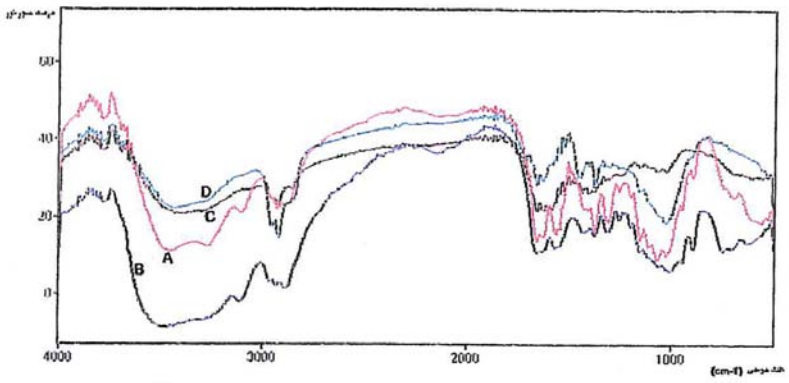
نوع کیتوزان	کربن C٪	نیتروژن N٪	ئیدروژن H ٪	اکسیژن O٪
کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا	۴۱/۴	۷/۷	۶/۷	۴۴/۲
کیتوزان پوسته خرچنگ	۴۲	۸	۷	۴۳
کیتوزان پوسته میگو	۴۰/۴	۶/۸	۶/۴	۴۶/۴

جدول شماره ۱۱-۳- مقاسه وزن مولکولی، گرانروی، رنگ و درجه استیل زدایی سه نوع کیتوزان مورد مطالعه

نوع کیتوزان	متوسط وزن مولکولی (دالتون)	گرنروی (cps)	رنگ	درجه استیل زدایی (D.D.A) درصد
کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا	۴/۵×۱۰ ۵	۱۶	قهوه‌ای کم رنگ	۵۵
کیتوزان پوسته خرچنگ	۳/۸×۱۰ ۵	۱۳	سفید مات	۸۴
کیتوزان پوسته میگو	۳/۵×۱۰ ۵	۱۲	سفید برفی	۸۰

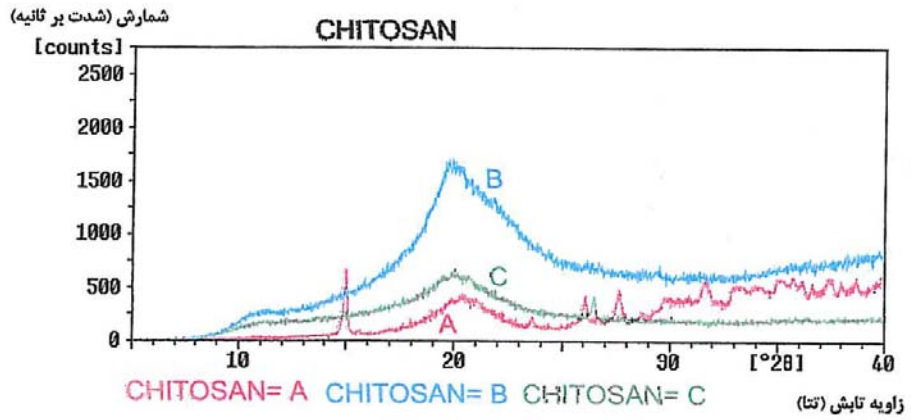
تفاوتها مربوط به نوع منبع اولیه استخراجی، روشهای عمل‌آوری، درصد رطوبت، ... است.

این تفاوت‌ها ممکن است منجر هب تولید مشتقات جدید و مناسب‌تری از کیتوزان برای مصارف مختلف باشد.



شکل ۸-۳- طیف‌های FTIR سه نوع کیتوزان به انضمام طیف استاندارد آلدریچ
A- طیف کیتوزان چینی B- کیتوزان آرتمیا C- طیف کیتوزان آلدریچ D- طیف کیتوزان ویتنامی

به منظور ارزیابیهای دقیق تر طیف کیتوزان استاندارد موسسه تحقیقات آلدریچ نیز در مقایسه آورده شده است.



شکل ۹-۳- طیف‌های XRD مقایسه‌ای سه نوع کیتوزان
A- کیتوزان چینی B- کیتوزان ویتنامی C- کیتوزان آرتمیا

۸-۳- نتایج روش‌های زیستی

در روش زیستی به جای استفاده از هیدروکسید سدیم در مرحله (پروتئین زدائی) کیتین، از آنزیمهای پروتوولیتیک باکتری باسیلوس و برای انجام واکنش استیل زدایی کیتوزان از آنزیم های قارچ آسپرژیلوس نایجر استفاده شد.

باکتری باسیلوس سوبتیلیس مولد آنزیمهای پروتئولیتیک و فاقد آنزیم کیتیناز (بی‌تأثیر بر روی کیتین) است. دوسوش از این باکتری از سازمان پژوهشهای عملی- صنعتی کشور بصورت لیوفیلیزه با کدهای $PTCC_{1595}$، $PTCC_{1331}$ تهیه شد و کشت آنها انجام شد.

- نتایج کشت اولیه باکتری :

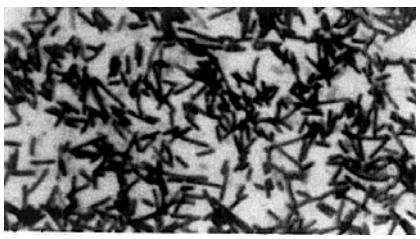
از کلنی‌های رشد یافته و خالص محیط کشت پلیت آن، آزمایشهای مرسوم بیوشیمیایی به عمل آمده که نتایج آن به شرح جدول ۱۲-۳ می‌باشد.

جدول ۱۲-۳- برخی خواص بیوشیمیایی باکتری باسیلوس سوبتیلیس

نوع آزمایش	رنگ آمیزی گرم	ئیدرولیز ژلاتین	رشد هوازی	نوع کلنی	مورفولوژی	تشکیل اسپور	ایندول	کاتالاز
نتیجه	مثبت	مثبت	مثبت	کلنی‌های سفید	میله‌ای شکل	مثبت	منفی	مثبت

باکتری باسیلوس سوبتیلیس شرایط بهینه رشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرم مثبت حالت هوازی و میله‌ای شکل است که تصویر میکروسکوپی آن در شکل ۴-۱۰ آمده است:

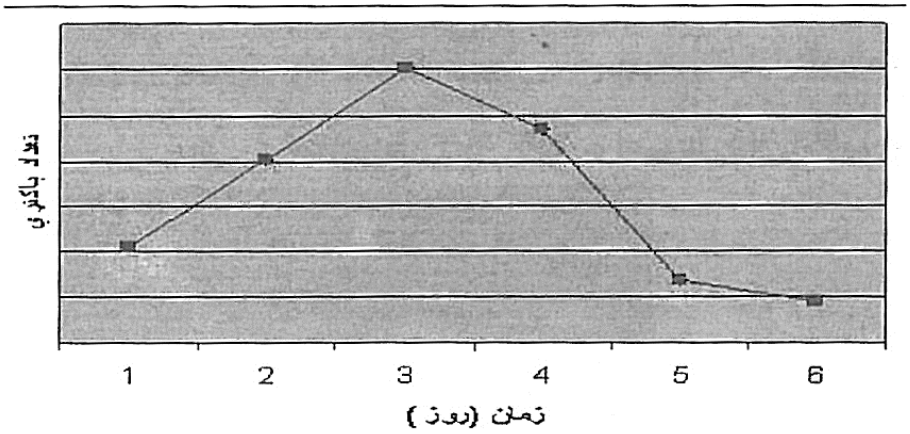
چون از این باکتری به عنوان مولد آنزیم‌های پروتئولیتیک در صنعت دباغی، شوینده‌ها، زیست فن‌آوری، ... استفاده می‌شود، و شرایط تهیه، کشت و نگهداری آن مناسب و اقتصادی است، لذا به عنوان باکتری مورد استفاده در این پژوهش انتخاب شد.



شکل ۱۰-۳- تصویر میکروسکوپی باکتری باسیلوس سوبتیلیس

- نتایج کشت انبوه و بررسی سنتیک رشد :

پس از کشت باکتری ها در محیط مایع نوترینت براث تا روز پنجم از آنها روزانه نمونه‌برداری و با دقت سازی شمارش به عمل آمد که نتیجه منحنی رشد مربوطه در شکل ۱۱-۳ آورده شده است.

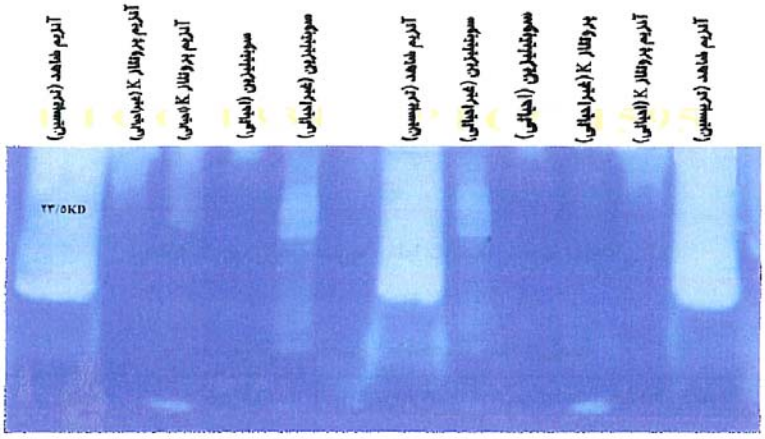


شکل ۱۱-۳- نمودار رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس

براساس نتیجه حاصله حداکثر رشد لگاریتمی باکتری در روز ۳ است که مناسب‌ترین زمان برای استفاده از محیط کشت باکتریایی در عمل استخراج می‌باشد.

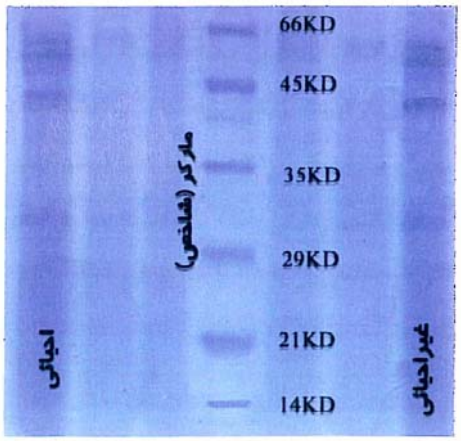
- نتایج تعیین فعالیت آنزیمی

نتایج فعالیت پروتئولیتکی آنزیم‌ها بر روی ژل آکریل آمید ۱۰ درصد مشخص گردید که نتایج آن در شکل ۳-۱۲ آورده شده، که با تأثیر آنزیم و بی‌رنگ شدن ژل حرکت آنها در ژل مشخص می‌باشد.



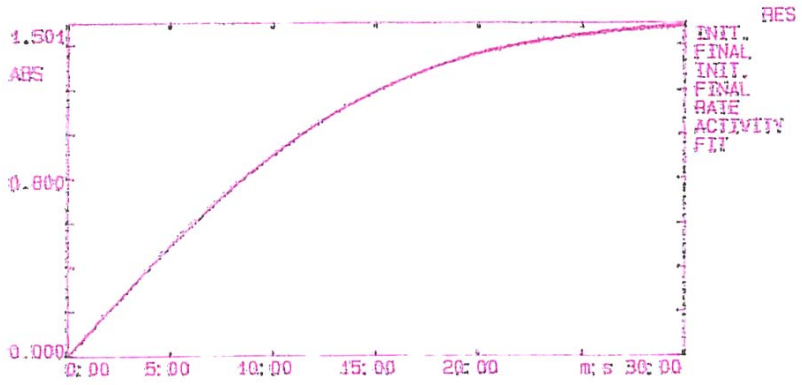
شکل ۱۲-۳- ژل آکریل آمید ۱۰ درصد ژلاتین دار با بروموفنل بلو

آنزیمهای عمل کننده پروتئولیتیکی موجود در محیط کشت از نوع سوبتیلیزین و پروتئاز K شناسایی شد. مشخصات وزن مولکولی این آنزیم‌ها در شکل ۱۳-۳ آورده شده است.



شکل ۱۳-۳- ژل استاندارد برای تعیین وزن مولکولی آنزیم

سنجش فعالیت آنزیمی با روش (لوور و همکارانش) انجام شد، در این روش میزان تغییرات جذب نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر به مدت ۳۰ دقیقه اندازه‌گیری و منحنی آن در شکل ۴-۱۴ و مشخصات آنزیم‌ها در جدول ۴-۱۵ ارائه گردیده است.



شکل ۱۴-۳- منحنی تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر

جدول ۱۳-۴- مشخصات آنزیم‌های پروتئولیتیک

آنزیمهای شناسایی شده	سوبتیلیزین	پروتئاز K	pH
قدرت آنزیمی (IU)	۳۰۰-۴۰۰	۸۰-۷۰	۷/۲
وزن مولکولی (کیلودالتون)	۴۳-۴۲	۳۳-۳۲	۷/۲

۹-۳- نتایج حذف مواد پروتئینی به روش آنزیمی

نتایج انتقال پوسته سیست به محیط کشت حاوی باکتری باسیلوس سوبتیلیس حاصله نشان می‌دهد که باکتری بصورت مستقیم قادر به هضم ترکیبات پروتئینی پوسته سیست آرتمیا است و آنزیمهای مترشحه از باکتری باعث تخریب و زایل شدن ترکیبات پروتئینی پوسته سیست شده است. میزان درصد حذف مواد پروتئینی توسط آنزیمهای پروتئولیتیک از ۳۱ درصد به ۲±۹ درصد کاهش یافته است. (یعنی میزان حدود ۲۰ درصد از ترکیبات پروتئینی حذف شده است). مراحل بعدی استحصال کیتین (حذف مواد معدنی، لیپیدی، رنگی) و تخلیص آن با شرایط مشابه قبل انجام پذیرفت که نتایج حاصله در جدول ۱۴-۳ آورده شده است.

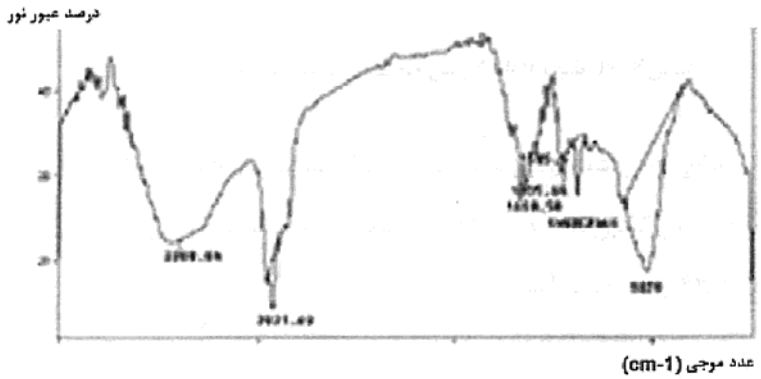
جدول ۱۴-۳- ترکیب کیتین پوسته سیست آرتمیا استحصال شده با روش زیستی

ترکیبات	پروتئینی	لیپیدی	رنگی	چربی کل	خاکستر کل	(کیتین)
درصد وزنی	۲±۹	۰/۰۹	---	۰/۰۷	۰/۹۸	۲±۳۶ درصد

برروی نمونه کیتین حاصله از روش زیستی آنالیزهای تشخیص کمی و کیفی همانند آنچه که قبلاً بیان گردیده، انجام شد که نتایج آن، در جداول ۱۵-۳ و ۱۶-۳ و همچنین شکل‌های ۱۵-۳ و ۱۶-۳ ارائه گردیده است:

جدول ۱۵-۳- نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتین حاصله با فنون زیستی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

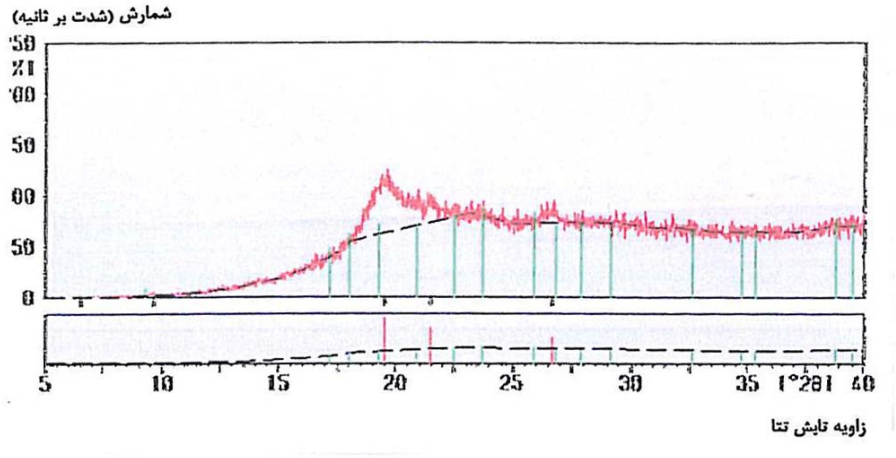
نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد عنصر	۴۹/۶	۸/۲	۷/۵	۳۵/۵



شکل ۱۵-۳- طیف FTIR نمونه کیتین حاصله با روش زیستی از پوسته آرتمیا اورمیانا

جدول ۱۶-۳- وزن مولکولی، گرانروی، رنگ و سایر خصوصیات کیتین حاصله با روش زیستی

خصوصیات	متوسط وزن مولکولی	گرانروی (cps)	رنگ	درجه استیل زدایی	شناسایی گلوکز آمین	بلورینگی
نتیجه	$۴/۹\times۱۰^{۶}$	۳۱	خاکستری متمایل به قهوه‌ای	-0- درصد	منفی	۴۴/۴ درصد



DIFFRACTION LINES:

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
10.515	8.40645	8.42714	0.560	74	161	9.9	1.42
19.670	4.50965	4.52075	0.400	745	870	100.0	2.04
22.285	3.98603	3.99584	0.960	331	853	44.4	2.34
26.465	3.36518	3.37346	0.800	11	676	1.5	0.86
29.475	3.02802	3.03547	0.480	40	605	5.3	0.85

شکل ۱۶-۳- طیف XRD کیتین حاصله از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا

براساس نتایج پراش اشعه ایکس به دست آمده پیک شاخص در ۱۹/۵ تا ۲۰ تتا که پیک مختص ساختار بلوری پلیمر کیتین است در آن تشکیل شده است و بیشترین اندیس بلورینگی در پیک ۱۹ تا ۲۰ معادل ۴۴/۴ درصد بدست آمده است.

۱۰-۳- نتایج تبدیل کیتین به کیتوزان با روش زیستی

برای انجام این روش از قارچ آپرژیلوس نایجر مولد آنزیم داستیلاز استفاده شد.

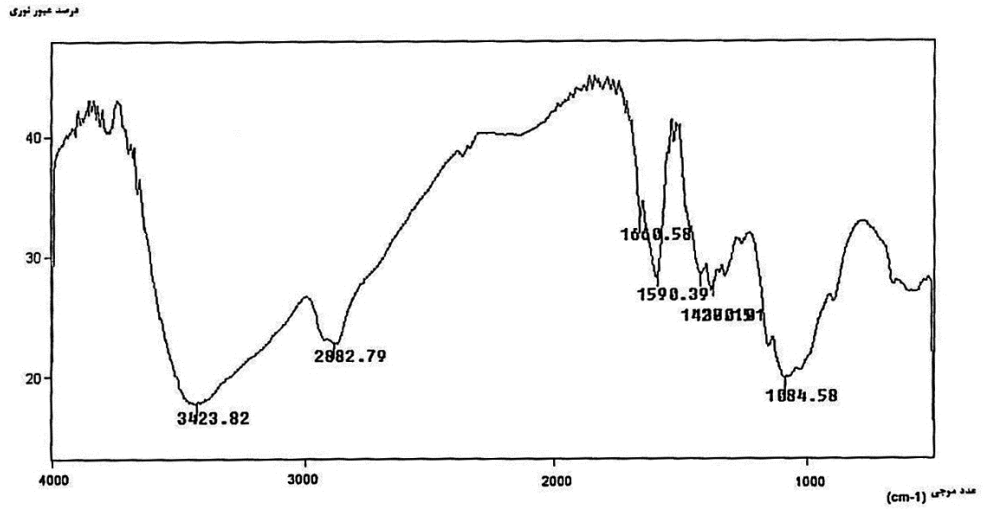
تبدیل کیتین به کیتوزان که با انجام واکنش استیل زدایی همراه است. انجام این واکنش با روش زیستی با مقدار ۱۰ گرم از پودر کیتین استخراج شده از روش بیولوژیکی در دو حالت کشت مستقیم انبوه مایع قارچ و عصاره آنزیمی آن به عمل آمد. راندمان محصول در این روش ها به ترتیب ۳۲ و ۱۰ درصد به دست آمد، نتیجه نهایی

اینکه کشت مستقیم قارچی قادر به انجام واکنش استیل زدایی بوده و اثر کشت مستقیم در مقایسه با عصاره آنزیمی مناسب است [ضمیمه ۳].

آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت روی نمونه‌های کیتوزان تولید شده با روش زیستی نیز به عمل آمد که نتایج حاصله به شرح جدولهای ۱۷-۳ و ۱۸-۳ و شکل‌های ۱۷-۳ و ۱۸-۳ ارایه گردیده است.

جدول ۱۷-۳- نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتوزان حاصله با روش زیستی از پوسته سیست آرتمیا

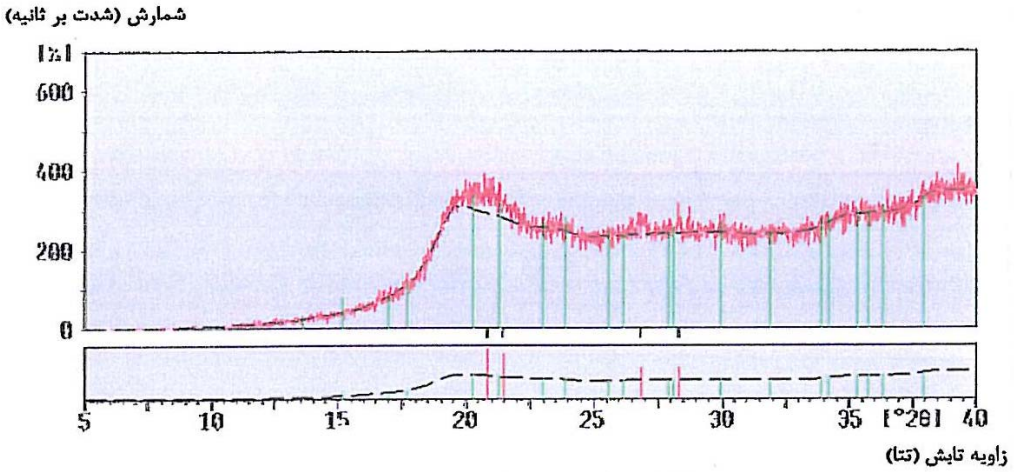
نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد عنصر	۴۴/۴	۸/۹	۷/۲	۳۹/۵



شکل ۱۷-۳- طیف FTIR نمونه کیتوزان حاصله با فنون زیستی از پوسته سیست آرتمیا

جدول ۱۸-۳- وزن مولکولی، گرانروی، رنگ استیل زدایی درصد بلورینگی کیتوزان حاصله با روش زیستی

متوسط وزن مولکولی	گرانروی (cps)	رنگ	درجه استیل زدایی (D.D.A)	درصد بلورینگی
$۵/۱\times۱۰^{۵}$	۱۸	قهوه‌ای کم رنگ	۲۰±۱۵	۱۰۰



D I F F R A C T I O N L I N E S :

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
9.325	9.47639	9.49971	0.480	55	45	21.4	1.34
19.315	4.59173	4.60302	0.560	256	292	100.0	3.16
26.505	3.36019	3.36846	0.640	23	292	9.0	1.11
29.435	3.03204	3.03950	0.160	81	350	31.6	0.75

شکل ۱۸-۳- طیف XRD کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا با فن آوری زیستی

پیک به دست آمده در ۲۰ تتا که پیک شاخص ساختار بلوری پلیمر کیتوزان است ایجاد شده است و حداکثر درصد بلورینگی از جدول پراش اشعه ایکس در پیک ۲۰ تتا بدست آمده که معادل ۱۰۰ درصد است.

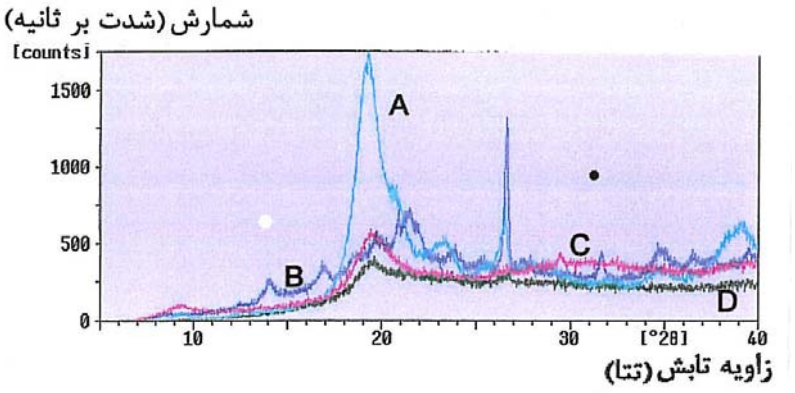
نتایج آنالیزهای کمی و کیفی محصولات حاصله نشان می دهد که می توان با روش زیستی کیتین را استخراج نموده و آن را به کیتوزان تبدیل نمود.

۱۱-۳- نتایج مقایسه دو نوع کیتین استخراج شده با روش شیمیایی و زیستی

با بررسی مقایسه ای کیتین حاصله از هر دو روش (شیمیایی و زیستی) خواص فیزیکی و شیمیایی و ارزیابی های اقتصادی انجام شد که نتایج حاصل به شرح جدول ۱۹-۳ و شکل های ۱۹-۳ و ۲۰-۳ آورده شده است:

جدول ۱۹-۳- نتایج برخی خصوصیات دو نوع کیتین حاصله از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا به روش شیمیایی و زیستی

اختصاصات نوع پلیمر	درجه استیل-زدایی	متوسط وزن مولکول به دالتون	رنگ	گرانروی (cps)	وجود گلوکز آمین	درصد بلورینگی	درصد باقیماندگی پروتئینی
کیتین پوسته سیست آرتمیا (روش شیمیایی)	حدود ۵ درصد	$۴/۱\times۱۰^{۶}$	خاکستری متمایل به قهوه‌ای	۲۷	مثبت	۳۶/۴	۰/۹ درصد
کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا (روش زیستی)	صفر	$۴/۹\times۱۰^{۶}$	خاکستری متمایل به قهوه‌ای	۳۱	منفی	۴۴/۴	۹ درصد



شکل ۱۹-۳- طیف‌های XRD مقایسه‌ای ۴ نوع کیتین

A- کیتین نوع ویتنامی B- کیتین نوع چینی C- کیتین آرتمیا با روش شیمیایی

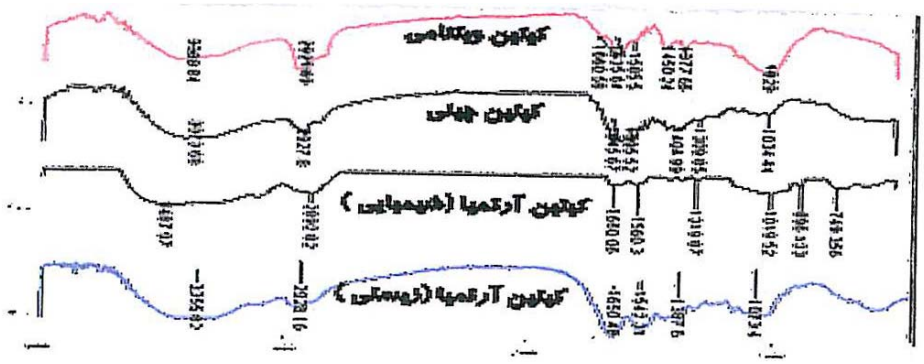
D- کیتین آرتمیا با روش زیستی

شکل ۲۰-۳- طیف FTIR مقایسه ای ۴ نوع کیتین

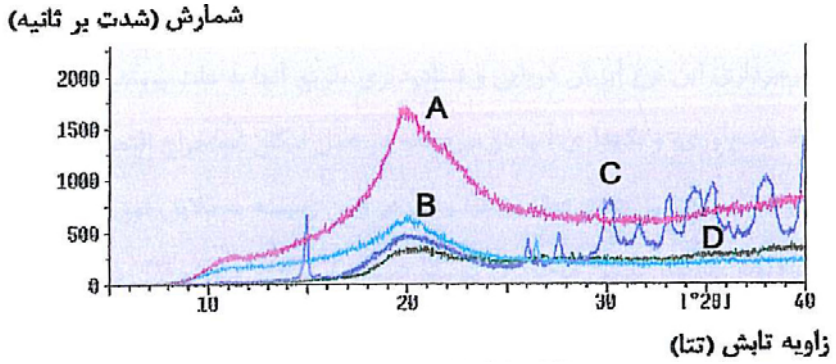
نتایج آنالیزهای تشخیص کمی و کیفی مقایسه‌ای دو نوع کیتوزان تولیدی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا از روش شیمیایی و زیستی نیز بشرح جدول ۲۰-۳ و شکلهای ۲۱-۳ و ۲۲-۳ آورده شده است.

جدول ۲۰-۳- درجه استیل‌زدایی، اوزان مولکولی، رنگ، گرانروی، درصد بلورینگی، هزینه های اقتصادی و زمان بری در دو نوع کیتوزان

اختصاصات نوع پلیمر	درجه استیل-زدایی	متوسط وزن مولکول به دالتون	رنگ	گرانروی (cps)	درصد بلورینگی	نسبت هزینه های اقتصادی در تولید ۵ کیلوگرم	مدت زمان بری
کیوزان پوسته سیست آرتمیا (از روش شیمیایی)	۵۰±۵ درصد	۴/۳×۱۰ ^۵	قهوه‌ای کم رنگ	۱۶	کمتر	۱	۱
کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا (از روش زیستی)	۲۰±۱۰	۵/۱×۱۰ ^۵	قهوه‌ای کم رنگ	۱۸	بیشتر	۱۹/۳	۳



شکل ۲۲-۳- طیف FTIR مقایسه‌ای ۴ نوع کیتوزان



شکل ۲۳-۳- طیف‌های XRD مقایسه‌ای

A-کیتوزان پوسته خرچنگ نوع ویتنامی C- کیتوزان نوع چینی B- کیتوزان نوع آرتمیا (روش شیمیایی) D- کیتوزان نوع آرتمیا (روش زیستی)

۴-بحث

لایه‌های کوریونی سیست‌های آرتمیای دریاچه ارومیه، که بصورت پوسته بیشتر در سواحل ودر استخر های پرورشی انباشته می‌شوند، موادی غیرقابل مصرف بوده و استفاده خاصی از آنها بعمل نمی‌آید ، این پوسته جهت استخراج و عمل آوری موادی با ارزش افزوده‌ای بالا (کیتین و کیتوزان) قابل جمع‌آوری و خالص‌سازی هستند .

پوسته‌ها، تجزیه و کیتین آنها استخراج شد. نتیجه حاصل اینکه پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه دارای ۳+۲۸ درصد کیتین می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار پوسته سیست آرتمیا اورمیانا به عنوان یک منبع جدید، مناسب و نسبتاً فراوان برای استحصال این بیوپلیمر گزارش می‌شود.

مقایسه ترکیب اجزاء تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با گزارش سیمپ سون و همکاران [جدول ۳-۳] و (Pariser,et al, 2004) از سایر سخت‌پوستان نشان می‌دهد که درصد کیتین در پوسته سیست مناسب است و در حال حاضر که کیتین در دنیا از پوسته میگو، خرچنگ و کریل استخراج می‌شود میزان این بیوپلیمر در آنها از ۱۴ تا ۲۵ درصد گزارش شده است ، ولی به دلایل فصلی بودن صید و بهره‌برداری این نوع آبزیان دریایی و فسادپذیری سریع آنها به علت پروتئین همراه پوسته و هزینه‌های زیاد جمع‌آوری، و نگهداری آنها در سردخانه در عمل امکان استخراج اقتصادی کم است ، و در ایران نیز هیچ فعالیت تولیدی و اقتصادی در این زمینه به دلایل فوق انجام نمی‌گیرد.(اسدپور .۱۳۸۲) با توجه به بالا بودن درصد کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیا اورمیانا و قابل دسترس و دائمی بودن آن و نداشتن برخی از مشکلات ذکر شده فوق، استفاده از این منبع معرفی شده در این تحقیقات اقتصادی خواهد بود. استخراج کیتین از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، موجب بازیافت مواردی با ارزش افزوده‌ای بالا خواهد شد.

مقایسه ترکیب و درصد اجزاء تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا با ترکیب توده زیستی آن و خود سیست آرتمیا کاملاً متفاوت است. بررسی سوابق مطالعات مروری انجام شده و عدم وجود هیچ گزارشی در این زمینه، آنالیز شیمیایی حاصل یعنی (نتایج جدول ۴-۱) و ترکیب مواد معدنی تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا (نتایج جدول ۲-۳) بعنوان اولین گزارش‌های تحقیقاتی دیگر از ا ین پژوهش می‌باشند

نتایج تجزیه عنصری دستگاهی کیتین پوسته سیست آرتمیا در مقایسه با درصد این عناصر در کیتین صد در صد خالص (استاندارد) از جدول ۵-۳ نشان می‌دهد که درصد این عناصر با نوع استاندارد تقریباً یکسان بوده و تفاوت‌های جزیی مربوط به منبع اولیه مورد استفاده، روش عمل‌آوری، درصد رطوبت و ... است و این نتایج با نتایج یعقوبی در سال ۱۳۸۱ در ایران ونتایج گزارشات آندرسون از گریل درسال ۲۰۰۰ وگزارش مطالعات اراکی وهمکاران در سال ۲۰۰۷ کاملا همخوانی دارد .. براساس اطلاعات اخذ شده از کاتالوگ شرکت های سیگما و سی برن (Seaborn, 2001) کیتین‌ها به علت نوع منبع اولیه مورد استفاده و روش‌های عمل‌آوری به طور جزیی با همدیگر متفاوت هستند. بررسی ارزیابی‌های مقایسه‌ای نتایج کیتین استخراج شده از پوسته سیست

آرتمیا از روش شیمیایی، با دو نوع مشابه تجاری آن استخراج شده از پوسته میگو و پوسته خرچنگ نشان می-دهد که کیفیت کیتین آرتمیا مناسب است.

مقایسه نتایج آنالیز تجزیه عنصری آنها (جدول ۴-۸) نشان می‌دهد که درصد نیتروژن کیتین پوسته سیست آرتمیا تا حدی بیشتر است این نوع به کارگیری آن را در زمینه‌های پزشکی نظیر فرآیندهای هموستاز، دیالیز، سنتز پوست مصنوعی، نخ بخیه جراحی، زیست محیطی، سم زدایی، پرتوزدایی با اهمیت می‌سازد. چون بالا بودن درصد این عنصر از شرایط بهینه در کاربرد آن در این زمینه است و زیست سازگاری مناسبی را به دنبال داردکه در گزارش های سایر محقیقن نظیر آسینو ومهکاران در سال ۲۰۰۰ در این خصوص یکسانی دارد . کیتین حاصله از پوسته سیست آرتمیا با روش شیمیایی با بازدهی ۵±۵۰ درصد به کیتوزان تبدیل شد. آنالیزهای تشخیص کیفی به روی نمونه‌های این کتیوزان به عمل آمد.

نتایج آنالیز تجزیه عنصری دستگاهی و طیف سنجی مادون قرمز آن با نوع کیتوزان صد در صد خالص (استاندارد) در جدول ۹-۳ مورد مقایسه قرار گرفت، تفاوت‌های جزیی از درصد عناصر مربوط به منبع اولیه مورد استفاده، روش های عمل‌آوری، درصد رطوبت ... می‌باشد. واین با نتایج گزارش شده از سایر محقیقن نظیر. Conellوهمکاران درسال ۲۰۰۹ و Duarte و همکاران درسال ۲۰۰۱ کاملا همخوانی و مشابهت دارد.

نتایج آنالیزهای کمی و کیفی کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، نیز با دو نوع مشابه تجاری استخراج شده از پوسته میگو و پوسته خرچنگ مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. کیفیت کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا مناسب‌تر است.

براساس نتایج جداول ۹-۳ و ۱۱-۳ تفاوت های جزیی در وزن مولکولی و گرانروی کیتین و کیتوزان پوسته سیست آرتمیا ممکن است منجر به تولید مشتقات مناسب‌تری از آنها برای مصارف مختلف باشد. واین در گزارشات سایر محقیقن نظیر Gildberg و سایر همکارانش نیز در مطالعه در روی کیتین وکیتوزان مستخرج از خرچنگ وپوسته میگوها نیز گزارش شده است .کیفیت کیتین و کیتوزان حاصله از پــوسته سیست آرتمیا در مقــایسه با دو نوع مشابه تجاری آن مناسب است.

بررسی سابقه تحقیقات انجام شده برای استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان با روش‌های رایج شیمیایی یکی از مشکلات افت کیفیت محصولات بیان شده در تحقیقات Knorr وهمکارانش درسال ۲۰۰۰ است، این امر موجب ایجاد محدودیت‌هایی در بکارگیری این بیوپلیمرها می‌شود، این معضل اساساً ناشی از استفاده از هیدروکسید سدیم در مرحله حذف مواد پروتئینی در فرآیند عمل‌آوری کیتین و در مرحله استیل‌زدائی آن در تبدیل به کیتوزان است، چون موجب ایجاد پدیده‌های تغییر ساختمان فضایی و دپلیمریزاسیون (شکسته شدن زنجیر) می شود و Laidter در سال ۲۰۰۰ آنرا در تحقیقات خود در مورد کیتین و کیتوزان مستخرج از پوسته سیست میگوها گزارش نموده است، ضمناً تخلیه پساب هیدروکسید سدیم باعث آلودگی‌های زیست محیطی از آن گزارش شده است و استفاده از آن خطراتی را نیز به دنبال دارد و یک ماده شیمیایی حساسیت زدایی است.

با روش زیستی، بکارگیری هیدروکسید سدیم از فرآیند تولید کیتین و کیتوزان حذف گردیده و به جای آن از آنزیم های پروتئولیتیک باکتریای و داستیلاز قارچ قابل استفاده است .

نمونه کیتین استحصال شده با روش زیستی همانند روش‌های ذکر شده قبلی در شرایط یکسان مورد آزمایش های تعیین کمیت و کیفیت قرار گرفت و نتایج حاصله با روش‌های شیمیایی بررسی و مقایسه شد.

براساس نتایج حاصله از آزمایش‌ها در جدول ۱۶-۳ و ۱۹-۳ در روش شیمیایی استخراج کیتین به علت استفاده از هیدروکسید سدم (بخش ۳-۴-۱) به طور ناخواسته تا حدود ۵ درصد پدیده استیل زدایی ضمنی ایجاد می شود ولی در روش زیستی این پدیده حذف می شود، لذا می توان بیان داشت که استحصال کیتین خالص در طبیعت استخراج نمود. وجود گلوکز آمین در کیتین پوسته سیست آرتمیا در روش شیمیایی تائید دیگر این موضوع است. کیتین خالص برای تولید N- استیل گلوکز آمین ضروری است.

براساس نظریه شیمورا و همکاران در سال۲۰۱۱ میزان گرانروی با وزن مولکولی نسبت مستقیم دارد، لذا بالا بودن گرانروی کیتین حاصله از روش زیستی نسبت به روش شیمیایی مربوط به سنگین بودن (طویل بودن زنجیره) کیتین بدست آمده از پوسته سیست آرتمیا به روش زیستی می باشد. وزن مولکولی کیتین حاصله از روش زیستی نسبت به روش شیمیایی مقدار جزیی بیشتر است، که دلیل داشتن مقدار مونومرهای بیشتر در زنجیر کیتین آن و طویل بودن آن نسبت به زنجیره کیتین حاصله از روش شیمیایی است.

همان طوری که قبلاً ذکر شد (بخش ۱-۳) کیتین از به هم پیوستن واحدهای N- استیل گلوکز آمین تشکیل شده است، وجود مونومرهای آزاد (گلوکز آمین) در کیتین حاصله از پوسته سیست آرتمیا در روش شیمیایی نشان دهنده شکسته شدن زنجیره و پیدایش مونومر گلوکز آمین است، این واکنش به پدیده دیپلیمریزاسیون معروف است. پس در روش‌های شیمیایی استخراج کیتین پدیده دپلیمریزاسیون رخ می دهد و ناشی از تأثیر هیدروکسید سدیم می باشد.

ایجاد پدیده دپلیمریزاسیون و شکسته شدن زنجیره پلیمر، کاهش وزن مولکولی را سبب می شود، لذا بالا بودن وزن مولکولی کیتین در روش زیستی، این نظریه را تأئید می‌نماید. براساس گزارش کینزوشیمورا و همکارانش، استفاده از هیدروکسید سدیم موجب ایجاد تغییر ساختمان فضایی در پلیمر کیتین می شود، و سبب افت درصد بلورینگی پلیمر است در نتایج جدول ۱۹-۳، پایین بودن درصد بلورینگی در روش شیمیایی انجام شده توسط Pariser در سال ۲۰۰۴در مقایسه با روش زیستی، این نظریه را تایید می کند.

همان طوری که در گزارش های مورگان و همکارانش در سال ۲۰۰۲ و لازاریا در سال ۲۰۰۰ قبلا نیز ذکر شده میزان گرانروی ارتباط مستقیم با وزن مولکولی دارد، لذا بالا بودن گرانروی حاصله در روش زیستی انجام شده در این پژوهش نسبت به روش شیمیایی بهینه شده آن مربوط به سنگین بودن (طویل بودن زنجیره) کیتین پوسته سیست آرتمیای به دست آمده به روش زیستی است و نتایج مطالعات کاملا تایید می شود. میزان درصد باقیماندگی مواد پروتئینی در روش زیستی نسبت به روش شیمیایی در این پژوهش بیشتر به دست آمد.

نسبت زمان مورد نیاز در روش زیستی به روش شیمیایی در این تحقیق معادل ۱: ۲ است. مقایسه نتایج حاصل از جدول ۲۰-۳، نشان می دهد که درجه استیل زدایی در روش زیستی نسبت به روش شیمیایی ۳۰ درصد پایین تر می باشد. این امر ناشی از عوامل متعدد، می تواند به علت بالا بودن وزن مولکولی و درص بلورینگی در روش زیستی باشد.

در سال ۲۰۰۰، سیمپ سون و همکاران میزان درصد بازدهی درجه استیل زدائی با روش زیستی را ۱۰ درصد بیان داشته است. پائین بودن بازدهی تبدیل کیتین به کیتوزان را ناشی از دلایل کاهش پدیده تغییر ساختمان فضایی و بالا بودن وزن مولکولی بیان داشته اند، این مسئله در مورد کیتوزان حاصله از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با روش زیستی نیز یکسانی داشته و صدق می کند.

بر اساس پژوهش های Whistler در سال ۲۰۰۱بالا بودن وزن مولکولی و درصد بلورینگی در روش زیستی نسبت به روش شیمیایی بیانگر سنگین بودن زنجیره پلیمر (مقدار مونومرهای بیشتر) در کیتوزان زیستی است و این پدیده حذف پدیده دپلیمریزاسیون در روش زیستی را نشان می دهد، پدیده دپلیمریزاسیون به علت تأثیر هیدروکسید سدم ۵۰ درصد مورد استفاده در دمای بالا در مرحله جوشانیدن واکنش استیل زدایی با روش های شیمیایی ایجاد می شود. پدیده مذکور در روش زیستی به دلیل حذف استفاده از آن مکان ندارد.واین مسئله در نتایج تحقیقات این پروژه نیز صدق می کند.

طبق گزارش موزارلی و همکاراندر سال ۲۰۰۰ ایجاد پدیده دپلیمریزاسیون به علت شکستگی در زنجیره پلیمر و کوتاه شدن آن موجب افزایش درجه استیل زدایی است. بالا بودن درجه استیل زدایی در روش‌های شیمیایی در کیتوزان پوسته سیست آرتمیا نیز به این دلیل استو یکسانی نتایج موید مطابقت مطالعات دارد .

گزارش سیمپ سون و همکارانشدرسال ۲۰۰۰ درخصوص، ارتباط مستقیم میزان گرانروی و وزن مولکولی در مورد کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا نیز صدق می کند . بالا بودن گرانروی کیتوزان حاصله در روش زیستی نسبت به روش شیمیایی با نظریه سنگین بودن کیتوزان ایجاد شده در روش زیستی مطابقت دارد.

پایین بودن وزن مولکولی، گرانروی و درصد بلورینگی در کیتوزان تولید شده از پوسته سیست آرتمیا در روش شیمیایی در مقایسه با روش زیستی با نظریه و گزارشات سایر محققین نظیر Walton و همکارانش درسال ۲۰۰۱ و Yokoi و همکارنش در سال ۲۰۱۱ ، درخصوص ایجاد پدیده تغییر ساختمان فضایی در پلیمر کیتوزان ناشی از مصرف ماده شیمیایی هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد با نتایج این گزارش کاملا یکسانی و مطابقت دارد. بررسی مطالعات سوسانا وهمکارانش در سال ۲۰۰۰ وبیلی استون و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان می دهد که ایجاد پدیده تغییر ساختمان فضایی در پلیمر کیتوزان به علت داشتن ساختار شبکه ای آن است و عامل آن ناشی از تأثیر مستقیم هیدروکسید سدیم می باشد. پائین بودن درصد بلورینگی، گرانروی در روش شیمیایی نسبت به روش زیستی، از نتایج جدول ۲۰-۳ ایجاد پدیده های تغییر ساختمان فضایی و دپلیمریزاسیون در استخراج با روش شیمیایی داز پوسته سیست آرتمیا موید این نتایج است و این مسئله را تایید می کند.

براساس گزارشات Alder و همکارانش در سال ۲۰۰۰ و Claus وهمکارنش در سال ۲۰۰۰ در حال حاضر کیتین و کیتوزان در دنیا از پوسته میگو، خرچنگ و کریل استحصال می شود درصد این بیوپلیمر در آنها در ۱۴ تا ۲۵ درصد گزارش شده است. در کشور ما به دلایل فصلی بودن صید و بهره‌برداری این نوع آبزیان دریایی، فسادپذیری سریع آنها به علت پروتئین همراه پوسته. دمای بالایی مناطق محل صید، هزینه های زیاد جمع آوری و نگهداری آنها در سردخانه، در عمل هیچ فعالیت اقتصادی در استخراج آنها انجام نمی شود . لذا بالا بودن نسبی درصد کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیا اورمیانا و قابل دسترس و دائمی بودن آن و نداشتن مشکلات ذکر شده فوق نسبت به سایر منابع تولید فعلی آن، استفاده از این منبع خاص، اقتصادی خواهد بود.

بررسی نتایج جداول (۷-۳ و ۶-۳) نشان می دهد که کیفیت کیتین استخراج شده از پوسته های سیست آرتمیا با روش شیمیایی نسبت به دو نوع مشابه تجاری خارجی آن (نوع چینی و ویتنامی) بهتر است.

اختلاف های جزیی باعث ایجاد مشتقات جدید در مورد کیتوزان ها است. بنابراین احتمال ایجاد مشتقات جدید درخصوص کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا نیز وجود دارد. فنون زیستی در استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان موجب امکان افزایش کیفیت محصولات می شود روش‌های زیستی در استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان قابل جایگزینی با روش های شیمیایی است [نتایج جداول ۱۹-۳ و ۲۰-۳]. جایگزینی فنون زیستی به جای روش های رایج شیمیایی در استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان، باعث حذف آلودگی های زیست محیطی است که در آن از تخلیه‌حجم وسیعی پساب ماده شیمیایی هیدورکسید سدیم، به اکوسیستم ممانعت بعمل می‌آید [نتایج جداول ۱۹-۳ و ۲۰-۳].

کیتین و کیتوزان به صور مختلف در داخل کشور در صنعت داروسازی، آرایشی، زیست فن آوری پزشکی و ... مصرف می شود. تولید آن از پوسته سیست آرتمیا، می تواند جایگزین مناسب محصولات مشابه وارداتی آن شود.

۵-نتیجه گیری نهایی

۱. در این تحقیق پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با ۳±۲۸ درصد وزنی کیتین، بعنوان یک منبع جدید قابل دسترس و دائمی برای استخراج این بیوپلیمر برای اولین بار در دنیا گزاش می شود .

۲. پوسته سیست آرتمیا اورمیانا دارای ۴±۲۱درصد خاکستر تام، ۲±۴/۸ درصد چربی، ۳±۳۲ درصد مواد پروتئینی، ۰/۵ درصد مواد رنگی، ۲±۱۱ درصد رطوبت است.

۳. نوع ترکیب و درصد مواد معدنی تشکیل دهنده پوسته سیست آرتمیا اورمیانا شامل ۰/۰۵ درصد (Zn)، ۱/۹۲ درصد (Na_2O)، ۱/۱۴ درصد (MgO)، ۶/۸۲ درصد (SO_3)، ۳/۲۳ درصد (Cl)، ۲/۱۲ درصد (K_2O)، ۴/۰۵ درصد (CaO) و ۱/۶۸ درصد (Fe_2O_3) است.

۴. کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا ابتدا با روش شیمیایی بهینه استخراج و خالص سازی شد، راندمان تبدیل آن به کیتوزان (درجه استیل زدایی) ۵±۵۰ درصد است.

۵. کیتین پوسته سیست آرتمیا به ترتیب دارای ۴۸/۶، ۷/۶، ۷ و ۳۶/۸ درصد کربن، نیتروژن، هیدروژن و اکسیژن می‌باشد، و درصد این عناصر در کیتوزان آن به ترتیب ۴۰/۶، ۶/۲، ۷/۴ و ۴۵/۸ است.

۶. ساختار شیمیایی هر مونومر کیتین پوسته سیست آرتمیا اورمیانا ($C_7H_{12}NO_4$) و ساختار شیمیایی هر مونومر کیتوزان آن ($C_6H_{12}NO_4$) تعیین شد.

۷. با انجام آنالیزهای تشخیص کیفی و کمی تجزیه عنصری دستگاهی، طیف سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، گرانروی سنجی، رنگ سنجی، درصد بلورینگی، و تعیین درجه استیل زدائی، اغلب خصوصیات و اختلاف های جزئی بین کیتین ها و کیتوزان های (پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، پوسته میگو و پوسته خرچنگ) مشخص شد.

۸. مقایسه کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با روش شیمیایی با دو نوع مشابه تجاری خارجی از کشورهای ویتنام (از پوسته خرچنگ) و چین (از پوسته میگو) که با روشهای رایج شیمیایی تهیه شده بودند، نشان می دهد که نوع منبع اولیه مورد استفاده بر خصوصیات وزن مولکولی، گرانروی، ساختمان بلوری، ساختار شیمیایی، درجه استیل‌زدائی، درصد بلورینگی و رنگ تا حدی مؤثر است.

۹. وجود برخی اختلاف های جزئی موجود در برخی خصوصیات کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا، احتمال ایجاد مشتقات جدید با کاربردهای تازه را به دنبال داشته باشد.

۱۰. وزن مولکولی و درصد نیتروژن کیتین استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا در مقایسه با ۲ نوع مشابه تجاری آن از سایر منابع اندکی بیشتر است که این موضوع می تواند اهمیت آن در کاربردهای اختصاصی در زمینه های پزشکی نظیر، پروسه های دیالیز، هموستاز سنتز پوست مصنوعی، نخ بخیه جراحی و سم زدائی مناسب تر سازد.

۱۱.از روش زیستی در استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان بجای رشوهای شیمیایی می توان استفاده کرد.

۱۲. مشکل اساسی در روش‌های رایج شیمیایی در استخراج کیتین، بکارگیری هیدروکسیدسدیم است با جایگزینی روش های زیستی به جای روش های شیمیایی این مرحله با آنزیم های پروتئولیتیک باکتری باسیلوس سوبتیلیس انجام شد.

۱۳.دراین پژوهش آنزیم های پروتئولیتک باکتری باسیلوس سوبتیلیس، پروتئاز K و سوبتیلیزین تعیین شد. کشت انبوه مایع این باکتری تا میزان ۲۰ درصد ترکیبات پروتئینی پوسته سیست آرتمیا را حذف می نمایند.

۱۴.آنزیم داستیلاز طبیعی مترشحه از کشت مایع قارچ آسپیرژیلوس نایجر، می تواند جایگزین روش های رایج شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان باشد.

۱۵.جایگزینی روشهای زیستی به جای روشهای رایج شیمیایی در استخراج کیتین و تبدیل آن به کیتوزان باعث حذف آلودگیهای زیست محیطی ناشی از تخلیه پساب ماده شیمیایی هیدروکسید سدیم به اکوسیستم است.

۱۶.بکارگیری روش زیستی به جای روش های شیمیایی مانع از بروز پدیده های اسرشتگی و دپلمریزاسیون ناشی از تأثیر هیدروکسید سدیم شده و باعث افزایش کیفی محصولات استخراجی است [نتایج جدول ۴-۱۷].

۱۷.امکان استخراج کیتین خالص از طبیعت با روش های شیمیایی به دلیل ایجاد تولید مواد ناخواسته نظیر گلوکز آمین و کیتوزان وجود ندارد. کیتین خالص از مانع طبیعی تنها با فناوری زیستی بدست می آید.

۱۸.روشهای عمل آوری کیتین و کیتوزان بر خصوصیات وزن مولکولی، گرانروی، ساختار بلوری، درجه استیل زدایی آنها تأثیر دارد. [نتایج جدول ۴-۱۸].

۱۹. استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه، موجب بازیافت و تولید موادی با ارزش افزوده ای فراوان از پوسته های سیست خواهد شد، در حال حاضر استفاده خاصی از آنها به عمل نمی آید.

به نظر می‌آید استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا در مقایسه با سایر منابع استخراج فعلی آن در دنیا سودآور خواهد بود.

۲۰.چون در ایران تولیدی، درخصوص کیتین و کیتوزان از سایر منابع نیز وجود ندارد و از این پلیمرها به صورت مشتقات مختلف برای استفاده در صنایع داروسازی، آرایشی، مواد غذایی، بیوتکنولوژی، پزشکی، شیمیایی، به کشور وارد می‌شود، لذا می‌توان با استخراج آنها از پوسته سیست آرتمیا، از تولیدات داخلی استفاده نمود.

۲۱.بازیافت کیتین و کیتوزان از پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه، ضمن امکان استفاده بهینه از منابع طبیعی، موجب افزایش ارزشی این آبزی است.

۲۲.معرفی نمودن پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با ۳±۲۸ درصد کیتین قابل استخراج برای اولین بار بعنوان یک منبع جدید، قابل دسترس برای استخراج این بیوپلیمرها

۲۳.استفاده از روش زیستی با بکارگیری از آنزیم‌های باکتری باسیلوس سوبیتیلیس به جای ماده هیدروکسید سدیم برای حذف ترکیبات پروتئینی در فرآیند استخراج کیتین از پوسته سیست آرتمیا

۲۴.استفاده از داستیلاز تولید شده از قارچ آسپیرژیلوس نایجر برای تولید کیتوزان

۲۵.کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا دارای خصوصیات برتر نسبت به دو نمونه مشابه تجاری چینی و ویتنامی است، لذا این خصوصیات قابلیت کاربردی آن را در صنایع مختلف مطرح می کند.

پیشنهادها

پیشنهادات اجرایی

- بنابه دلایل ارایه شده در بخش محدودیت های تولیدی این بیوپلیمر در دنیا (۲-۷) نسبت به استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا اقدام شود.
- کیتین و کیتوزان برای مصرف در صنایع داروسازی، پزشکی، کشاورزی، زیست فن‌آوری، آرایشی، ... به کشور وارد و استفاده می‌شود، کیتین و کیتوزان استخراج شده از پوسته سیست آرتمیا جایگزین محصولات مشابه تجاری وارداتی آن شود.
- چون بیشترین کاربرد مربوط به کیتوزان و مشتقات آن است و کیفیت در کاربرد آن نقش اساسی دارد، و روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان در مقایسه با روش های رایج شیمیایی نتیجه مطلوب تری به دنبال دارد، پیشنهاد می گردد برای افزایش کیفیت، کیتین تجاری وارداتی با روش زیستی به کیتوزان تبدیل و مورد مصرف قرار گیرد که ضمن افزایش کیفیت، می‌تواند قطع واردات این پلیمر را نیز به دنبال داشته باشد.

پیشنهادهای پژوهشی آینده:

- بهینه‌سازی روشهای زیستی برای استخراج کیتین و کیتوزان جهت بالا بردن بازدهی و کیفیت محصولات.
- تحقیق و بررسی ملاحظات زیست محیطی لازم در صورت بهره برداری.
- بررسی و مطالعه نقش عوامل طبیعی و اکولوژیکی نظیر آلودگی‌ها، دما، شوری، تغییرات فصلی در میزان درصد وزنی کیتین موجود در پوسته سیست آرتمیا اورمیانا در سایر فصول سال.
- ارزیابی دقیق ذخایر سیست آرتمیا اورمیانا و برآورد دقیق میزان پوسته سیست آرتمیای دریاچه ارومیه.
- مطالعه و بررسی امکان تهیه و تولید مشتقات جدید با کاربردهای نوین از کیتین و کیتوزان پوسته سیست آرتمیا اورمیانا.
- بررسی امکان بازیافت سایر فرآورده‌های جنبی نظیر مواد پروتئینی، ترکیبات معدنی مهم و مواد رنگی از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا.
- بررسی و مطالعه سایر خصوصیات کیتین و کیتوزان پوسته سیست آرتمیا نظیر (پیرولیز شدن، درجه پلیمریزاسیون، ...)
- مطالعه و پژوهش درخصوص امکان جایگزینی روش زیستی در حذف سایر ترکیبات همراه نظیر مواد معدنی، رنگی و مواد لیپیدی در استخراج و مطالعه نقش آنها در بهبود کیفیت محصولات.
- بررسی سایر منابع طبیعی در استخراج کیتین و کیتوزان در کشور.
- مطالعه و تحقیق سایر روشهای زیستی در عمل‌آوری کیتین و کیتوزان.

منـابع

۱) اسدپور، ی. ۱۳۸۲. استحصال کیتین وتبدیل آن به کیتوزان از پوسته سیست آرتمیا اورمیانا با فن آوری زیستی ،پروژه دکترای ،دانشگاه تربیت مدرس ،۱۰۷ صفحه .

۲) اسدپور، ی. ۱۳۸۳. دستورالعمل‌های استحصال و عمل‌آوری آرتمیا اورمیانا و بکارگیری آن در آبزی - پروری، مرکزی تحقیقات امور دام و منابع طبیعی، آذربایجان غربی، ۶۰ صفحه.

۳) ادیان، ج. ۱۳۸۱. اصول پلیمر ها، مترجم، امیدیان، ح و وفائیان، م. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی ۳۹۰ صفحه.

۳) اوسط ملتی، ع. ۱۳۸۶. آنزیم شناسی و جنبه‌های بالینی آن، موسسه فرهنگی انتشاراتی حیانف ۲۱۲ صفحه.

۴) پاویالمیمن، ک. نگرش بر طیف سنجی، مترجم، موثق، ۱۳۸۵، انتشارات علمی و فنی، ۶۸۵ صفحه.

۵) تاگر، ا. ۱۳۸۱. شیمی فیزیک پلی مرها، مترجم: قائمی، م و رستمی. ر، انتشارات دانشگاه مازندران، ۶۷۱ صفحه.

۶) تهامی، م و تهامی، م. ۱۳۷۴. استخراج کیتین از پوسته خرچنگ، میگو، لابستر گزارش نهائی مرکز تحقیقات شیلات بندرعباس، ۸۶ صفحه.

۷) حسینی، س. ۱۳۸۷. بررسی ارزش غذایی آرتمیای دریاچه ارومیه با تاکید بر ارزیابی میزان پروتئین و چربی در مراحل مختلف رشد، دانشگاه دامپزشکی، پایان‌نامه دکترای، دانشگاه ارومیه.

۸) سی اس جیمز. ۱۳۸۶. شیمی تجزیه مواد غذایی، مترجم، خسروشاهی اصل، الف. انتشارات دانشگاه ارومیه، ۲۱۰ صفحه.

۱۰) سیلوراشتن، ر. م.، وایکسروبستر.ف. ۱۳۸۷. شناسایی ترکیبات آلی به روش طیف‌سنجی.، مترجم صادقی، س. انتشارات علمی- فنی، صفحات ۲۵ تا ۸۰.

۱۱) شیخی، نارانی، م، ۱۳۸۱. رئولوژی.، انتشارات دانشگاه صنعتی امیرکبیر، ۴۷۸ صفحه.

۱۲) لیننگر، آلبرت. ۱۳۸۶. بیوشیمی، مترجم: براتی، خ و همکاران، جلد اول، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران، ۴۴۶ صفحه.

۱۳) مصطفایی، ع. ۱۳۸۸. راهنمایی الکتروفورز پروتئین در ژل، انتشارات تزکیه، ۱۲۸ صفحه.

۱۴) مهدوی نیا، غ. ۱۳۸۰. «استخراج کیتین از پوست میگو و بهبود خواص شیمی فیزیکی آن»، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی شریف.

۱۵) نیکوکار، م و صالحی، ج و ابراهیمی، الف. ۱۳۸۷. «آمار و کاربرد آن در مدیریت»، انتشارات دانشگاه صنعتی امیرکبیر و تهران، موسسه گسترش علوم پایه، ۴۳۰ صفحه.

۱۶) یعقوبی، ن و میرزاده، ح و هرمزی، ف. ۱۳۸۱. «بهینه سازی استخراج کیتین و تهیه کیتوزان از پوست میگو»، صنایع علوم و تکنولوژی پلیمر، صفحات ۵۵ تا ۶۵.

18) AOAC. (2002). Official methods of analysis Association of Official Analytical Chemistry, 17th ed. The Association of Official Analytical Chemistry Inc: Washington, DC.

18) A.P.T.co., 2010, "A State Company Specializes in Producing, trading of: *Aquaand Agro Products".*

Hochiminh City, Vietnam, website: *«www. aptco. vnn. vn».*

17)Alder, E., 2000, "Chitin natural macromolecules". J. *Chem.Of Macroinolecules.*Internet. Pdf. *«http://www.seaborne,com/chitinzuide.htm.»* 10.p.

18)Anderson, C.G., Pablo, N. and Romo, C. 2001. "Antartic krill (*Euphausia superba)* as a source of chitin and chitosan, in *proceedings of the first International conference on chitin/chitosan.* (eds R.A.A. Muzzarelli and E.R.

19)Araki, Y., and Ito, E., 2007, "A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* enzymatic deacetylation of chitin" *Bichem. Biophy.* Res 56, 669-45.

20)Arcidiacono, S., Lombardi, S.J., and Kaplan, D.K., 2010. "Fermentation, Processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii* in chitin and chitosan, (eds G. Skjak-Brake, T. Anthonsen and Sanford).Elsevier Applied science, New York. P. 319.

21)Asensio,J.L., Canada, F.J., Poveda, A., and barbero, J.,2000, "Structural basis for Chitin recognition by defense proteins", J.*Chem Biopolymer,* Vol. 36, N. 529. PP: 543-561.

22)Bluestone,M., Devey, K., and Shindoda, S., 2008. "Stop, don't throw those shells away an industry is growing around chitin." In *Shellfish polymer*, Buines week, March, 32, 70 p.

23)Brine, d.; 2000. "Chitin / Chitosan". InBioche, 70B, 173, Island, PP. 61-68.

24)Brugnerottos. J., Lizardi, F.M. and Rinaudo M., 2001. "An infrared investigation in relation with Chitin and Chitosan characterization" in J. *Polymer*, 42, Elseviersr, PP. 231-242.

25)CBD, 2001, "Chitin structure", Internet.Pdf *«http: // www. chitosan.com.cn /chitosan/ news»* Chang, K., Lee, J., and Rongfu, W., 2000. "HPLC analysis of N-acetyl chitooligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin" in J. *Food and Drug Analysis*, N. 8(2), pp: 75-83.

26)Charles, J. Pouchert., 2011; "The Aldrich Library of Infrared Spectra"; Edi, III;1867 p.

27)Claus, J.W., 2000; "Biobased packaging materials for the food industry" in *Dairy and Food Science, Biopolymers,* (ISSN 87-90504-070) Denmark, PP. 13-40.

28)Connell, J.J., 2009., "Methods of assessing and selecting for quality", In *Control of Fish Quality* (Torry Research Station, Eds), Scotland, Second Edi, pp. 117-145.

29)Copmsen, F., Nordisk, M.H., 2000. "Production and immobilization of alkaline protease by *Bacillus subtilis* which degrades various proteins". *Food Techno*, 48, PP: 180-230.

30)Cowgill,U.M., Emmel, H.W., and Murphy, P.G., 2013; "Varations in chemical composition of *Artemia* cysts from three geographical Locatis"; Artemia research and its application, Vol. *1 Morphology, Genetic strain characterization,* unive. press., Belgium, 380 p.

31)Cullity. B.D., 2000, "Elements of X-ray diffraction" Second edition, Notherdam, University press, 386 p.

32)Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvao, M. R., and Rocha, Joao, 2001; "Determination of the degree of acetylation of chitin materials by NMR spectroscopy" J. *Biological macromolecules,* NO. 28, pp: 359-363.

33)Dube, J., 2010, "Microorganisms and chemical reagents", J. *Miner. Eng.,* 5, pp: 547-556.

34)Gildberg, A., Stenberg, E., 2000, "A new process for advanced utilization of shrimp waste". J. *Process Biochemistry Tromso,* Norway, No. 36. PP: 809-812.

35)Goorge, A., Roberts. F., 2000, "Chitin Chemistry" In *Senior Lecture in Dyeing Nottingham Polytechnic*; The Macmilan press LTD. London. 349 p.

36)Haard, N.F., and Simpson, N.K., 2011; "Proteases from aquatic orgaisms and their uses in the seafood industry." In *Fisheries Processing: Biotechnological Applications,* (Marin, M. A. Ed), Chapman and Hall, London, UK, PP. 132-153.

37)Hackman,H., R., Blackwell, J., 2010 , "Chitin and Chitosan and related enzymes." Academic press, New York, 257 p.

38)Hansen, M.E., and IL lanes. A., 2014; "Applications of crustacean wastes in biotechnology". In *Fisheries Processing Biotechnology Applications,* (Marin, M. A. Ed.), Chapman and Hall, London, UK, pp: 17, 205.

39)Hein, S., Chuen, N., Chandrkrachang, S., and Stevens, F., 2001, "A systematic approach to quality assessment system of chitosan", in *Asian Institute of Technology* Internet pdf <http://ww.Southrnblue. Com/chitosan» Bangkok. 6.P.

40)Ichi, S. T., Alcio, K., and Sakamoto., 2000. "Microparticulate for the larvae of aqatic animals", J. *Data file fish, Res.* 2, 67-86.

41)Jacguelyn, G.B., 2000; "Microbiology Principles and Exploratings". 4th ed., Oxford, UK, pp. 227-223.

42)Jagur, J., and Zinski, g.; 2013; "Biomedical application of functional Polymers". In *Reactive and Functional Polymers.* Elsevier. No. 39, PP: 99-138.

43)Knapezyk, J., Krwezynski, L., Krzek, J., Brzeski, M., and Schenk, K., 2014."Physical properties and

applications." In *Chitin and Chitosan : Sources, Chemistry, Biochemistry,* Elsevier science Publishers Ltd., pp: 657-663.
44)Knorr, D., 2000, "Recovery and utilization of Chitin and Chitosan in food processing waste management". *Food Technology,* No. 45. PP: 115-127.
45)Laidter, K. J., 1973, "The Chemical kinetics of NaOH action." 2nd , ed, Oxford, New York.
46)Laven, P., Sorgeloos, P., and Leger, P., 2010. "Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture". In *the brine shrimp Artemia*, Vol. 3. *Ecology, culturing, use in aquaculture,* universa press. Belgium. 428 p.
47)Lazarera,G.J., 2000, "Experimental data for a study of polyacrylamide" *Chem Abstract*, 72, No. 35634.
48)Mary, E., and Davis, M.J., 2002. "Defense Response in slash pine: chitosan- treatment alters the abundance of specific mRNAs". in *J. MP MI,* vol, 10, No. 1, PP. 135-137.
49)Morgan , J., Foster, C., Evison, L., 2002. "A comparative study of the nature of biopolymers extracted from activated sludges". J., *Wat. Res.,* 24, 743-750.
50)Muzzarelli, R.A., Jeuniaux, C., and Gooday, G.W., 2000. Chitin in nature and technology". Plenum press, New York. 295 p.
51)Nat'l Academy Press., 2013. "Chitin production from lobster and crab shells", Internet pdf, <<mailto:adds@rose-net.co.ir»
52)Nicole, J., Okazaki, B., and Hedgecock, D. 2011. "Effect of environmental factors on cyst formation in the brine shrimp Artemia", in *Artemia Research and its Applications,* Univ. of California, USA, PP: 165-181.
53)No, H.K., Lee, K.S., and Meyers, S.P., 2000. "Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products" in J, *FoodScie,* Vol. 65. No. 7. PP. 1134-37.
54)None, J., Porulx, D., Gudin, C., 2007. "Drug and chemicals from aquaculture." J. *Business Science.* Int. Confe. Aquaculture Europe, V. 89. pp. 389-418.
55)Pagel, d., 2000. "Chitin production from lobster and crab". *Academy press,* Island, PP. 61-68.
56)Pariser, E.R., and Lombardi, d.p., 2004. "A guide to the research literaturechitin." *Source book.* Plenum press, New York. USA, 560, P.
57)Park, O., Hiroshi, M., Watanabe, J., and Thoru, C., 1993. "Method for preparing chitosan". *U.S. Patent Documents,* 5. 232. 842, 7 P.
58)Peberdy, J.F., 2010. "Biotechnological approaches to the total utilisation of crustacean shellfish waste". In *Euro. Commission. Supported. STD.-3 projects* (1992-1995), Internet, pdf «*http://user. Chollian.net/~Chitin/*», 5. P.
59)Pinado,J., and pastrana, L. 2011. "Different strain *of Aspergillus niger* grown on an effluent" *Biotechnology letters* Vol. 15 No. 11. Pp (1157-1162).
60)Rinaudo,A., Grenoble. F., 2011. "Structure of Chitin and Chitosan" in *Chitin Chemistry*, (Goorge, A.Ed), The macmilan Press LTD, London, pp: 1-35.
61)Rippe, H.H., Mekay, L.L., 2000. "Over secretion of natural protease from *Bacillus subtilis".* J. *Dairy. Sci.* 77(8), 2150-2159.
62)Saito, H., Tabeta, R., and Hirano, S., 2012. "Chitin and Chitosan". (Hirano and S. Tokura Eds), The Japanese society of chitin and chitosan, Tottori, P. 71.
63)Seaborne; 2001. "A netural product for the 21th century", in *Guide to Chitin,* Internet Pdf *«URL jittp.VAvww.Seaborne. Com/Chitin2uide.htm.»5P.*
64)Shahidi, F., Arachechi, J.K., 2010. "Food applications of chitin and chitosans", Elsevier J. *FoodScie & Tech.,* N. 10, pp: 37-51.
65)Shimahara, K., Takiguchi, Y., and Okada, 0., 2011. "Chemical composition and some properties of crustacean chitin prepared by use of proteolytic activity of *Pseuodomonas maltophilia* LC102, 2nd Int. Conf, *Chitin/Chitosan,* (S. Hirano and S. Tokura ed). Uni. Seikei Tokyo, 10. P.
66)Simpson, B.K., and Haard, N.F., 2000. "Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry" in *Fisheries Processing*, (Marin, M.A.Ed), Chapman & Hall, London, PP: 132-155.
67)Simpson, B.K., Gange, N., and Simpson, M.V., 2000, "Bioprocessing of Chitin and Chitosan". In *Fisheries Processing; Biotechnological Appliations,* (Martin, A.M.ed), Published in 1994 by Chapman and Hall, London, UK, PP; 154-173.
68)Sorgeloos, p., 2010. "Determination and identification of biological characteristics of *artemia urmiana* for application in aquaclture". Univ. of Gent Belgium, Item A 110. p.
69)Sorgeloos, P., 2011. "Resource assessment of Urmiah Lake *Artemia* cysts and biomas". Uni. Of Gent, Belgium-Item B, 110.p.
70)Stevens, W., Cheypratub, P., Sjeng, H., How, C., and Suwalee, C., 2000,. "Alternative in Shrimp biowaste processing." In *Flege TW(ed) Advances in shrimp biotechnology.* Asian Institute of Technology, Thailand. PP. 19-26.

71)Strikntaiah, M., and Mohankumar, K.C., 1980. "Isolation and characterization of chitin degrading bacteria". In *Fishery Microbiology'.* Vol. 20. No. 3. PP: 216- 220.
72)Subasinghe, S., 2013. "Chitin from shellfish waste-health benefits overshadowing industrial uses!" J. *Infofish international*: No. 3, PP: 58-65. (Mailto: adds@ rose-net.co.ir)
73)Susana,L., Ronan, D., Shamlou, P.A., and Dunill, P., 2000. "Biochemical engineering approaches to the challenges of Producing Pure Plasmid DNA". Internet. Pdf *«http://Wilv. Co. Uk/zemnedJ'clinical.»*
74)*UNEP,2010, "Convention on biological diversity". In* Conference. Nairobi *Internet pdf* http.V/www.ocean, udel. edu/Seasrant/research/marinebiotech. html». *15 pp.*
75)Walton, A. G., and Blackwell, J., 2000. "Biopolymers", Academic press., New York, P. 467.
76)Walton, A. G., Rudall , K. M., 2001; "Bioploymers" in *Analysis of Chitin and Chitosan*, (Anthonsen and P. sand ford Eds) Elsevier, London, p. 276.
77)Whistler, R., 2001. "Encyclopedia of polymer science and technology". *Interscience publisher,* New York, Toronto,
78)Worthington, V., 2000. "Enzymes and related biochemicals" *New Jersey.* U.S.A. 07728, 401. P.
79)Yokoi,H., Arima, T., Hirse, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y., 2011. "Flocculation properties of polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis,* J. *Ferment. Bioeng.,* 82, 84-87.
80) Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. Criti. Rev. Food Sci. Nutr., 43(2):145-171
81)Zeng, L., Qin, C., He, G., Wang, W., Li, W., and Xu, D. (2008). Effect of dietary chitosan on trace iron, copper and zinc in mice. Carbohyd. Poly., 74:279-282

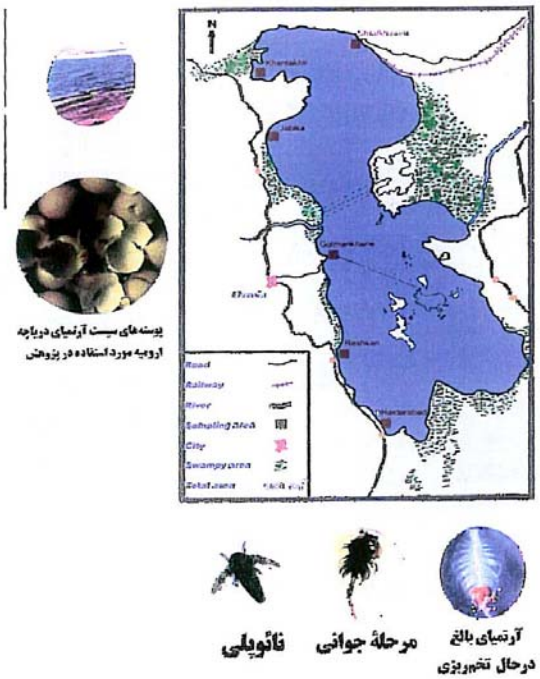
واژه نامه

Algae	آلگ	Biomass	توده زیستی
Artemia	آرتمیا	Chitin	کیتین
Alginate	آلژینات	Chitosan	کیتوزان
Aromatic	آروماتیک	Cellulose	سلولز
Amino group	گروه آمینی	Carragenan	کاراژینان
Alfa	آلفا	Cyst	سیست
Acetylamino	استیل آمینو	Crab	خرچنگ
Analyser	تجزیه گر	Cuticule layer	لایه کوتیکولی
Aspergillus niger	آسپیرژیلوس نایجر	Covalent band	پیوند کووالانسی
Agar	آگار	Chorionic layer	لایه کوریونی
Acrylamide	آکریل آمید	Chymotrypsin	کیموتریپیسن
Acetylation	استیله شدن	Crustacea	سخت پوست
Alanine	آلانین	Copolymer	همبسپار
Application	کاربرد	Deacetylation	استیل زدایی
Assay	سنجش	Dalton	دالتون
Biopolymer	پلیمرزیستی	Diatoma	دیاتومه
Biometric	زیست سنجی	Denaturation	غیرذاتی شدن و واسرشتگی
Brine	شور	Diffraction	تجزیه
Bacillus subtilis	باسیلوس سوبتیلیس	Degree	درجه
Biotechnology	فن آوری زیستی	Depolymerization	دپلیمریزاسیون
Buffer	بافر	Desecator	دسیکاتور

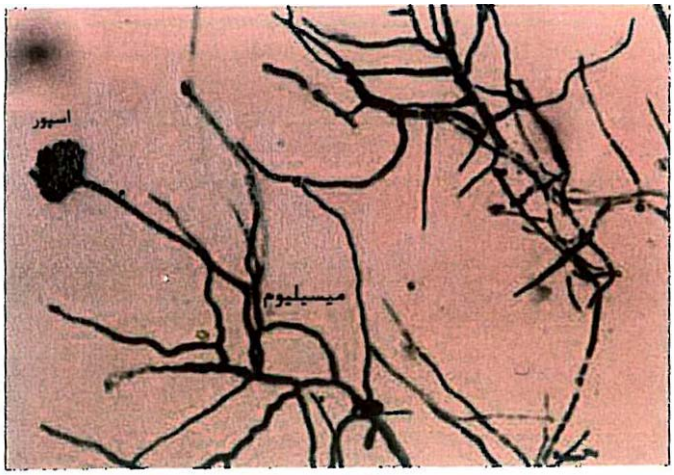
آبکافت	Hydrolysis	حذف گروه آمین	Deamination
بی مهرگان	Invertebrate	دکسترین	Dextrain
مادون قرمز	Infrared	کلسیم زدایی	Decalcification
کریل	Krill	استخراج	Extract
کلدال	Kjeldahl	جنینی	Embryo
چربی	Lipid	آنزیم	Enzyme
ماهی مرکب	Loligo	الکتروفورز	Electrophoreie
تک پار	Monomer	فعالیت آنزیمی	Enzyme activity
ریزساختار	Microcrystalini	فلوروسانس	Fluorescense
دریائی	Marine	قارچ	Fungi
نرم تن	Mollusk	گلوکز آمین	Glucosamine
میسیلیوم	Mycelium	ژله‌ای شدن	Gelation
غشاء	Membrane	گاما	Gama
ماکرومولکول	Macromolecule	ژلاتین	Gelatin
نانومتر	Nanometer	گلیسین	Glycine
مواد مغذی	Nutrient	گلیکولیپید	Glycolipid
تخم گذار	Ovoparous	گلیکو- پروتئین	Glycoprotein
تخم گذار- زنده زا	Ovoviviparous	تفریخ	Hatch
اجاق	Oven	همی سلولز	Hemicellulose
پلی ساکاریدها	Polysaccharides	هپارین	Heparin
بسپارش	Polymerization	گروه هیدروکسی	Hydroxy group

سوکسله	Soxhlet	پکتین	Pectin
اسلنت	Slant	پروتئوگلیکان	Proteoglycon
سوبسترا	Substrate	شفیره	Puparia
اسپکتروفتومتر	Spectrophotometer	میگو	Prawn
طیف	Spectrum	پپتون	Peptone
تریپسین	Tripsin	پیرولیز شدن	Pryolese
گرانروی	Viscosity		Proteolytic
کرم	Worm	پروتئولیتیک	Polymer
پساب	Wastewater	بسپار	Rheology
اشعه ایکس	X-ray	رئولوژی	Shell
مخمر	Yeast	پوسته	Superabsorbent
		ابر جاذب	Spectroscopy
		اسپکتروسکوپی	

پیوست



چرخه زیستی آرتمیا در دریاچه ارومیه و تولید پوسته سیست



تصویر میکروسکوپی قارچ آسپرژیلوس نایجر

Abstract

Chitin and chitosan are 2 very important products of biopolymer that enjoy high consumption in industry, but their production sources are very limited. In this study, *Artemia urmiana* cyst shells were obtained from previously collected and stored ones in Iranian Artemia Research Center. 20 kg of *Artemia urmiana* cyst shells were sampled, cleaned, separated, dried and transferred to Iranian Artemia Research Center Laboratory to extract their Chitin and chitosan. Their chitin and chitosan initially were extracted using optimized common chemical methods. Their properties were compared to 2 other types of Chitin and chitosan obtained from crab and shrimp manufactured by Vietnam and China, respectively. To determine their quality, elemental analysis device , infrared spectrophotometry, x –ray radiography , determination of viscosity , molecular weight, crystallinity percent , color, de stylization measure , empirical and molecular formulas were made . The results showed that the percentage of chitin obtained from Artemia cyst Shells in Chemical method was 28 ± 3 % by weight and efficiency into chitosan (grade steel relief) in this method was 50 ± 5 %. To optimize the extraction procedure and the removal of proteins of chitin by biological practices that were done by sodium hydroxide in the chemical method, it was replaced by the bacterium *Bacillus subtilis*.

And in the bio- phase of chitosan de steelation fungus *Aspergillus niger* enzyme was replaced instead of sodium hydroxide at high temperatures.

The results showed that chitin and chitosan can be extracted from Artemia cyst shell using biological method and their characteristics included as in chitin49.6% C , 8.2 % N , 7.5 % H, and 34.5 % O . Also the same levels for chitosan were 44.4 %, 8.9, 7.2 and 39.5 %, respectively. Their other quality characteristics were included chitin average molecular weight 4.9 × 10 6 Dalton , crystallinity percentage of 36.4 , viscosity at 20 ° C 31 centipoise and its color was gray to brown . In the biologic method, the average molecular weight of chitosan, crystallinity percentage, viscosity at 20 ° C, were 5.1×10^5 Dalton, 94.5, and 18 centipoises, respectively. Also, its color was pale brown. Chemical structure of extracted chitin and chitosan from the shell of *Artemia urmiana* cysts were $C_7H_{12}NO_4$ and C6H11 NO4c , respectively . The comparison of chitin and chitosan obtained from each chemical and biological method revealed that replacing biological methods instead of chemical methods is possible in achieving these products at suitable condition and better quality . This can eliminate the use of chemicals damaging the environment such as sodium hydroxide and decrease environmental pollution.

Key words: Artemia urmiana cyst shell, Chitin, Chitosan, Chemical, Biological method, crab shell, Shrimp shell .

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – National Artemia Research Center

---

Project Title : Using Biotechnology and Chemical Approach Extraction of Chitin and Conversion to Chitosan from the Cyst Shells of *Artemia urmiana*
Approved Number: 2-79-12-92149
Author: YOSIEF ALI ASADPOUR
Project Researcher : YOSIEF ALI ASADPOUR
Collaborator(s) *:* A.A. Motalebi, S, A. Shojaosadati, A. Emanifar.
Advisor(s): M.R. Kalbasei, A. Ghoroghi, A.A. Khosrow shahi asel
Supervisor: -
Location of execution : West Azarbaijan Province
Date of Beginning :2013
Period of execution : 2 Years
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - National Artemia Research Center

Project Title :

Using Biotechnology and Chemical Approach Extraction of Chitin and Conversion to Chitosan from the Cyst Shells of *Artemia urmiana*

Project Researcher :

YOSIEF ALI ASADPOUR

Register NO.

47668