اصلاح و بهینه‌سازی فرایند استخراج کیتین از پوست میگو

علی غیاث‌الدین، سید عباس شجاع‌الساداتی*+، ابراهیم واشقانی فراهانی
تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده: در این پژوهش استخراج کیتین از پوسته میگو طی فرایندهای املاح‌زدایی و پروتئین‌زدایی از نظر زمان اقامت، غلظت مواد فراوری کننده یعنی هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید و دمای واکنش، بهینه‌سازی شد. در برخی از روش‌های موجود مرحله پروتئین‌زدایی مقدم بر املاح‌زدایی است، ولی آزمایش‌های انجام شده بیانگر این واقعیت است که فرایند املاح‌زدایی باید مقدم بر پروتئین‌زدایی باشد. مطابق آزمایش‌های انجام شده، دما و زمان بهینه در فرایند املاح‌زدایی به ترتیب $55\ ^\circ C$ و ۸ ساعت تعیین شد و دما و زمان اقامت بهینه در فرایند پروتئین‌زدایی به ترتیب $65\ ^\circ C$ و ۱۲ ساعت به دست آمد. در فرایند املاح‌زدایی، هیدروکلریک اسید با غلظت ۳ نرمال به جای اسید ۴ نرمال قابل استفاده است که موجب ۲۵٪ صرفه‌جویی در میزان هیدروکلریک اسید می‌شود. برای فرایند پروتئین‌زدایی، سدیم هیدروکسید با غلظت ۳ نرمال به عنوان مقدار بهینه تعیین شد. در این شرایط، راندمان استخراج کیتین به حدود ۸۲ درصد رسید.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، استخراج کیتین، پوست میگو، املاح‌زدایی، پروتئین‌زدایی.

KEY WORDS: *Optimization, Chitin extraction, Shrimp shell, Demineralization, Deproteinization.*

مقدمه

کیتین پلی‌مری خطی با وزن مولکولی بالاست، که از اتصال N– استیل D– گلوکز آمین (N– استیل ۲– آمینو ۲– داکسی D– گلوکو پیرانوز) به دست می‌آید [۲، ۱].

کیتین ماده‌ای نیتروژنه، سفیدرنگ و غیر الاستیک است و همانند سلولز که یک پلی ساکارید ساختمانی است، واکنش‌پذیری کمی دارد. از نظر فراوانی، کیتین بعد از سلولز دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت است. کیتین در پوست سخت پوستان دریایی، بدن حشرات و قارچ‌ها یافت می‌شود [۲].

کاربرد زیاد این ماده در صنایع فیلم عکاسی، لوازم آرایشی و بهداشتی، تهیه بافت‌های مصنوعی بدن، صنایع غذایی، صنایع تصفیه آب، نساجی و کاغذسازی و همچنین کاربرد آن در صنایع کشاورزی باعث شده است تا توجه زیادی به تولید صنعتی این ماده معطوف شود.

منبع سنتی و اقتصادی تهیه کیتین پوست سخت‌پوستان دریایی مانند میگو و خرچنگ می‌باشد. با توجه به افزایش تقاضا برای غذاهای دریایی در سال‌های اخیر، میزان استفاده غذایی از این آبزیان و به ویژه میگو بسیار زیاد شده است. این مسئله موجب افزایش تولید قسمت‌های غیر خوراکی مانند سر، دم و پوسته می‌شود که درصورت باقی ماندن به مقدار زیاد در طبیعت می‌توانند مشکلات زیست محیطی فراوانی ایجاد کنند [۳]. از سوی دیگر پوست میگو در حقیقت ترکیبی از کیتین، پروتئین و کلسیم کربنات می‌باشد [۴]. در نتیجه تهیه کیتین از پوست میگو نه تنها می‌تواند راه حلی در برابر مشکلات زیست محیطی باشد، بلکه به‌عنوان منبعی برای تهیه ماده با ارزش کیتین می‌باشد [۵]. به همین دلیل توجه پژوهشگران برای تولید کیتین به استفاده از این ماده

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: shoja_sa@modares.ac.ir

جلب شده است و تا کنون مطالعه‌های بسیاری در این زمینه انجام شده است [۹ـ۶].

پوست میگو به لحاظ وزنی بیش از ۱۰ درصد وزن آن را تشکیل می‌دهد [۱۰]. مواد معدنی در حدود ۲۱ درصد وزنی پوست میگو را تشکیل می‌دهند و عبارتند از کلسیم (۱۸٫۱۷ درصد)، سدیم (۰٫۸۰ درصد)، فسفر (۱٫۲۶ درصد)، منیزیم (۰٫۹۱ درصد) و پتاسیم (۰٫۳۶ درصد) [۱۱]. مطالعات انجام شده توسط *ژو* و *همکاران* در سال ۲۰۰۸ میلادی نیز میزان نیتروژن پوست میگو را ۷۶، میزان کیتین را ۲۵۷، میزان پروتئین را ۳۸۰، میزان کلسیم را ۱۲۱ و میزان کلسیم کربنات را ۳۰۸ میلی‌گرم در هر گرم از پوست میگو عنوان کرده‌اند [۹].

تاکنون روش‌های گوناگونی برای استخراج کیتین از پوست سخت‌پوستان دریایی به ثبت رسیده است [۱۶ـ۱۲]. بیشتر این روش‌ها شامل مراحل زیر می‌باشد.

۱ـ آسیاب کردن پوسته‌ها
۲ـ فرایند املاح‌زدایی[۱]
۳ـ فرایند پروتئین‌زدایی[۲]
۴ـ خشک کردن[۳]

درمرحله املاح‌زدایی، هدف جداسازی نمک‌ها و املاح معدنی همراه پوسته سخت‌پوستان می‌باشد. این نمک‌ها ترکیباتی از فسفات و کلسیم هستند. برای جداسازی این نمک‌ها در بیشتر روش‌های استخراج کیتین، از هیدروکلریک اسید با غلظت‌های متفاوت (از یک نرمال تا ۶ نرمال) استفاده می‌شود [۱۹–۱۷].

در مرحله پروتئین‌زدایی، هدف استخراج پروتئین‌های موجود در پوسته سخت‌پوستان است در بیشتر روش‌های شیمیایی استخراج پروتئین، استفاده از سدیم هیدروکسید در دماها و غلظت‌های متفاوت (از نیم نرمال تا ۷ نرمال) پیشنهاد می‌شود [۲۱–۱۷].

البته مواد دیگری مانند فرمیک اسید، استیک اسید، اتیل الکل، سدیم دودسیل بنزن سولفات و یا دی متیل فرمامید نیز برای مرحله فراوری استفاده می‌شوند، برای استخراج پروتئین نیز به‌طور معمول از آنزیم پروتئاز نیز استفاده می‌شود [۲۵ـ۲۱، ۱۸، ۱۷].

در فرایند صنعتی استخراج کیتین، به دلیل وجود ملاحظات اقتصادی، بهترین مواد استخراج کنندهٔ املاح و پروتئین همان هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید هستند.

در این پژوهش فرایند فراوری کیتین از پوست میگو از نظر زمان اقامت، غلظت مواد استفاده شده برای فراوری و دمای فرایند، بهینه‌سازی شد و در مورد تقدم و تأخر مراحل املاح‌زدایی و پروتئین‌زدایی نیز آزمایش‌هایی انجام شده و نتیجه‌های تازه‌ای به دست آمد.

بخش تجربی

دستگاه‌ها

در این پژوهش از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Philips Xpert برای ثبت پراش پودر پوست میگو و فراوردهٔ نهایی کیتین استفاده شد. دستگاه FT-IR مدل Vertex 70 برای ثبت نتایج FT-IR استفاده شد. همچنین از کوره الکتریکی ATBIN مدل ALF18 (ساخت ایران) مجهز به ترموکوپل $\text{Type K}_{(\text{NiCr-Ni})}$ با غلاف سرامیکی برای حرارت دادن نمونه‌ها استفاده شد. بوته‌های مورد استفاده برای حرارت دادن نمونه‌ها همگی از جنس چینی به حجم تقریبی ۲۵ سانتی‌متر مکعب هستند.

مواد

پوست میگو مصرفی در این آزمایش‌ها، از مزارع پرورش میگو واقع در بوشهر تهیه شد. هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید و کاغذهای pH متر، از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

استخراج کیتین با تقدم فرایند املاح‌زدایی نسبت به پروتئین‌زدایی

مقدار ۵ گرم پوست میگو خشک در ۵۰۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۴ نرمال ریخته شد و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در پایان ۴۸ ساعت، مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه به شدت به‌هم زده و سپس صاف شد. برای صاف کردن پوسته‌های املاح‌زدایی شده از یک الک دانه درشت (۰٫۵ میلی‌متر مربع) استفاده شد. پس از آن برای جداسازی ذرات ریز نمونه، که از یک صافی عبور کرده‌اند از یک صافی با توانایی جداسازی ذرات تا ۵ میکرومتر استفاده شد. پوسته باقی مانده با آب ولرم، آنقدر شستشو داده شد تا pH به دست آمده از ریختن پوست‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب کمتر از ۶ نشود، سپس پوسته‌ها برای مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و سپس توزین شد.

در مرحله بعد پوسته املاح‌زدایی شده درون محلول سدیم هیدروکسید ۴ نرمال ریخته شد و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، همانند مرحله املاح‌زدایی کیتین، محصول واکنش از محلول سدیم هیدروکسید جدا و پس از شستشو و خشک کردن، کاهش وزن محاسبه شد.

استخراج کیتین با تقدم فرایند پروتئین‌زدایی نسبت به املاح‌زدایی

مقدار ۵ گرم پوست میگو خشک در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدرکسید ۴ نرمال ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از طی این مدت، مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده شده و سپس صاف شد. پوست باقی مانده با آب ولرم آنقدر شستشو داده شد تا pH مخلوط در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب بیشتر از ۸ نباشد.

در این حالت پوست‌ها برای مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و سپس وزن شدند. سپس پوسته‌های پروتئین‌زدایی شده به مدت ۴۸ ساعت درون هیدروکلریک اسید ۴ نرمال در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن همانند مرحله پروتئین‌زدایی، کیتین شستشو، خشک و وزن شد.

تعیین غلظت بهینه هیدروکلریک اسید

به دلیل گزارش دامنه گسترده غلظت هیدروکلریک اسید در استخراج کیتین در پژوهش‌های پیشین، لازم است برای استخراج صنعتی این محصول پایین‌ترین غلظت ممکن را تعیین نمود.

در این آزمایش مقدار ۵ گرم پوست میگو در ۵۰۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۳ نرمال ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از طی این مدت، ظرف برای مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده و سپس مخلوط صاف شد. پس از شستشوی فراوان، تا حدی که pH مخلوط پوست در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب کمتر از ۶ نباشد، پوسته‌ها آب‌گیری و سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت خشک شدند. در پایان میزان کاهش وزن پوسته‌ها ثبت شد.

در آزمایش‌های همانند بعدی به ترتیب با اسید ۲/۵، ۲ و ۱/۵ نرمال با شرایط ذکر شده، آزمایش‌ها تکرار شدند.

تعیین غلظت بهینه سدیم هیدروکسید

مقدار ۸۰ گرم پوست میگو در ۸ لیتر هیدروکلریک اسید ۳ نرمال ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از آن پوست‌های املاح‌زدایی شده، شستشو و خشک شدند.

مقدار ۵ گرم از محصول املاح‌زدایی شده با ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۳ نرمال به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس مخلوط را به مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده شد و پس از شستشو، عملیات خشک کردن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت انجام شد و کاهش وزن ثبت گردید.

آزمایش‌های بعدی به ترتیب با محلول‌های سدیم هیدروکسید در غلظت‌های ۲/۵، ۲ و ۱/۵ نرمال با همان شرایط ذکر شده، تکرار شدند.

تعیین دما و زمان اقامت مناسب برای املاح‌زدایی

مقدار ۵ گرم پوست میگو در ۵۰۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۳ نرمال ریخته شده و برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، نگه داشته شد. در پایان این زمان مخلوط هیدروکلریک اسید حاوی پوست میگو برای مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده شد و سپس صاف شد.

پوست باقی مانده با آب ولرم آنقدر شستشو داده شده تا pH محلول اصلی از ریختن پوست‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر کمتر از ۶ نباشد. در این حالت نمونه‌ها برای مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شدند. روش تعیین زمان و دمای مناسب به شرح زیر است:

بالاترین زمان گزارش شده به عنوان حد بالایی برای هریک از فرایندهای املاح‌زدایی و پروتئین‌زدایی در نظر گرفته شد، آنگاه کمترین زمان قابل تصور که برای جداسازی‌های با راندمان پائین گزارش شده نیز به عنوان حد پائین مورد آزمایش قرار گرفت. سپس مقدار میانی بین حدود بالا و پائین از نظر زمان مورد آزمایش قرار گرفت، درصورت یکسان بودن نتیجه‌ها از نظر استخراج با حد بالایی زمان، معین می‌شد که آن مقدار میانی به عنوان حد بالایی زمان کافی است.

درصورت کاهش راندمان استخراج با کاهش زمان در حد میانی زمان، آزمایش با ۵ درجه سانتی‌گراد افزایش در دمای انجام واکنش تکرار شد، که درصورت بازگشت راندمان استخراج به مقدار بالایی، دمای اضافه با زمان کمتر انتخاب شد و در غیر این صورت همان دمای اولیه بالایی به عنوان دمای بالایی آزمایش بعدی و حد میانی به عنوان حد زمان پائین درنظر گرفته می‌شد و سپس زمان میانگین بین دو حد بالایی و میانی به عنوان زمان آزمایش تکرار شد. با تکرار این عمل، حد مطلوب دما و زمان اقامت به دست آمد. پیش فرض اولیه این روش که به منظور کاهش تعداد آزمایش‌ها انتخاب شد، بر پایه افزایش میزان واکنش‌ها و حلالیت‌ها با افزایش دما استوار است.

تعیین دما و زمان اقامت مناسب برای مرحله پروتئین‌زدایی

مقدار ۸۰ گرم پوست میگو در ۸ لیتر هیدروکلریک اسید ۳ نرمال ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از آن پوسته‌های املاح‌زدایی شده شستشو و خشک شدند.

مقدار ۵ گرم از محصول املاح‌زدایی شده با ۵۰۰ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۳ نرمال به مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. آنگاه مخلوط به دست آمده به مدت ۵ دقیقه به شدت تکان داده شده و پس از شستشو، عملیات خشک کردن در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت انجام و کاهش وزن ثبت شد.

با همین روش آزمایش در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴ ساعت و بار دیگر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۸ ساعت و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گرد و در زمان ۴ ساعت و در پایان در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲ ساعت نیز تکرار شد.

آزمایش‌های تعیین دما و زمان اقامت مناسب برای مرحله پروتئین‌زدایی نیز با همان دیدگاه شرح داده شده در بخش املاح‌زدایی صورت گرفت.

آنالیزهای استاندارد برای تعیین کیفیت محصول نهایی

این آنالیزها شامل بر طیف‌سنجی مادن قرمز (IR) و آزمایش پراش پرتوهای ایکس (XRD) و اندازه‌گیری خاکستر کل است که به منظور تعیین کیفیت آزمایش‌های مرحله‌های قبل صورت پذیرفت.

روش طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

طیف سنجی مادون قرمز براساس روش‌های اشاره شده در مطالعات پیشین [۲۶] انجام شد. برای تعیین گروه‌های عاملی موجود بر روی کیتین استخراج شده از پوست میگو از دستگاه FT-IR مدل Vertex70 استفاده شد.

آزمایش‌های پراش پرتوهای ایکس (XRD)

شناسایی مواد بلوری موجود براساس آزمایش پراش پرتوهای ایکس صورت گرفت. این آزمایش توسط دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Philips Xpert و با تابش CuKα انجام گرفت.

شرایط تابش برای زاویه پراش 2θ بین ۱۰ تا ۷۰ درجه ۳۰°kV و ۴۰mA بودند.

آزمایش اندازه‌گیری خاکستر کل

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

طراحی آزمایش‌ها

تعیین مقادیر بهینه غلظت، زمان اقامت و دما به منظور استفاده در فرایند تولید صنعتی کیتین، خواسته این پژوهش است. به همین دلیل در انتخاب دامنه این متغیرها برای انجام آزمایش‌ها، همواره ملاحظات صنعتی مدنظر بوده است.

برای تعیین غلظت مناسب هیدروکلریک اسید، هرچند در مطالعات پیشین اسید با غلظت ۷ مولار نیز استفاده شده است، ولی به دلیل افزایش فشار بخار این اسید در محلول با غلظت بالاتر از ۴ مولار و دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد، بیشترین غلظت بیشینه هیدروکلریک اسید ۴ مولار درنظر گرفته شده است.

روشن است درصورت استفاده از اسید غلیظ سرعت انجام واکنش بالا خواهد رفت، ولی به دلیل تبخیر هیدروژن کلرید و خروج از محیط واکنش، نیاز به تجهیزات جذب و هزینه‌های مربوط به آن می‌باشد. از سوی دیگر به دلیل همین تبخیر، غلظت محلول اسید هیدروکلریک ظرف طی مدت کوتاهی کاهش خواهد یافت. شایان گفتن است که فشار بخار هیدروژن کلرید در محلول آبی آن در غلظت هفت مولار ۵۰۰ mmHg و در غلظت چهار مولار ۳۴۰mmHg می‌باشد [۲۷].

در تعیین غلظت مناسب سدیم هیدروکسید، مهمترین عامل محدودکننده داستیله شدن کیتین و در نتیجه تبدیل آن به کیتوزان است. به همین دلیل بالاترین غلظت مجاز ۴ مولار در نظر گرفته شده است [۲۵ و ۲۰ـ ۱۸].

در آزمایش‌های تعیین زمان اقامت و دما، به دلیل تأثیر دما بر روی زمان انجام واکنش، این دو عامل با هم درنظر گرفته شدند. به این ترتیب که برای تعیین دما و زمان اقامت بهینه مبنای کار مدت زمان ۴۸ ساعت و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد درنظر گرفته شد و سپس با انجام تغییرات در زمان اقامت و دما بهترین ترکیب این دو عامل مشخص شد. تلاش برای انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی

جدول ۱ـ نتیجه‌های آزمایش‌های تعیین غلظت بهینه هیدروکلریک اسید (وزن اولیه پوست ۵ گرم است).

غلظت اسید (نرمالیته)	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۴
وزن نهایی	۳	۲/۹	۲/۹	۲/۶	۲/۶

در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دلیل تبخیر شدت هیدروکلریک اسید بی‌نتیجه ماند.

بیشترین دمای عملی فرایند املاح‌زدایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد پیش‌بینی می‌شد زیرا در دماهای بالاتر از آن انتظار انتشار شدید بخار هیدروژن کلرید می‌رود.

در فرایند پروتئین زدایی نیز بیشترین دمای کاری برای محلول سدیم هیدروکسید همان ۶۵ درجه سانتی‌گراد درنظر گرفته شد، زیرا داستیله شدن کیتین به کیتوزان در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های طولانی در مطالعات پیشین گزارش شده است [۲۰ ـ ۱۸].

نتیجه‌ها و بحث

بهینه‌سازی غلظت مواد فراوری کننده

در ابتدا آزمایش‌هایی برای تعیین غلظت بهینه مواد استفاده شده در فراوری کیتین از پوست میگو صورت گرفت. به این ترتیب که غلظت‌های هیدروکلریک اسید (جدول ۱) و سدیم هیدروکسید (جدول ۲) به صورت جداگانه بهینه شدند.

همان‌طور که از جدول ۱ مشخص است، می‌توان از هیدروکلریک اسید ۲ نرمال به جای اسید ۴ نرمال استفاده نمود. این کار موجب می‌شود تا ۲۵٪ در میزان مصرف هیدروکلریک اسید صرفه‌جویی شود.

پس از این مرحله، بهینه‌سازی غلظت سدیم هیدروکسید برای انجام پروتئین‌زدایی در دستور کار قرار گرفت که نتیجه‌های این آزمایش در جدول ۲ دیده می‌شود.

با نگاهی به نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۲ اگرچه در ابتدا به نظر می‌رسد که استفاده از سدیم هیدروکسید با غلظت ۴ نرمال منجر به بهترین نتیجه می‌شود. اما باید دقت داشت که وزن نهایی به دست آمده در حالت استفاده از سدیم هیدروکسید ۴ نرمال با وزن به دست آمده در زمان استفاده از سدیم هیدروکسید ۳ نرمال تفاوت چندانی ندارد. درنتیجه، با توجه به خطرات و هزینه‌های

جدول ۲ـ نتیجه‌های آزمایش‌های تعیین غلظت مناسب سدیم هیدروکسید (وزن اولیه ۲/۶ گرم بوده است).

غلظت اسید (نرمالیته)	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۴
وزن نهایی	۱/۵	۱/۴	۱/۲	۱	۰/۹

استفاده از سدیم هیدروکسید در غلظت‌های بالاتر در مقیاس صنعتی، استفاده از غلظت ۳ نرمال برای پروتئین زدایی انتخاب منطقی‌تری به نظر می‌رسد.

دما و زمان اقامت بهینه در فرایند املاح‌زدایی

در این آزمایش مدت زمان ۴۸ ساعت و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مبنای کار در نظر گرفته شد و پس از آن زمان به ۴ ساعت کاهش یافت، ولی دما در ۵۰ درجه ثابت نگه داشته شد. اختلاف زیاد بین املاح‌زدایی برای این ۲ فاصله زمانی نشان داد که زمان اقامت کافی نبوده و بنابراین زمان به ۱۲ ساعت افزایش داده شد، با دو برابر کردن زمان اقامت در همان دمای ۵۰ درجه کاهش وزن به حد مطلوب خود بر مبنای ۲/۶ گرم (در ۴۸ ساعت و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) بازگشت. در آزمایش دیگری زمان به ۸ ساعت کاهش یافت، لیکن به دلیل کاهش راندمان مدنظر قرار نگرفت.

در ادامه آزمایش‌ها با افزایش دما به میزان ۵ درجه سانتی‌گراد زمان ۸ ساعت با راندمان مناسب انتخاب شد. این آزمایش نیز به خوبی پاسخ‌گو بوده و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۸ ساعت همان نتیجه دلخواه را به دست آورد.

برای اطمینان از این مسئله که افزایش دما تأثیر دلخواه در راندمان استخراج را داشته است، آزمایش با زمان ۸ ساعت و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تکرار شد که نتیجه دلخواه به دست نیامد. بنابراین دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۸ ساعت بهترین زمان اقامت و دمای فرایند تشخیص داده شد. شکل ۱ حالت‌های گوناگون انجام آزمایش‌ها در دماها و زمان‌های ماند گوناگون را به خوبی نشان می‌دهد.

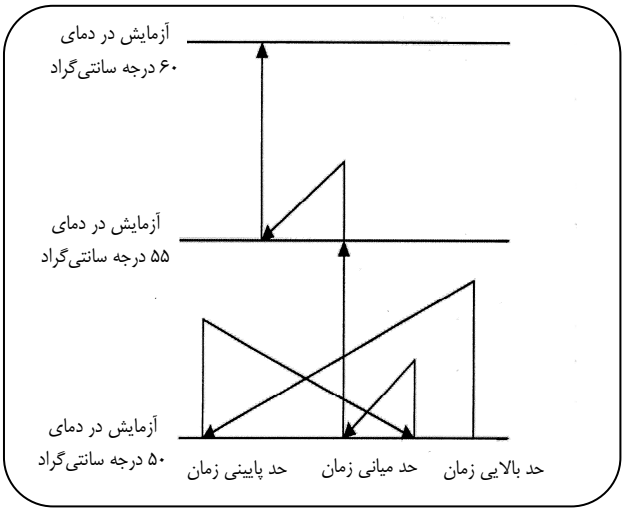
پس از آن برای کاهش زمان اقامت، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش قرار گرفت که طی این آزمایش هیدروکلریک اسید به شدت تبخیر شد و در عمل انجام آزمایش در این دما ناممکن بود.

جدول ۳ـ نتیجه‌های مربوط به تعیین دما و زمان اقامت بهینه در فرایند املاح‌زدایی، اعداد جدول بیانگر وزن پوست میگو (گرم) پس از آزمایش است. (وزن اولیه = ۵ گرم).

زمان (ساعت) / دما (°C)	۴	۸	۱۲	۴۸
۵۰	۳	۲/۷	۲/۶	۲/۷
۵۵		۲/۶	–	–
۶۰	بدون نتیجه	–	–	–

جدول ۴ـ نتیجه‌های مربوط به تعیین دما و زمان اقامت بهینه در فرایند پروتئین‌زدایی (وزن اولیه = ۲/۶ گرم).

زمان (ساعت) / دما (°C)	۴	۱۲	۴۸
۶۰	۱/۴	—	۱
۶۵	۱	۰/۹	۰/۹



شکل ۱ـ توالی انجام آزمایش‌ها به منظور انجام کمترین آزمایش.

دما و زمان اقامت مطلوب در فرایند پروتئین‌زدایی

برای انجام این آزمایش‌ها مسیرهای شرح داده شده طی شد و نتیجه‌های زیر به دست آمد:

همان‌طور که دیده می‌شود، مدت زمان ۱۲ ساعت و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد بهترین دما و زمان برای مرحله پروتئین‌زدایی است. امکان استفاده از دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به دلیل استیل زدایی کیتین و تبدیل آن به کیتوزان وجود ندارد. زیرا پس از استیل زدایی، کیتوزان در محلول سود حل شده و باعث از بین رفتن محصول می‌شود. تکرار آزمایش در ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت نیز باعث کاهش راندمان می‌شود.

نتیجه‌های آزمایش خاکستر کل

میزان خاکستر کل از محصول نهایی ۰/۶٪ می‌باشد که برای ارایه فراورده به شکل تجاری مطلوب است.

نتیجه‌های آزمایش‌های FT-IR و XRD

فراورده نهایی که در شرایط بهینه شده تهیه شده است، برای آنالیزهای FT-IR و XRD ارسال شده و همچنین آزمایش‌های تعیین خاکستر کل و تعیین میزان کل پروتئین بر روی آنها صورت پذیرفت که نتیجه‌های آن در ادامه آورده شده است.

در طیف‌سنجی FT-IR بر روی نمونه کیتین استخراج شده از پوست میگو وجود باندهای جذبی در محدوده $3400\ cm^{-1}$، $2800\ cm^{-1}$، $1660 cm^{-1}$، $1550 cm^{-1}$، $1320 cm^{-1}$ و $1090 cm^{-1}$ بیانگر گروه‌های آمینواستیل و CH-OH موجود در ساختمان کیتین می‌باشد. مقایسه طیف استاندارد کیتین استخراج شده از پوسته میگو که از مطالعات قبلی استخراج شده است و طیف حاصل شده از این مطالعه، نشان دهنده تشابه زیاد این دو طیف بوده و خلوص و کیفیت کیتین به دست آمده را نشان می‌دهد.

براساس نتیجه‌های پراش اشعه ایکس، پیک شاخص در زاویه $\theta = 19/5^\circ$ تشکیل شده است که مختص شاخص بلوری پلیکر کیتین است. براساس نتیجه‌های جدول‌های آنالیز پراش اشعه ایکس، درصد بلوری شدن در پیک ۱۹/۵ به دست آمده است، که درصد آن معادل ۳۶/۴ می‌باشد.

با انجام بهینه‌سازی‌های اشاره شده، آزمایش‌های استخراج کیتین از پوست میگو با سه بار تکرار انجام شد و نتیجه‌های به دست آمده در جدول ۵ آورده شده است.

با مقایسه دو آزمایش قبل به خوبی مشاهده می‌شود که مناسب‌تر است که مرحله املاح‌زدایی قبل از پروتئین‌زدایی انجام شود. آزمایش‌های انجام شده با تقدم املاح‌زدایی منجر به کاهش وزن بیشتری داشته‌اند و بیشترین راندمان در این آزمایش‌ها حدود ۸۲ درصد بود.

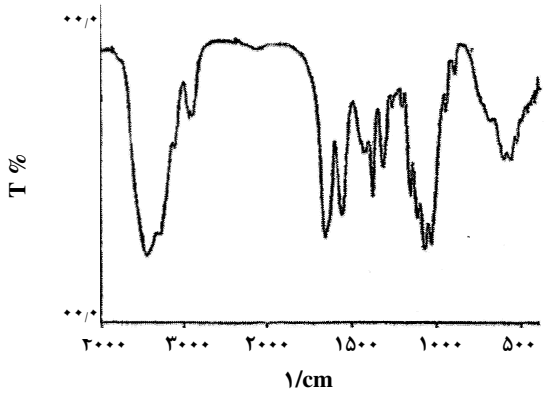
این نتیجه بسیار جالب است زیرا بیشتر مطالعه‌های موجود در این زمینه مرحله پروتئین‌زدایی را به مرحله املاح‌زدایی اولویت داده‌اند.

جدول ۵ ـ نتیجه‌های آزمایش استخراج کیتین با تقدم مرحله املاح‌زدایی.

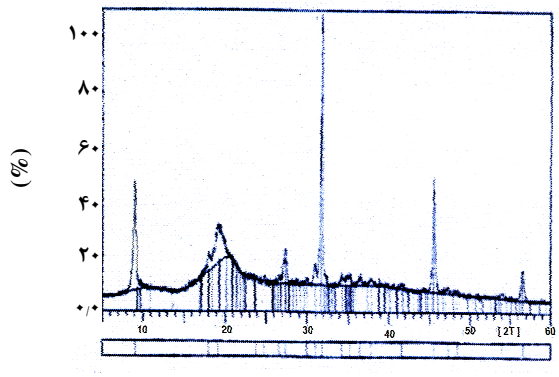
وزن اولیه (g)	وزن پس از املاح‌زدایی (g)	وزن پس از پروتئین‌زدایی (g)
۵	۲/۷	۱/۱
۵	۲/۶	۰/۹
۵	۲/۷	۱/۳

جدول ۶ ـ نتیجه‌های آزمایش استخراج کیتین از پوست میگو با تقدم مرحله پروتئین‌زدایی.

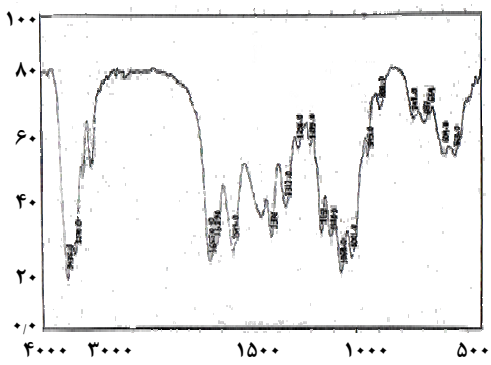
وزن اولیه (g)	وزن پس از املاح‌زدایی (g)	وزن پس از پروتئین‌زدایی (g)
۵	۳/۸	۱/۵
۵	۳/۵	۱/۳
۵	۳/۵	۱/۱



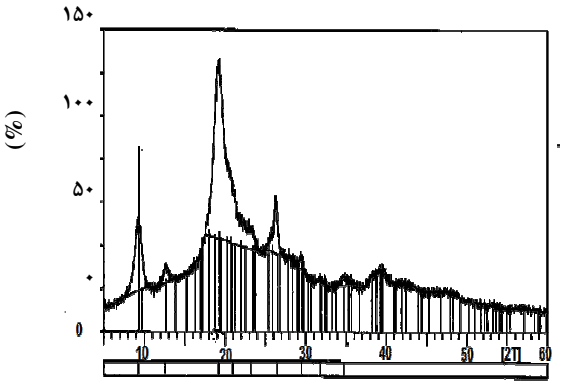
شکل ۲ـ طیف استاندارد کیتین استخراج شده از پوست میگو [۱۵].



شکل ۴ـ طیف XRD پوست میگو خام.



شکل ۳ـ نتیجه آزمایش FT-IR از کیتین استخراج شده در شرایط بهینه.



شکل ۵ ـ طیف XRD کیتین استخراج شده در شرایط بهینه.

در حقیقت این نتیجه با نتیجه به دست آمده توسط *تولا یمیت* و همکاران [۱۱] مطابقت دارد. *تولا یمیت* و همکاران [۱۱] تولید کیتین را از منابع گوناگونی بررسی کردند و نشان دادند که پوست میگو با داشتن حدود ۲۱/۵ درصد وزنی مواد معدنی دارای نسبت بالایی از مواد معدنی می‌باشد. این پژوهشگران همچنین با استفاده از تحلیل مواد معدنی نشان دادند که در زمانی که مرحله پروتئین‌زدایی قبل از مرحله املاح‌زدایی صورت می‌گیرد، مقدار املاح درون پوست همچنان در حد بالایی باقی می‌مانند. این مسأله یعنی کاهش بیشتر املاح با تقدم املاح‌زدایی با توجه به نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش نیز تأیید می‌شود (جداول ۵ و ۶).

نتیجه‌گیری

دو بخش مهم در فرایند استخراج کیتین از پوسته میگو فرایندهای املاح‌زدایی و پروتئین‌زدایی می‌باشد. آزمایش‌های

انجام شده در این پژوهش نشان داد که دما و زمان بهینه در فرایند املاح‌زدایی به ترتیب ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت و دما و زمان اقامت بهینه در فرایند پروتئین‌زدایی به ترتیب ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت می‌باشند. همچنین میزان بهینه غلظت هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید ۳ نرمال تعیین شدند. این پژوهش در پایان نشان داد که به منظور بهبود فرایند باید فرایند املاح‌زدایی پیش از پروتئین‌زدایی صورت پذیرد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۲/۱۳

مراجع

[1] "International Chitin and Chitosan Association", Website: www.Chitin.org.

[2] Ravi Kumar M.N.V. "Chitin and Chitosan for Versatile Applications", Home page, pp. 1-9 (2001).

[3] Mejía-saulés J.E., Waliszewski K.N., Garci M.A., Cruz-Camarillo R, The Use of Crude Shrimp Shell Powder for Chitinase Production by Serratiamarcescens WF., *Food Technol. Biotechnol.,* **44**(1), p. 95 (2006).

[4] Aye K.N., Stevens W.F., Improved Chitin Production by Pretreatment of Shrimp Shells, *J. Chem. Technol. Biotechnol,* **79**, p. 42 (2004).

[5] Teng W.L., Khor E., Tan T.K., Lim L.Y., Tan S.C., Concurrent Production of Chitin from Shrimp Shells and Fungi, *Carbohydr. Res.,* **332**, p. 305 (2001).

[6] Mahmoud N.S., Ghaly A.E., Arab F., Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitinproduction, *Am. J. Biochem. Biotechnol.,* **3**(1), p. 1 (2007)

[7] Synowiecki J., Al-Khateeb N.A., Production, Properties, and Some New Applications of Chitin Andits Derivatives, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* **43**, p. 145 (2003).

[8] Cira L.A., Huerta S., Hall G.M., Shirai K., Pilot Scale Lactic Acid Fermentation of Shrimp Wastes for Chitin Recovery, *Process Biochem.,* **37**, p. 1359 (2002).

[9] Xu Y., Gallert C., Winter J., Chitin Purification from Shrimp Wastes by Microbial Deproteination and Decalcification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **79**(4), p. 687 (2008).

[10] Heu M.S., Kim J.S., Shahidi F., Components and Nutritional Quality of Shrimp Processing Byproducts, *Food Chem.,* **82**, p. 235 (2003).

[11] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A, Contribution to the Preparation of Chitins and Chitosans with Controlled Physico-Chemical Properties, *Polym. J.,* **44**, p. 7939 (2003).

[12] Mukhrejeee D.P., Method for Producing Chitin or Chitosan, U.S. Patent 6310188, (2001).

[13] Muzzarelli R.A.A., Colorimetric Determination of Chitosan, *Anal. Biochem.,* **260**(2), p. 255 (2002).

[14] Somashekar D., Joseph R., A New Spectrophotometric Method of Assay for Chitosanase Based on Calcofluor White Dye Binding, *Carbohydr. Polym.,* **34**, p. 343 (1997).

[15] Muzzarrelli R.A.A. "Chitin", University of Ancona, Italy Pergamon Press., pp. 22-26 (1997).

[16] Hansen M.E., Illans A., "Applications of Grustacean Wastes in Biotechnology", Chapman and Hall, London, UK., pp. 17-205 (1994).

[17] Pichynagkura R., Kudan S., Kuttiyawong K., Sukwattanasinitt M., Aiba S.I., Quantitative Production of 2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucose Fromcrystalline Chitin by Bacterial Chitinase, *Carbohydr. Res.,* **337** (6), p. 557 (2002).

[18] Kurita K., Chemistry and Application of Chitin and Chitosan, *Polym. Degrad. Stab.,* **59**(1), p. 117 (1998).

[19] Mei-Hvei C., Hing-Yuen C., U.S. Patent 6255085 (2001).

[20] Quintin P., Peniston R., U.S. Patent, 3862122 (1975).

[21] Mikalsen G., U.S. Patent, 5210186 ((1993).

[22] Britton G.S., Pfonder L.J., *Arch. Biochem. Biohys Cartonoids.,* **1**, p. 291 (1995).

[23] Tsigos L., Martinou A., Kafetzopoulos D., Bouriotis V., Chitin Deacetylases: New, Versatile Tools in Biotechnology, *Trends Biotechnol,* **18** (7), p. 305 (2000).

[24] Hackman H., Blackwell J., "Chitin and Chitosan and Related Enzymes" Academic Press, New York, p. 257 (1992).

[25] Hiroshi M., Watanabe J., Chiba T., European Patent 0531991 (1998).

[26] Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., Rinaudo, M., An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization, *Polym. J.,* **42**, p. 3569 (2001).

[27] Perry R.H., "Perry's Chemical Engineers' Handbook", 6th Ed., McGraw-Hill, pp. 3-64 (1987).