استخلاص الكيتوسان من قشور سمك الكارب ودراسة خصائصه

رمضان نجم عبد الله الساعدي وحنين عبد الأمير لطيف الأسدي
قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية- كلية علوم الهندسة الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية استخلاص مادة الكيتين والكيتوسان من قشور سمك الكارب كانت نسبة الاستخلاص 55.75% كيتين و3.55% كيتوسان على أساس الوزن الجاف من قشور سمك الكارب. أظهرت دراسة خصائص الكيتوسان إن درجة إزالة الاستلة للكيتوسان القياسي والمستخلص بلغت 82.84 و81.32 على التوالي، وقد بينت نتائج FTIR لنموذجي الكيتوسان مطابقة طيف الامتصاص IR عند حزم 1020,1220 (cm^{-1}) لمجموعة الأمين على ذرة الكاربون رقم 2 لجزيئة glucoseamine فضلا عن مجموعة الأمين بين حزمة 1020,1150 (cm^{-1}) وقد استخدمت نتائج FTIR في حساب درجة إزالة الاستلة بالاعتماد على المعادلة الخطية باستخدام الحزمة 1320، وكانت قيمة الوزن الجزيئي للكيتوسان المستخلص من قشور سمك الكارب 77142.57 دالتون وكيتوسان المقارنة التجاري 1000027 دالتون وكانت من الأوزان الجزيئية العالية. أما نسبة الرطوبة المقدرة للكيتوسان المستخلص والقياسي التجاري 15.50% و14.65% على التوالي والذائبية للكيتوسان المستخلص ونموذج المقارنة التجاري 94.18% و96.85% على التوالي، وكان الرقم الهيدروجيني pH للكيتوسان المستخلص ونموذج المقارنة التجاري 8.2 و8.5 على التوالي.

الكلمات المفتاحية: استخلاص الكيتين والكيتوسان، خصائص الكيتوسان.

e-mail: msc.haneen@yahoo.com, ramdannajim@yahoo.com
Received: 17-4-2018 Accepted: 7-10-2018

Extraction of carp fish chitosan and determination and study of its characteristics

Ramadan Najim Abdullah Al-Saidi and Haneen Abdalameer Lateef Al-Asadi
Department of Food Sciences and Biological Technology
College of Agricultural Engineering Sciences/ University of Baghdad

Abstract

The aim of this study was to extract the chitin and chitosan from carp fish, The percentage of extraction of chitin and chitosan extracted from carp fish peels were 55.75% chitin and 3.55% chitosan depending on dry weight of carp fish peels. The study of chitosan characteristics showed that degree of deacetylation for control sample and extracted chitosan were 82.84%, 81.32% respectively. The result of FTIR for two type of chitosan showed absorption spectrum matching (IR) on 1220, 1020 (cm^{-1}) bands for amide group between 1150, 1020 (cm^{-1}) bands, FTIR result were used for calculation degree of deactylation depending on linear equation by using the band 1320, the molecular weight of extracted chitosan was 77142.57 (Dalton) while the control chitosan was 1000027 (Dalton), and it was from high molecular weight. As for the estimated moisture percentage for extracted chitosan and control were 15.50%, 14.65% respectively, and the Solubility for extracted chitosan and control was 94.18% and 96.85% respectively. The pH for extracted chitosan and control was 8.2 and 8.5 respectively.

Key words: Chitin and chitosan extract, chitosan characteristics

المقدمة

الكيتين Chitin هو أصل الكيتوسان ويوصف على أنه ثاني بوليمر حيوي منتشر في الطبيعة بعد السيليلوز وتم اكتشافه في الأنواع الدنيا من الأحياء كالفطريات والحشرات والقشريات ولم تكتشف في الثدييات لحد الآن (1). الكيتوسان عبارة عن كيتين مزال الاسلة جزئيا N-deacetylated، والكيتين هو من السكريات المتعددة مكونة من وحدات D-glucosamine وN-acetyl-glucosamine مرتبطة بأواصر كلايكوسيدية (4-1)-β، وعندما تكون وحدات D-glucosamine أكثر من وحدات N-acetyl-glucosamine تكون درجة الاسلة (DDA) Dgree of Deacetylation لبوليمر الكيتين أعلى من 50% وإن عملية إزالة الاسلة للكيتين تجعله ذائب في المحاليل الحامضية المخففة وبذلك يتم تكوين الأملاح وتعرف بالكيتوسان Chitosan توزيع وحدات D-glucoseamine وN-acetyl-glucosamine يكون عشوائيا، إذ أن هنالك ثلاثة أنواع من الكيتوسان وهي (α و β و γ) تختلف عن بعضها بترتيب الجزيئات على السلسلة (2). الكيتين (بادئ الكيتوسان) ينتشر بصورة واسعة في الطبيعة بأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية إلى الحيوانات البحرية التي يشكل الكيتين جزءاً من الجدار الخلوي فيها وكذلك في بعض الحيوانات والنباتات كما في الحشرات وأسماك الكارب والروبيان. يتم أنتاج الكيتوسان التجاري من الكيتين المستخلص من فضلات قشور الروبيان وأسماك الكارب والكركند والكريل وهي فضلات منتجة من صناعات الأغذية البحرية وبذلك فأن أنتاجها يعود بمنفعة اقتصادية كبيرة من خلال استخداماتها الصناعية والطبية المفيدة للإنسان(3، 4، 5).

المواد وطرائق العمل

- **تحضير الكيتوسان Chitosan من قشور سمك الكارب:**

- استخلاص الكيتين Chitin من قشور سمك الكارب: تم استخلاص الكيتين من قشور سمك الكارب حسب الطريقة المذكورة من قبل (4) إذ أخذت قشور سمك الكارب وغسلت جيدا ولعدة مرات بعد ذلك جففت للتخلص من الرطوبة الموجودة في القشور وطحنت القشور وعوملت كالآتي:
  - إزالة المعادن Demineralization: حضر محلول 1 مل من حامض الهيدروكلوريك وأضيف إلى قشور السمك بنسبة 1:5 (1غم من مطحون قشور السمك: 5 مل من HCl) لإزالة المعادن الموجودة في قشور سمك الكارب، بعد التحريك والمزج تترك لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 30 مْ ثم تغسل بالماء مزال الأيونات لعدة مرات لإزالة جميع المعادن(6).
  - إزالة الأستلة Deacetylation: حضر محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.5% وخلط بنسبة (1 مل قاعدة: 1غم قشور السمك)، بعد ذلك جفف على درجة حرارة 95مْ لمدة 30 دقيقة، تم الغسل لعدة مرات بالماء المقطر مزال الأيونات وجففت على درجة حرارة 80مْ لمدة 4 ساعات، طحنت ووضعت في حاوية زجاجية(7).

تم حساب نسبة التصافي للكيتين الناتج من قشور سمك الكارب وذلك بوزن الكيتين الناتج وحسب المعادلة الأتية:

$$\text{نسبة التصافي الكيتين\%} = \frac{\text{الوزن الجاف للكيتين}}{\text{الوزن المستخدم من قشور السمك}} \times 100$$

- تحويل الكيتين إلى كيتوسان: بعد الحصول على الكيتين من قشور سمك الكارب حول إلى كيتوسان وحسب الطريقة المتبعة من قبل (8) إذ تم معاملة الكيتين مع 48% من هيدروكسيد الصوديوم لمدة 48 ساعة على درجة حرارة الغرفة 25مْ لإزالة مجاميع الكاربوكسيل والناتج كيتوسان بعد ذلك غسل الناتج بالماء المقطر وجفف.

تم حساب نسبة الكيتوسان الناتج من قشور سمك الكارب وذلك حسب المعادلة الأتية:

$$\text{نسبة التصافي الكيتوسان\%} = \frac{\text{الكيتوسان الجاف}}{\text{الوزن المستخدم من قشور السمك}} \times 100$$

b

a

شكل (1) نسبة استخلاص الكيتين (a) نسبة التصافي للكيتوسان (b)

- **خصائص الكيتوسان**

- درجة إزالة الاستلة Degree of Deacetyltion: تم تشخيص الكيتوسان باستخدام FTIR Fourier Transform Infrared spectrophotometer Shimadzu (Japan) على طول موجي بمدى (400-4000) سم$^{-1}$، تم قياس درجة الأستلة بحسب الطريقة المتبعة من قبل (8)، إذ إن حزمة A_{1320} تمثل المنحنى على الطول الموجي 1320 سم$^{-1}$ والحزمة A_{1420} تمثل المنحنى على الطول الموجي 1420 سم$^{-1}$ ، والحزمة A(1320) تمثل منحنى مجموعة الأمايد amide والحزمة A(1420) تمثل منحنى مجموعة الأمين Amine.

$$DA\% = \frac{(A_{1320}/ A_{1420}) - 0.3822}{0.03133}$$

DDA = درجة إزالة الاستلة % DA = درجة الاستلة %

- تقدير الوزن الجزيئي للكيتوسان Molecular Weight: تم تقدير الوزن الجزيئي للكيتوسان حسب الطريقة المتبعة من قبل (6) بوساطة تقدير لزوجة الكيتوسان باستخدام جهاز اللزوجة Viscometer من محلول الكيتوسان المحضر من تركيز 1 ملغم/ مل من الكيتوسان في محلول 1% حامض الكاليك، التجنيس بوساطة جهاز الهزاز المغناطيسي، قدر معدل اللزوجة باستخدام معادلة Mark-Houwink: $\eta = KM$

η = اللزوجة، M = معدل الوزن الجزيئي، K = ثابت Mark-Houwink الخاص بالبوليمر ($3.5*10^{-4}$)

- **ثالثا:** المحتوى **الرطوبي:** تم تقدير الرطوبة حسب الطريقة المذكورة من قبل (2) وذلك بوزن 2 غم من العينة وجففت في فرن حراري هوائي Air oven بدرجة حرارة 105 مْ لحين ثبات الوزن.

$$\text{الرطوبة\%} = \frac{\text{الفقدان في الوزن}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

- الذائبية **في المحاليل الحامضية للكيتوسان:** اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (9، 10) وذلك بإذابة 0.1 غم من الكيتوسان في 100 مل من 1% حامض الخليك بعد ذلك حركت ومزجت على الهزاز المغناطيسي، ثم رشحت باستخدام المضخة تحت التفريغ، حسبت نسبة الذائبية في المحاليل الحامضية باستخدام المعادلة التالية: الغير ذائب (غم) = الوزن النهائي لورقة الترشيح (غم) – الوزن الابتدائي لورقة الترشيح (غم)

$$\text{غير الذائب\%} = \frac{\text{غير الذائب (غم)}}{\text{وزن النموذج (غم)}} \times 100$$

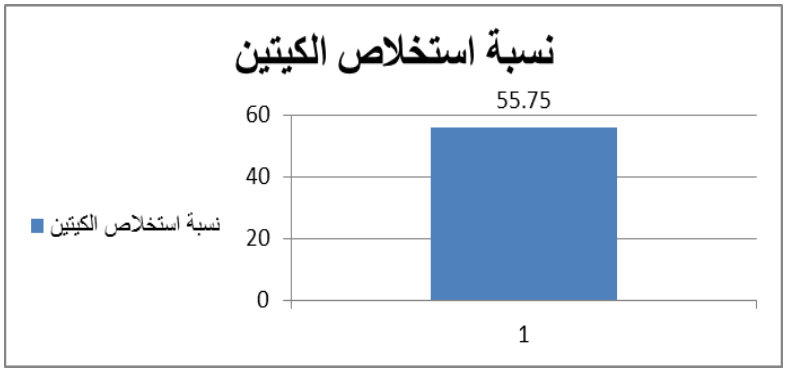
الذائبية% = 100 – غير الذائب%

- تقدير **الرقم الهيدروجيني pH:** أتبعت الطريقة المذكورة من قبل (8) لتقدير الرقم الهيدروجيني باستعمال جهاز pH meter.

– **التحليل الإحصائي:** استعمل البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (2012) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (Least significant difference-LSD).

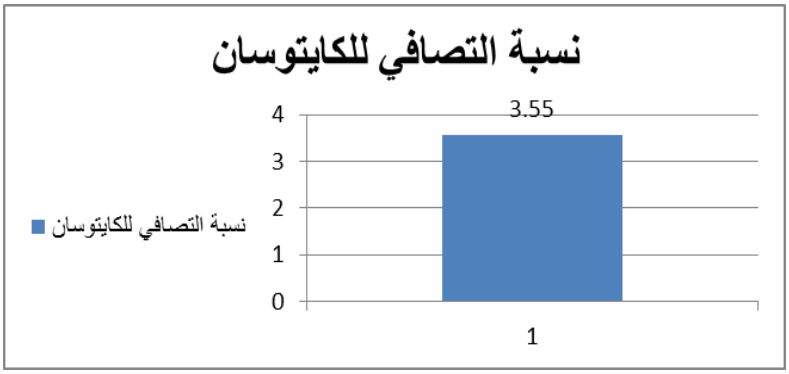
النتائج والمناقشة

– **نسبة الاستخلاص للكيتين:** بينت نتائج عملية استخلاص الكيتين من قشور سمك الكارب كما موضحة في الشكل (2) إن النسبة المئوية للاستخلاص بلغت 55.75% وهذا يتوافق مع ما ذكره (10).



شكل (2) نسبة استخلاص الكيتين من قشور سمك الكارب

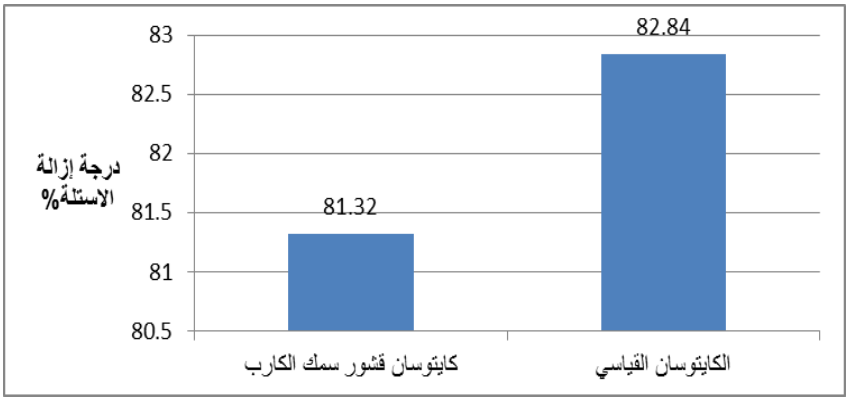
– **نسبة التصافي لكيتوسان قشور سمك الكارب:** بعد عملية الحصول على الكيتين تم تحويله إلى كيتوسان إذ كانت نسبة التصافي للكيتوسان 3.55% من وزن الكيتين كما موضحة في الشكل (3)، وهذا مقارب مع ما وجده (2).



شكل (3) نسبة التصافي لكيتوسان قشور سمك الكارب

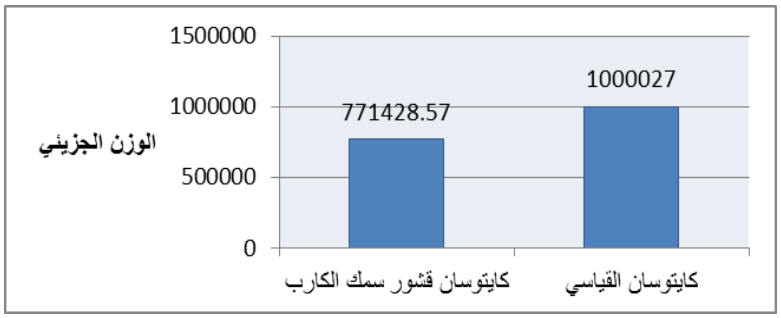
- **خصائص الكيتوسان:**

- **درجة إزالة الاستلة Degree of Deacetylation:** درجة إزالة الاستلة للكيتوسان (DDA) من أكثر العوامل المهمة لتحديد نوعية الكيتوسان المنتج والتي تتأثر بالخصائص الكيميائية والفيزيائية والحيوية للكيتوسان كأدمصاصه لأيونات المعادن في الماء ودرجة إزالة الاستلة يمكن أن تؤثر على خصائص الامتصاصية للماء وهذا مهم في تطبيقات معالجة المياه، والأواصر التساهمية والقابلية على الكبسلة (10) وكذلك تؤثر على الخصائص الحيوية كتطبيقات التضاد الميكروبي، يوضح المقارنة بين طيف FTIR لنموذج الكيتوسان المستخلص من قشور سمك الكارب وبين الكيتوسان التجاري كنموذج قياسي إذ أن امتصاص IR الرئيسي لوحظ بين حزمة 1220 و1020 (cm^{-1}) والتي تعود إلى مجموعة الأمين الحرة ($-NH_2$) على ذرة الكربون رقم C_2 لجزيئة glucoseamine وهذا يدل على أنها المجموعة الرئيسية الموجودة في الكيتوسان، النتائج أظهرت على أن طيف الامتصاص لمجموعة الأمين الحرة الموجودة أيضا بين حزمة 1020 و1159 (cm^{-1}) وهذه النتائج موافقة لما وجده (2)، حزمة IR على 2911 تعود إلى CH_3 وCH_2، أما حزمة 1584 فتعود إلى (C = O Secondary amide−) و1421 تعود إلى (CN Secondary amide−)، لوحظت حزم أخرى على نفس الامتصاصية وهي 3268 و2930 و1563 و1418 و1020 (cm^{-1}) وهذا يؤكد تركيب الكيتوسان. أشار (10) بأن الحزمة على 1597 (cm^{-1}) أعلى كثافة من الحزمة 1655 (cm^{-1}) التي عزيت إلى أن عملية إزالة الاستلة كانت فعالة، درجة إزالة الاستلة تحسب بالاعتماد على المعادلة الخطية باستخدام الحزمة 1320 لمجموعة الأمين بينما حزمة 1400 كانت لمجموعة الأمايد، نسبة الحزمتين A_{1320}/A_{1400} تعطي أخطاء بسيطة وهذا يعتمد على التقنية المستخدمة وحالة المواد. درجة إزالة الاستلة لنموذج الكيتوسان المستخلص من قشور سمك الكارب كانت 81.32% كما موضحة في الشكل (4)، أما درجة إزالة الاستلة للكيتوسان القياسي كانت 82.84%، إذ أشار (11) بأن درجة إزالة الاستلة تتراوح بين % (8.20-85.02) باستخدام الطرق التجارية للاستخلاص وهذا يتوافق مع النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية.



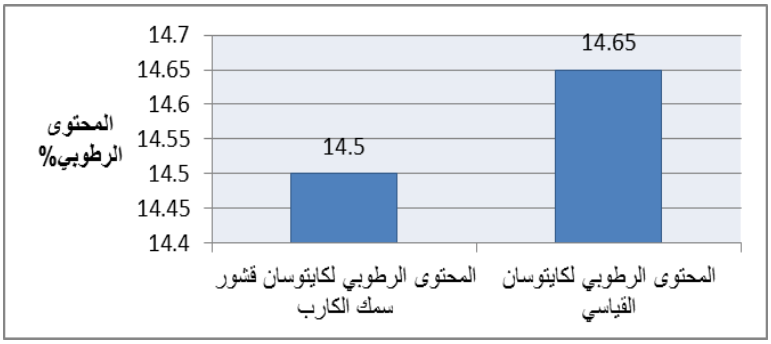
شكل (4) درجة إزالة الاستلة للكيتوسان قشور سمك الكارب والكيتوسان القياسي

- **الوزن الجزيئي للكيتوسان:** أشارت النتائج الخاصة بالوزن الجزيئي للكيتوسان كما موضحة في الشكل (5) بأن قيمة الوزن الجزيئي للكيتوسان المستخلص من قشور سمك الكارب كانت 771428.57 (دالتون) أما الوزن الجزيئي للكيتوسان القياسي فقد كان 1000027 (دالتون) قد يعود هذا التباين إلى أن الوزن الجزيئي يتأثر بقوة القاعدة المستخدمة وهذه النتائج موافقة لما ذكره (10).



شكل (5) الوزن الجزيئي للكيتوسان

- **المحتوى الرطوبي للكيتوسان:** المحتوى الرطوبي هو أحد العوامل التي من الممكن أن تؤثر على نوعية الكيتوسان المنتج، إذ أشارت النتائج المتعلقة بالمحتوى الرطوبي للكيتوسان المستخلص من قشور سمك الكارب كما موضحة في الشكل (6) إلى إن قيمة المحتوى الرطوبي للكيتوسان المستخلص 14.50%، أما المحتوى الرطوبي للكيتوسان القياسي فكان 14.65%.

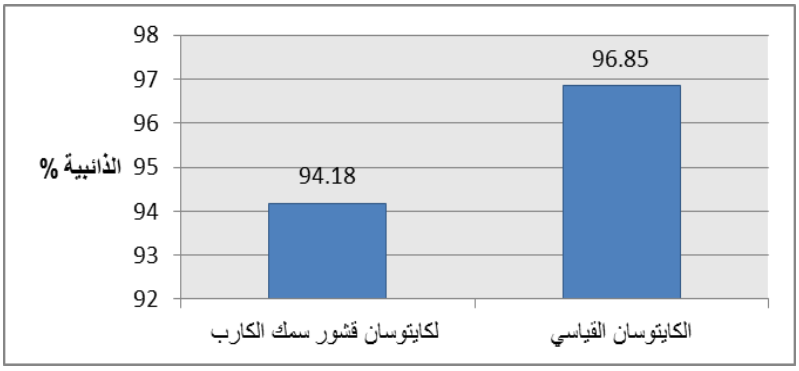


شكل (6) المحتوى الرطوبي للكيتوسان

وهذا يتوافق مع ما وجده (12) الذي أوضح بأن المحتوى الرطوبي لنماذج الكيتين والكيتوسان يجب أن تكون بمدى (10-15)% وهذا يعتمد على تركيز القاعدة المستخدمة في عملية الاستخلاص وكذلك الاختلاف في طرق التجفيف للكيتين والكيتوسان، إن المحتوى الرطوبي العالي في تركيب الكيتوسان يؤدي إلى تحطم سريع للبوليمر بسبب التفاعلات التحليلية (7).

- **ذائبية الكيتوسان:** خصائص الذائبية هي أحد المحددات المهمة لقياس نوعية الكيتوسان، إذ أن الذائبية العالية للكيتوسان تعني بأن المنتج جيد وهذا يرتبط بدرجة إزالة الاسئلة إذ أن الزيادة في الذائبية تعني زيادة في درجة إزالة الاسئلة، بينت النتائج الخاصة بالذائبية للكيتوسان كما موضحة في الشكل (7) بأن ذائبية كيتوسان قشور سمك الكارب كانت 94.18% وتم مقارنتها مع الكيتوسان القياسي إذ كانت الذائبية له 96.85% وهذا يتوافق مع ما وجده (13) إذ أوضح بأن ذائبية الكيتوسان كانت 97.92%، يوجد الكيتوسان بصورة معقد وهذا يجعله من الصعب أن يذاب بالماء، لكن المحاليل القاعدية هي أكثر المذيبات العضوية الشائعة لإذابة الكيتوسان وذلك لأنها تجعل الكيتوسان بروتوني وهذا يؤدي إلى زيادة الذائبية كما موضح في المعادلة التالية:

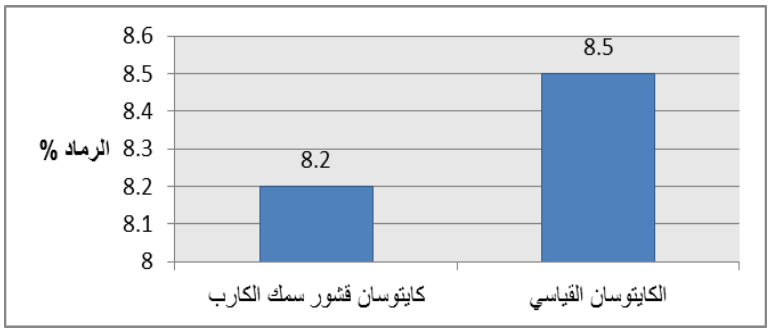
$$-NH_2 + H_2O \longleftrightarrow NH_3 + OH^-$$



شكل (7) الذائبية للكيتوسان

كلما زادت درجة الاستلة ازدادت الذائبية نتيجة إزالة مجموعة acetyl من الكيتين أثناء عملية إزالة الاستلة وبقاء مجموعة amine فقط التي تحتوي على أيونات الهيدروجين التي تجعل الكيتوسان سهل التفاعل مع الماء من خلال الأواصر الهيدروجينية، بالإضافة إلى ذلك فأن مجموعة الكاربوكسيل الموجودة في حامض الخليك تسهل من إذابة الكيتوسان بالماء نتيجة التفاعلات الهيدروجينية بين مجاميع الكاربوكسيل لحامض الخليك ومجاميع الأمين للكيتوسان (13).

- **الرقم الهيدروجيني pH:** بينت النتائج للرقم الهيدروجيني للكيتوسان الموضحة في الشكل (8) إذ إن قيمة الرقم الهيدروجيني لكيتوسان قشور سمك الكارب كانت 8.2، أما الكيتوسان القياسي فكانت 8.5، وهذا يتوافق مع ما وجده (10).



شكل (8) الرقم الهيدروجيني pH للكيتوسان

المصادر

1. Elieh-Ali- Komi, D. & Hamblin, M. R. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. Int. J. Adv. Res. (Indore), 4(3): 411-427.
2. Ahing, F. A. & Wid, N. (2016). Extraction and characterization of chitosan from shrimp shell waste in Sabah. Trans. Sci. Technol., 3 (1-2): 227-237
3. Lee, C. G.; Da Silva, C. A.; Lee, J. Y.; Hartl, D. & Elias, J. A. (2008). Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. Curr. Opin. Immunol., 20(6):684-689.
4. Boarin- Alcalde, L. & Graciano-Fonseca, G. (2016). Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales. Lat. Am. J. Aquat. Res., 44(4): 683-688.
5. Thillai Natarajan, N.; Kalyanasundaram, N. & Ravi, S. (2017). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Achatinodes. Nat. Prod. Chem. Res., 5(5): 1- 4.
6. Santos, C.; Seabra, P.; Veleirinho, B.; Delgadillo, I & Lopes da Silva, J. A. (2006). Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. Europ. Polymer J.,42(12):3277-3285.

7. Viljoen, J. M.; Steenekamp, J. H.; Marais, A. F. & Kotze, A. F. (2014). Effect of moisture content, temperature and exposure time on the physical stability of chitosan powder and tablets. Drug Dev. Ind. Pharm., 40(6): 730-742.
8. Islam, M.; Masum, S.; Mahbubur Rahmana, M.; Molla, A. I.; Shaikh, A. A. & Roy, S. K. (2011). Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties. International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS, 11(1): 77-80.
9. Pillai, C. K. S.; Paul, W. & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. Progress in Polymer Science 34(7): 641-678.
10. Puvvada, Y. S.; Vankayalapati, S. & Sukhavasi, S. (2012). Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. Int. Curr. Pharm. J., 1(9): 258-263.
11. Nouri, M.; Khodaiyan, F.; Razavi, S. H. & Mousavi, M. (2016). Improvement of chitosan production from persian gulf shrimp waste by response surface methodology. Food Hydrocolloids, 59: 50- 58.
12. Szymanska, E. & Winnicka, K. (2015). Stability of Chitosan-A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. Mar. Drugs, 13(4): 1819-1846.
13. Hossain, M. S. & Iqbal, A. (2014). Production and characterization of chitosan from Shrimp Waste. J. Bangladesh Agril. Univ., 12(1): 153-160.