

ارزیابی خصوصیات کیفی کیتوزان تولیدی از پوسته میگو و کیتوزان تجاری پوسته خرچنگ

مرضیه موسوی نسب^۱، سحرالسادات موسوی نسب^۲، غلامرضا مصباحی^{۳*}،
جلال جمالیان^۴

۱- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و گروه پژوهشی فراوری آبزیان دانشگاه شیراز

۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۳- استادیار بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۴- استاد بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۸)

چکیده

هدف از این پژوهش، تولید کیتوزان از کیتین مربوط به پوسته میگوی محلی و مقایسه خصوصیات کیفی آن با کیتوزان تجاری تهیه شده از پوسته خرچنگ بود. در اولین مرحله، پوسته های میگوی خلیج فارس آماده سازی شد و توسط عملیات کانی زدایی، پروتئین زدایی و رنگبری از آن ها، کیتوزان تولید شد. آنگاه توسط عملیات دی استیلاسیون بر روی کیتین، ماده کیتوزان حاصل گردید. از کیتوزان تولیدی، نمونه های فیلم تهیه شد و ضخامت و عبورپذیری بخار از آن ها اندازه گیری و با فیلم های حاصل از کیتوزان تجاری، مقایسه شد. همچنین، ترکیبات شیمیایی (رطوبت، خاکستر و پروتئین)، درجه دی استیلاسیون، ظرفیت باند کردن آب، ظرفیت باند کردن چربی و رنگ نمونه های کیتوزان تولیدی مشخص شد و با نمونه های کیتوزان تجاری مقایسه شد. نتایج نشان داد که راندمان تولید کیتوزان در حد قابل قبول (۱۹/۴۳ درصد) بود. از دیدگاه شیمیایی، کیتوزان تولیدی حاوی ناخالصی های پروتئین و خاکستر کمتر، درجه دی استیلاسیون کمتر، ظرفیت باند کردن آب بالاتر و ظرفیت باند کردن چربی بالاتر نسبت به کیتوزان تجاری بود. نمونه های فیلم تهیه شده از کیتوزان تولیدی در مقایسه با فیلم های تهیه شده از کیتوزان تجاری، حد کمتری از عبور پذیری بخار را نشان دادند. همچنین، کیتوزان تولیدی از نظر فاکتور روشنایی رنگ، بالاتر از کیتوزان تجاری بود. در مجموع می توان نتیجه گیری کرد که تولید کیتوزان با کیفیت مناسب از پوسته ها و ضایعات میگوی محلی، امکان پذیر است، لذا می توان تولید آنرا به کارخانه های تولید و بسته بندی میگو ایران توصیه کرد.

کلید واژگان: کیتوزان، ویژگی های کیفی، فیلم خوراکی، ضایعات سخت پوستان، دی استیلاسیون

۱- مقدمه

اخیراً، ارزش تجاری کیتین به دلیل خصوصیات مفید مشتقات قابل حل آن که مناسب در علم شیمی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، فرآیند غذا، مواد آرایشی، دامپزشکی، پزشکی، دندانپزشکی، حفاظت محیط و تولید کاغذ یا نساجی می باشد افزایش یافته است [۱]. متأسفانه هنوز در کشور ما با وجود منابع اولیه برای تولید این ماده و مشتقات ارزشمند آن مانند کیتوزان، این کار در ابعاد صنعتی صورت نگرفته است که یکی از دلایل آن کمبود اطلاعات از خصوصیات کیفی و عملکردی آنها است.

بعد از سلولز، کیتین بیشترین پلی ساکارید طبیعی در زمین است که در سخت پوستان، نرم تنان، دیاتومه های دریازی، حشرات مانند پروانه ها و کفش دوزک ها، دیواره سلولی جلبک ها، قارچ ها و مخمرها به علاوه اسکلت خارجی گونه های زوپلانکتون های دریایی، شامل مرجان ها و ماهی های ژله ای یافت می شود [۱ و ۲]. ضایعات بدست آمده در طی فرآیند خرچنگ، میگو و صدف ها شامل ۷۵ درصد از وزن کل سخت پوستان است. در حال حاضر مقدار کمی از ضایعات پوسته برای غذای حیوانات یا استخراج کیتین استفاده می شود [۱].

کیتوزان یک کوپلیمر از 2-Amino-2-deoxy-D- (glucosamine) و 2-Acetamido-2- deoxy-D-glucose (N-acetyl glucosamine) است که بوسیله N- دی استیلاسیون کیتین از ضایعات خرچنگ و میگو تهیه می شود [۳]. این امر در شرایط مختلف دما (۸۰ تا ۱۴۰°C) و زمان (تا ۱۰ ساعت) با استفاده از محلول های هیدروکسید سدیم و پتاسیم غلیظ (۳۰ تا ۶۰ درصد w/v) انجام می گیرد. غلظت قلیا و زمان و دمای فرآیند به علت تأثیرات آن بر درجه دی استیله شدن، وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی به علاوه توزیع واحدهای دی استیله در طول زنجیره پلی ساکارید باید دقیقاً کنترل شود [۱].

تقاضاهای رو به افزایش مصرف کنندگان برای کیفیت بهتر و تازگی محصولات غذایی موجب پیشرفت و به کار بردن فیلم های خوراکی شده است. فیلم های خوراکی یا پوشش های خوراکی مصرفی در بسته بندی مواد غذایی، به عنوان یک شبکه پیوسته هستند که می توانند از پروتئین ها، پلی ساکاریدها و لیپیدها تهیه شوند. استفاده از فیلم های خوراکی از موادی مانند کیتوزان به حفظ کیفیت محصول، افزودن خصوصیات حسی، بهبود ایمنی محصول و افزایش عمر ماندگاری انواع محصولات غذایی آماده مصرف کمک می کند [۴].

کیتوزان به دلیل توانایی تشکیل فیلم بدون هر گونه افزودنی، دارای قابلیت استفاده برای بسته بندی یا پوشش دادن است. فیلم کیتوزان دارای نفوذپذیری اکسیژن و دی اکسید کربن کمتر از فیلم پلی اتیلن و دارای خواص مکانیکی خوبی است که قابل مقایسه با بسیاری از پلیمر های تجاری نیمه مستحکم می باشد [۵، ۶ و ۷].

هدف از این پژوهش تولید کیتوزان از پوسته میگوی بوشهر به عنوان یکی از ضایعات کارخانه های عمل آوری و بسته بندی ایران و مقایسه کیفیت آن با کیتوزان تجاری وارداتی، به منظور ایجاد زمینه برای تولید صنعتی این ماده ارزشمند و پرکاربرد در ایران می باشد.

Mahmoud و همکاران (۲۰۰۷) از اسیدهای آلی (لاکتیک و استیک) تهیه شده از تخمیر آب پنیر برای کانی زدایی پوسته میگوی پروتئین زدایی شده به روش میکروبی استفاده کردند. تأثیرات نوع اسید، شرایط کانی زدایی، زمان و نسبت پوسته ها به اسید توسط آنها بررسی شد. نتایج نشان دادند که تأثیر استفاده از اسیدهای لاکتیک و یا استیک برای کانی زدایی پوسته های میگو قابل مقایسه با استفاده از هیدروکلریک اسید است [۸].

Shahidi و Synowiecki (۱۹۹۱) فرآورده های ثانویه پوسته نوعی میگو و خرچنگ را جداسازی و اندازه گیری نمودند. در این بررسی درصد کیتین بدست آمده از پوسته خرچنگ و میگو بر مبنای وزن خشک بین ۱۷ تا ۳۲/۲ درصد و مقدار رنگدانه های کاروتنوئیدی استحصالی بین ۳/۴ تا ۱۴/۷

1. Molluscs
2. Marine diatoms

۲-۱- استخراج کیتین و تولید کیتوزان

۲-۱-۱- آماده سازی پوسته های میگو برای تولید

کیتوزان

از پوسته های جدا شده از میگوها جهت استخراج کیتین استفاده شد. بعد از شستشوی پوسته میگو با مقدار کافی آب، آنها را در دمای 60°C به مدت ۲ ساعت خشک کرده و توسط آسیاب به قطعات یکنواختی تبدیل شدند. عملیات استخراج در بیش از ۱۴ ساعت و طی مراحل زیر انجام شد.

۲-۱-۲- کانی زدایی

محلول لاکتیک اسید ($75/6 \text{ g L}^{-1}$) بوسیله $73/54$ میلی لیتر لاکتیک اسید ۸۵ درصد (w/w) با رساندن حجم به 1000 میلی لیتر با آب مقطر تهیه شد و سپس کانی زدایی پوسته میگو با آن انجام گرفت. عملیات کانی زدایی طبق روش به کار رفته توسط Ghanem و همکاران (۲۰۰۳) که توسط Mahmoud و همکاران (۲۰۰۷) تغییر داده شده است، انجام گردید. بدین منظور یک گرم از پوسته با 30 میلی لیتر لاکتیک اسید مخلوط شد و در دمای اتاق (24°C) برای ۶ ساعت هم زده، سپس صاف گردید و با مقدار کافی آب مقطر شسته شد تا به pH خنثی رسید [۸ و ۱۲].

۲-۱-۳- پروتئین زدایی

از محلول هیدروکسید سدیم ۲ مولار استفاده شد و به مدت ۶ ساعت با نسبت یک گرم پوسته با 20 میلی محلول سود در دمای حدود 80°C هم زده شد.

۲-۱-۴- رنگ بری

کیتین کانی زدایی و پروتئین زدایی شده در 20 حجم استون برای 30 دقیقه نگه داشته شد و سپس با آب مقطر شستشو داده و خشک گردید. در پایان این مرحله کیتین با خلوص بالا بدست آمد [۳].

۲-۱-۵- دی استیلاسیون

دی استیلاسیون طبق روش No و همکاران (۲۰۰۰) با کمی تغییر، به منظور تولید کیتوزان از کیتین استخراج شده بوسیله محلول هیدروکسید سدیم ۵۰ درصد w/w درون اتوکلاو با دمای 121°C و فشار ۱۵ psi (30 ml g^{-1} از نمونه) به مدت

میلی گرم در 100 گرم پوسته بود. راندمان استحصال کیتین و رنگدانه های کاروتنوئیدی به ترتیب ۸۶ و ۷۴ درصد بود [۹].
Khanafari و همکاران (۲۰۰۸) کیتین و کیتوزان را از ضایعات میگوی *Penaeus semisulcatus* جمع آوری شده از یک مرکز فرآیند میگو در منطقه خلیج فارس در جنوب ایران بوسیله روش های شیمیایی و میکروبی استخراج کردند. کیتین و کیتوزان بوسیله تیمار اسید-قلیا استخراج شدند و بازده ها به ترتیب ۵۱۰ و 410 mg/g بودند. روش استخراج شیمیایی شامل استفاده از محلول هیدروکسید سدیم و استیک اسید بود [۱۰].

Al Sagheer و همکاران (۲۰۰۹)، کیتین به فرم α و β را از چند نوع سخت پوست دریایی خلیج فارس استخراج کردند. در این تحقیق محتوای اسکلت های خارجی مختلف و درصد نمک غیر آلی (شامل عناصر مختلف)، پروتئین و کیتین مشخص شد. دی استیله کردن محصولات کیتین متفاوت بوسیله روش های سنتی گرم کردن حرارتی و مایکروویو انجام شد. کیتین و کیتوزان بدست آمده بوسیله آنالیز عنصری، XRD^۱، NMR و FTIR^۲ و وزن سنجی حرارتی^۳ بررسی شدند [۱۱].

در تحقیق دیگری که توسط محققین ایرانی صورت گرفت، Tajik و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که کیتوزان تأثیر ضد باکتریایی قویتری در مقابل باکتری های G^{+} نسبت به باکتری های G^{-} دارد [۲].

۲- مواد و روش ها

میگوی کامل با نام علمی *Penaeus semisulcatus* مربوط به خلیج فارس، از مرکز پخش محصولات دریایی بوشهر خریداری شد، زمان صید میگوهای مذکور در اوایل فصل پاییز و اندازه آنها متوسط بود. کیتوزان تجاری (تهیه شده از پوسته خرچنگ) از نوع دارای وزن ملکولی بالا بوده و از شرکت Sigma آمریکا تهیه گردید.

1. X-ray Powder Diffractometry (XRD)
2. Fourier Transform IR Spectroscopy (FTIR)
3. Thermogravimetric

کرده و توسط سیلیکا ژل جذب شد، که میزان آن از طریق افزایش وزن سل مشخص گردید. از یک پنکه با سرعت ۶۰ دور در دقیقه برای حفظ جریان هوای ثابت و فشار بخار آب یکنواخت درون محفظه دستگاه استفاده شد. سل ها در هر ۱ ساعت در طی ۸ ساعت توزین شدند و منحنی افزایش وزن در مقابل زمان بوسیله رگرسیون خطی بدست آمد [۵]. سپس میزان سرعت نفوذپذیری بخار آب (WVPR)، $(\text{gH}_2\text{O}/(\text{s.m}^2))$ و نفوذپذیری بخار آب (WVP)، $(\text{gH}_2\text{O}/(\text{m.s.Pa}))$ از رابطه های زیر بدست آمد [۱۶].

$$WVPR = \frac{k}{A} \quad (1) \text{ معادله}$$

$$WVP = \frac{WVPR \times d}{p_1 - p_2} \quad (2) \text{ معادله}$$

k - ثابت رگرسیون خطی بدست آمده از مقادیر از دست دادن جرم در مقابل زمان است.

A - سطح نفوذپذیری

d - میانگین ضخامت فیلم

$p_1 - p_2$ - اختلاف فشار جزئی در دو طرف فیلم (از طریق

جدول بخار اشباع [۱۷])

۲-۲-۲- اندازه گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین

کیتوزان

روش بیوره [۱۸] برای اندازه گیری میزان پروتئین محلول و همچنین اندازه گیری رطوبت و خاکستر نیز برای نمونه های پوسته، کیتین، کیتوزان تولید شده و کیتوزان تجاری با استفاده از روش AOAC (۲۰۰۲) انجام گرفت [۱۹].

۲-۲-۳- درجه دی استیلاسیون کیتوزان

در این آزمون برای تعیین درجه دی استیله بودن از روش FTIR استفاده شد. مقدار ۱۵ mg از پودر نمونه با مقدار کافی از پودر KBr مخلوط و تحت فشار قرار گرفت و یک قرص به ضخامت ۲ میلی متر تهیه شد. سپس با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز (اسپکترومتر BRUCKER، مدل EQUINOX55، آلمان) مورد بررسی قرار گرفت [۲۰]. Moore و Roberts (۱۹۷۸)، معادله زیر را برای تعیین درجه استیله بودن کیتوزان استفاده کردند [۲۱].

۲ ساعت انجام گرفت و سپس صاف کرده و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شسته و در 60°C به مدت ۸ ساعت خشک شد [۱۳]. در این مرحله بازده تولید کیتین و کیتوزان تولیدی با توجه به میزان پوسته میگوی اولیه مصرفی، تعیین شد.

۲-۲-۲- آزمایشات مربوط به کیتوزان

۲-۲-۲-۱- تهیه فیلم از کیتوزان

برای تهیه محلول کیتوزان ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد (w/v)، به میزان کافی از کیتوزان تولید شده و کیتوزان تجاری را در ۳۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد (v/v) استیک اسید در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت با همزن مغناطیسی هم زده تا حل شود. محلول درون ظرف در بندی شده به مدت چند ساعت نگه داشته شد تا گازها خارج شده و از ایجاد حباب در فیلم جلوگیری شود. سپس محلول را روی یک پلیت پلاستیکی مسطح با مساحت مشخص پخش گردید تا محلول به طور یکنواخت تا حاشیه های پلیت رسید. فیلم ها در دمای محیط تا حدود ۳۰ ساعت خشک گردیدند [۱۴].

۲-۲-۲-۱-۱- تعیین ضخامت فیلم

ضخامت فیلم ها بوسیله میکرومتر پس از به تعادل رسیدن در دمای 27°C و رطوبت نسبی ۶۰ درصد با اندازه گیری ۵ قسمت مختلف از فیلم انجام گرفت.

۲-۲-۲-۱-۲- نفوذپذیری فیلم به بخار آب

پیش از انجام آزمون نفوذپذیری طبق روش استاندارد-D618 ASTM 61 عمل متعادل سازی رطوبت^۱ در رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دمای $27 \pm 2^\circ\text{C}$ با قرار دادن فیلم ها در دسیکاتور حاوی محلول فوق اشباع $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ به مدت ۷۲ ساعت یا بیشتر انجام گرفت [۱۵].

فیلم ها در بالای سل های فلزی حاوی سیلیکا ژل ($\text{RH} = \%$) که قبلاً با قرار گرفتن در آن 150°C به مدت ۲۴ ساعت فعال شده) بسته شده و درون محفظه دستگاه در دمای 25°C و رطوبت نسبی ۶۰٪ با استفاده از محلول فوق اشباع $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ قرار داده شد. آب از میان فیلم ها عبور

1. Conditioning

۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش گردیدند. آنالیز بوسیله برنامه بسته آماری SPSS13 با استفاده از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از روش های آماری ANOVA و T-Test انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- بازده تولید کیتین و کیتوزان

در این تحقیق، بازده تولید کیتین از پوسته حدود ۲۸/۳۶٪ و بازده تولید کیتوزان از پوسته ۱۹/۴۳٪ و بازده تولید کیتوزان از کیتین ۷۴/۸۱٪ بود. Yen و همکاران (۲۰۰۹) بازده تولید کیتوزان را حدود ۳۲/۲-۳۰٪ از پوسته خرچنگ بدست آوردند. Abdou و همکاران (۲۰۰۸) درصد کیتین را از ضایعات میگو حدود ۲۳-۲۱٪ گزارش کردند. بازده تولید کیتین از پوسته سیست آرتیمیا حدود ۳۴/۵-۲۹٪ و بازده تولید کیتوزان ۲۳-۱۹٪ بود [۲۵]. پوسته سخت پوستان اساساً از ۳۰ تا ۴۰ درصد پروتئین، ۳۰ تا ۵۰ درصد نمک های معدنی و ۱۳ تا ۴۲ درصد کیتین تشکیل شده است. محتوای کیتین در ماده خشک ضایعات فرآیند خرچنگ ۱۳ تا ۲۶ درصد است که کمتر از ضایعات میگو (۱۴ تا ۴۲ درصد) و کریل (۳۴ تا ۴۹ درصد) بوده و *Artemia uremiana* که نوعی میگوی آب شور است دارای مقدار کیتین مشابه با کریل می باشد [۱ و ۲].

۲-۳- اندازه گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین

پوسته، کیتین و کیتوزان

درصد ترکیبات تشکیل دهنده پوسته، کیتین، کیتوزان تولیدی و کیتوزان تجاری در جدول ۱ گزارش شده است. محتوای مواد معدنی کل در پوسته های میگوی استفاده شده در این تحقیق ۳۰/۹۶٪ بود. این مقدار در محدوده ۵۰-۳۰٪ گزارش شده توسط Synowiecki و Al-Khateeb (۲۰۰۳) است [۱]. مقادیر ناخالصی پروتئین و خاکستر در کیتوزان تهیه شده در این تحقیق بسیار کمتر از کیتوزان تجاری بود. Tajik

$$DA = [(A_{1655}/A_{3350}) \times 100/1/33] \quad (3) \text{ معادله}$$

منحنی استاندارد با رسم نسبت A_{1655}/A_{3350} در مقابل درجه استیله بودن بدست آمد. بدین صورت که نسبت A_{1655}/A_{3350} برای کیتوزان کاملاً استیله ۱/۳۳ و برای کیتوزان کاملاً دی استیله صفر در نظر گرفته شد و میزان استیله بودن کیتوزان تجاری (۲۵٪) نیز مشخص بود [۲۲]. با استفاده از این سه نقطه، منحنی استاندارد و فرمول آن بدست آمد و با قرار دادن نسبت A_{1655}/A_{3350} نمونه های کیتین و کیتوزان تولیدی در فرمول حاصل، میزان استیله بودن آنها تعیین شد. در آخر برای محاسبه درجه دی استله بودن نمونه ها، میزان استیله بودن را از ۱۰۰ کم شد.

۲-۲-۴- ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان

تیوب سانتریفوژ حاوی ۰/۵ گرم نمونه بعلاوه ۱۰ میلی لیتر آب یا روغن زیتون را وزن کرده و روی یک مخلوط کن گردابی برای یک دقیقه مخلوط گردید و سپس در دمای محیط برای ۳۰ دقیقه نگهداری شد به طوری که هر ۱۰ دقیقه برای ۵ ثانیه تکان داده شد. آنگاه در سرعت ۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع فوقانی را خارج کرده و تیوب دوباره وزن گردید [۱۳].

ظرفیت باند کردن آب^۱ = گرم آب باند شده تقسیم بر گرم وزن نمونه $\times 100$

ظرفیت باند کردن چربی^۲ = گرم چربی باند شده تقسیم بر گرم وزن نمونه $\times 100$

۲-۲-۵- ارزیابی رنگ کیتوزان

بررسی رنگ نمونه ها با اندازه گیری شاخص های رنگ L^* ، a^* ، b^* و اندیس روشنایی (WI) بوسیله عکسبرداری با دوربین دیجیتال و به کمک نرم افزار فتوشاپ در مقایسه با کیتوزان تجاری انجام شد [۲۳ و ۲۴].

$$WI = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2} \quad (4) \text{ معادله}$$

1. Water binding capacity (WBC)
2. Fat binding capacity (FBC)

استفاده از اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک برای فرآیند کانی زدایی که در این پژوهش نیز از آن استفاده شد یک ایده نوید بخش است، زیرا اسیدهای آلی که توسط باکتری ها تولید شده و صدمات کمتری به محیط زیست زده و می توانند خصوصیات کیتین خالص سازی شده را حفظ کرده و باعث تولید نمک های آلی از فرآیند کانی زدایی شود که می تواند به عنوان عوامل ضد یخ^۲ سازگار با محیط و یا نگهدارنده ها استفاده شوند. لاکتیک اسید با ترکیبات کلسیم واکنش داده و باعث تشکیل لاکتات کلسیم می شود که رسوب کرده و با شست و شو جدا می شود [۱۰].

۳-۳- نفوذپذیری بخار آب

در شکل ۱ مشاهده می شود که نفوذ پذیری بخار آب (WVP) در فیلم های تهیه شده از هر دو نوع کیتوزان با افزایش غلظت، افزایش می یابد. همچنین ملاحظه می شود که نفوذ پذیری بخار آب (WVP) در فیلم های تهیه شده از کیتوزان تولیدی در تمامی غلظت ها، کمتر از نمونه کیتوزان تجاری بود، البته اختلاف بین نفوذپذیری بخار آب در فیلم حاصل از دو نوع کیتوزان تنها در غلظت محلول ۰.۲٪ حالت معنی دار داشت که در این غلظت این میزان $g/hr.m.KPa$ ۴/۴۹۶ در مقابل $g/hr.m.KPa$ ۷/۴۱۵ در کیتوزان تجاری بود. طبق گزارش Sathivel و همکاران (۲۰۰۷)، فیلم ۰.۱ × کیتوزان نفوذپذیری بخار آب حدود $g.m/m^2.Pa.s$ 10^{-1} داشت [۲۹]. نفوذ پذیری بخار آب در فیلم ۰.۱٪ کیتوزان با درجه دی استیلاسیون ۰.۶۰/۹ حدود $g.mm/kPa.h.m^2$ ۰/۹ گزارش شد [۸]. در تحقیق Xu و همکاران (۲۰۰۵)، سرعت انتقال بخار آب فیلم ۰.۲٪ کیتوزان حدود $g/m^2.h$ ۵۲/۷۳ بود [۳۰]. نفوذپذیری بخار آب غلظت های ۱ تا ۰.۲٪ فیلم کیتوزان در تحقیق Casariego و همکاران (۲۰۰۷) از $g/m.day.atm$ ۰/۳۳۱ بدست آمد [۵].

همکاران (۲۰۰۸)، میزان رطوبت، پروتئین و خاکستر کیتوزان تجاری سیگما را به ترتیب ۳/۵، ۸/۳ و ۱/۱۸٪ گزارش دادند [۲]. میزان ترکیبات پوسته میگوی *Penaeus semisulcatus* گزارش شده توسط Al Sagheer و همکاران (۲۰۰۹)، حدود ۳۷/۵۹٪ پروتئین، ۴۵/۶۶٪ کربنات کلسیم و ۱۶/۷۵٪ کیتین بود. با توجه به ترکیبات اندازه گیری شده در پوسته میگو، میزان پروتئین و خاکستر در کیتین بدست آمده بسیار کم بوده و همچنین در طی عملیات دی استیله کردن کیتین، مقدار پروتئین بیشتر کاهش یافت و کیتوزان تولید شده بسیار خالص تر از کیتوزان تجاری می باشد و نشان می دهد که مراحل کانی زدایی و پروتئین زدایی به خوبی انجام شده اند. از آنجایی که کیتوزان یک پلیمر جذب کننده رطوبت^۱ است، امکان دارد که نمونه ها در طی نگهداری رطوبت جذب کنند [۱۱].

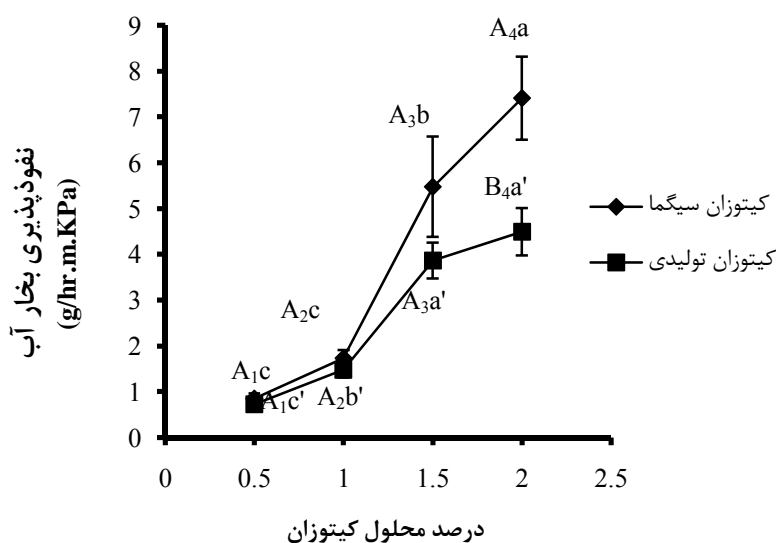
طبق اظهارات Allan و همکاران (۱۹۷۸)، روش معمول استفاده از اسیدهای قوی باعث می شود این فرآیند برای محیط زیست نا مطلوب بوده و منبع آلودگی شود [۲۶]. همچنین این روش باعث کاهش درجه پروتئین زدایی و همچنین کیفیت کیتین می شود [۲۷ و ۲۸]. استفاده از اسید کلریدیک برای کانی زدایی پوسته باعث تأثیرات زیان بخشی بر وزن مولکولی و درجه استیلاسیون شده که عامل منفی در خصوصیات ظاهری کیتین خالص سازی شده است.

جدول ۱ درصد ترکیبات تشکیل دهنده پوسته، کیتین و کیتوزان

نمونه	٪رطوبت	٪پروتئین	٪خاکستر
پوسته	۴/۱۵ ^c ± ۰/۶۴	۳۱/۱۶ ^a ± ۰/۷۱	۳۰/۹۶ ^a ± ۰/۶۴
کیتین	۳/۶۲ ^c ± ۰/۲۹	۲/۳۷ ^b ± ۰/۰۲	۰/۳۷ ^{bc} ± ۰/۰۳
کیتوزان تولیدی	۶/۰۴ ^b ± ۰/۲۰	۰/۰۲ ^c ± ۰/۰۲	۰/۳۳ ^c ± ۰/۱۱
کیتوزان سیگما	۱۰/۰۷ ^a ± ۰/۴۶	۰/۵۴ ^c ± ۰/۰۹	۰/۹۹ ^b ± ۰/۱۰

* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده ها

در هر ستون می باشد ($p < 0.05$)



شکل ۱ نفوذپذیری فیلم های کیتوزان در برابر بخار آب در دمای ۲۷°C

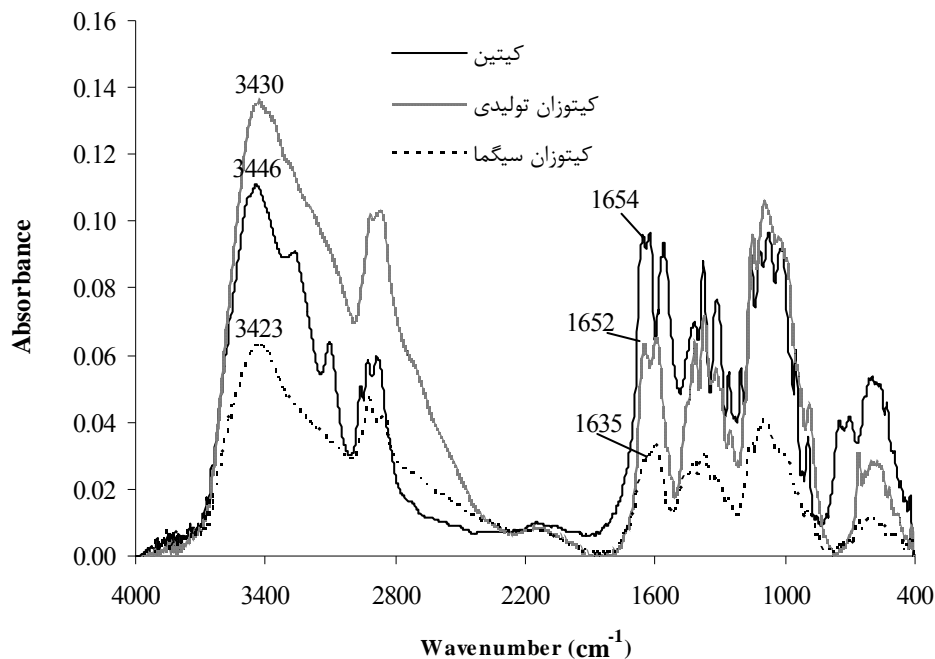
* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده‌ها در غلظت های مختلف هر نوع کیتوزان است و حروف بزرگ متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده ها در دو نوع کیتوزان در یک غلظت خاص می‌باشد ($p < 0.05$)

گیرتر است و به طور کلی با نمونه کیتوزان تجاری تفاوت معنی داری دارد.

۳-۴- درجه دی استیلاسیون کیتوزان

پیک های پهن مشخص شده در شکل ۲ در محدوده ۳۴۴۶-۳۴۲۳ cm^{-1} مربوط به OH stretching است. پیک کوچک در محدوده ۱۶۵۴-۱۶۳۵ cm^{-1} به دلیل C=O stretching (آمید نوع I) است که این دو پیک برای تعیین میزان درجه استیله بودن کیتوزان در نظر گرفته شد [۲۲]. با توجه به منحنی های مادون قرمز بدست آمده و این که درجه دی استیلاسیون کیتوزان تجاری ۷۵٪ است، درصد دی استیله بودن کیتوزان و کیتین تولیدی به ترتیب ۶۸/۳۸ و ۳۸/۲٪ بود. منحنی های کیتین و کیتوزان و پیک های مشخص شده در آنها بسیار مشابه با گزارش Al Sagheer و همکاران (۲۰۰۹) برای نمونه α -*Peneaus semisulcatus* می باشد [۱۱].

کاهش سرعت انتقال بخار آب در فیلم می تواند مربوط به آبگریزی کیتوزان به دلیل حضور گروه های استیل آبگریز در ساختار کیتوزان باشد که به طور کامل دی استیله نشده است. گروه های استیل باقیمانده نقش خود را در ممانعت از انتقال بخار آب بازی می کنند [۳۱]. از آنجایی که یک وظیفه اصلی برای بسته بندی غذا، اغلب جلوگیری یا کاهش تبادل رطوبت بین غذا و اتمسفر اطرافش است، لذا مقدار فاکتور WVP در فیلم مورد استفاده در بسته بندی باید تا حد ممکن، کم باشد [۳۲]. زمانیکه اثر غلظت محلول کیتوزان بر میزان WVP در فیلم های تولید شده از آن بررسی می شود، تفاوت معنی داری بین فیلم با بالاترین غلظت و دیگر غلظت ها مشاهده می شود. برخی تحقیقات بیان می کنند که فیلم های هیدروفیل، اغلب دارای رابطه مستقیم بین ضخامت و WVP هستند [۳۳]. هرچه ضخامت و درصد کیتوزان بیشتر شود، مقدار WVP در فیلم نیز بیشتر می شود [۵]. در این تحقیق کمتر بودن میزان نفوذ پذیری فیلم کیتوزان تولیدی در غلظت ۲٪ بسیار چشم



شکل ۲ طیف FTIR نمونه های کیتین و کیتوزان تولیدی و کیتوزان سیگما

همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که ظرفیت باند کردن چربی کیتوزان به ترتیب ۵۳۵-۳۱۴٪ و ۴۰۳-۲۱۷٪ است [۱۳ و ۳۵]. Cho و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که ظرفیت باند کردن آب و چربی رابطه مستقیمی با میزان خاکستر و رابطه معکوس با دانسیته حجمی دارند [۳۵].

جدول ۲ درصد ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان

نمونه	ظرفیت باند کردن آب	ظرفیت باند کردن چربی
کیتوزان تولیدی	۷۰۲/۵ ^{a*} ± ۱۷/۳۵	۵۶۴/۵۷ ^a ± ۷/۴۶
کیتوزان سیگما	۴۶۹/۲۴ ^b ± ۱۱/۴۴	۴۴۶/۳۱ ^b ± ۲۴/۵۹

* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده‌ها در هر ستون می‌باشد ($p < 0.05$)

۳-۶- ارزیابی رنگ کیتوزان

از نظر رنگ ظاهری، کیتوزان تولید شده به صورت یک پودر سفید بود، در حالی که کیتوزان تجاری پودری کرم رنگ بود. میزان فاکتور روشنایی (L^*) و اندیس روشنایی (WI) مربوط به پودر کیتوزان تولیدی و محلول ۲٪ آن بیشتر از کیتوزان تجاری و نشان دهنده رنگ بری مطلوب در نمونه های کیتین تولیدی است (شکل ۳ و ۴). فاکتور a^* (قرمز-سبز) و b^* (زرد-

۳-۵- ظرفیت باند کردن آب و چربی

با توجه به جدول ۲ ظرفیت باند کردن آب و چربی نمونه کیتوزان تولیدی به صورت معنی داری بالاتر از کیتوزان تجاری بود. طبق گزارش Rout (۲۰۰۱) ظرفیت باند کردن آب (WBC) برای کیتوزان بین ۵۸۱ تا ۱۱۵۰٪ با میانگین ۷۰۲٪ است [۳۴]. Cho و همکاران (۱۹۹۸) و No و همکاران (۲۰۰۰) ظرفیت باند کردن آب را حدود ۶۱۱-۳۵۵٪ را گزارش دادند [۱۳ و ۳۵]. ظرفیت باند کردن آب کیتوزان تجاری سیگما ۵۳۵٪ بود [۲]. No و همکاران (۲۰۰۳) گزارش دادند که خصوصیات فیزیکوشیمیایی کیتین و کیتوزان بر خواص عملکردی آنها اثر می‌گذارد و بر اساس گونه‌ها و شرایط تولید متفاوتند. افزایش در ظرفیت باند کردن آب در کیتوزان زمانی دیده می‌شود که کانی زدایی قبل از پروتئین زدایی و بعد از آن دی استیلاسیون انجام گیرد، در حالی که اگر پروتئین زدایی قبل از کانی زدایی انجام گیرد، افزایش در ظرفیت باند کردن آب ایجاد نمی‌شود [۱۳]. طبق گزارش Tajik و همکاران (۲۰۰۸) ظرفیت باند کردن چربی کیتوزان تجاری سیگما ۴۷۱٪ بود [۲]. Cho و همکاران (۱۹۹۸) و No و

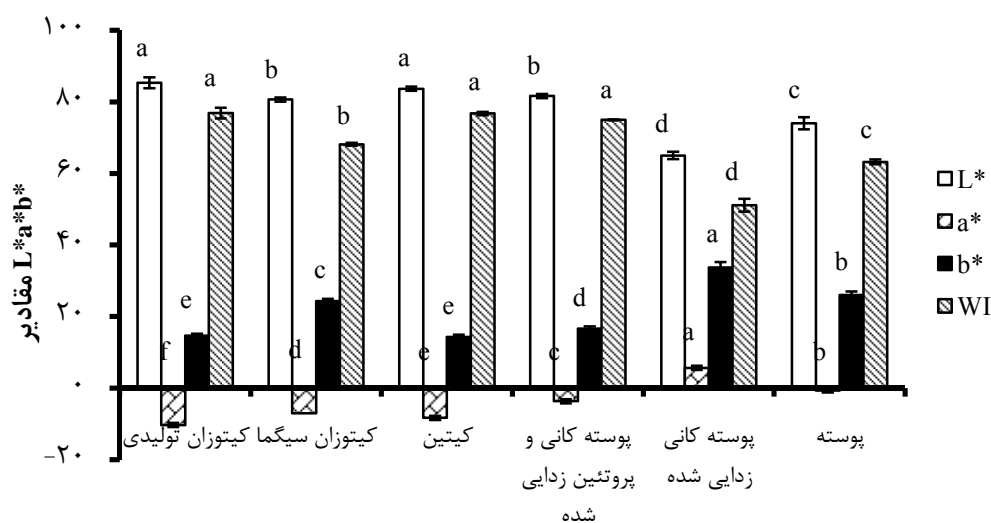
نتایج آزمایشات بر روی کیتوزان تولیدی نشان داد که سرعت نفوذپذیری بخار آب در چهار غلظت مختلف محلول فیلم (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲٪) کمتر از کیتوزان تجاری و به خصوص در غلظت ۲٪ که میزان آن برای کیتوزان تولیدی و تجاری به ترتیب $4/496 \text{ g/hr.m.KPa}$ و $7/415$ بود، لذا از این جنبه فیلم حاصل از کیتوزان تولیدی در مقایسه با نمونه تجاری برتری داشت.

میزان درجه دی استیله بودن کیتوزان تولیدی، کمی کمتر از کیتوزان تجاری (۷۵٪) و حدود $68/38$ ٪ بدست آمد. در کیتوزان تولیدی فاکتورهای مهمی مانند ظرفیت باند کردن آب $702/498$ ٪ و چربی $564/572$ ٪ و در کیتوزان تجاری به ترتیب $469/235$ ٪ و $446/312$ ٪ بود. همچنین کیتوزان تولیدی دارای رنگ سفید و شفاف بوده و اندیس روشنایی پودر و محلول آن به ترتیب $76/83$ ٪ و $82/28$ ٪ بیشتر از کیتوزان تجاری با رنگ قهوه ای کم رنگ ($68/14$ ٪ و $63/31$ ٪) می باشد. بنابراین در مجموع، کیتوزان تولیدی از پوسته میگو از خصوصیات کیفی مناسبی برخوردار بود، لذا با توجه به وجود کارخانه های تهیه و بسته بندی میگو، بخصوص در مناطق جنوبی ایران، می توان تولید صنعتی کیتوزان را به عنوان یک محصول جانبی آنها مطرح ساخت.

آبی) در کیتوزان تولیدی بسیار کمتر از کیتوزان تجاری است. به طور کلی فاکتورهای رنگ در پودر و محلول کیتوزان تولیدی بسیار کم و روشنایی آن بسیار بیشتر از کیتوزان تجاری بوده و دارای ظاهر بهتری بود و همچنین محلول کاملاً شفاف و بی رنگی را تولید کرد. طبق گزارش Yen و همکاران (۲۰۰۹)، فاکتورهای L^* ، a^* ، b^* و WI کیتوزان تولیدی از پوسته خرچنگ به ترتیب $62/4$ ، $1/1$ ، $14/7$ و $59/6$ و برای نمونه کیتوزان تجاری سیگما به ترتیب $60/2$ ، $2/2$ ، $11/4$ و $58/6$ بود [۲۳]. کاهش مقادیر L^* و اندیس روشنایی و همچنین افزایش قرمزی و زردی در نمونه های پوسته کانی زدایی شده نشان دهنده تیره تر شدن رنگ پوسته ها پس از این عملیات می باشد و پس از پروتئین زدایی به دلیل جدا شدن بسیاری از کاروتنوئیدها، فاکتورهای روشنایی افزایش و رنگ کاهش یافته است.

۴- نتیجه گیری نهایی

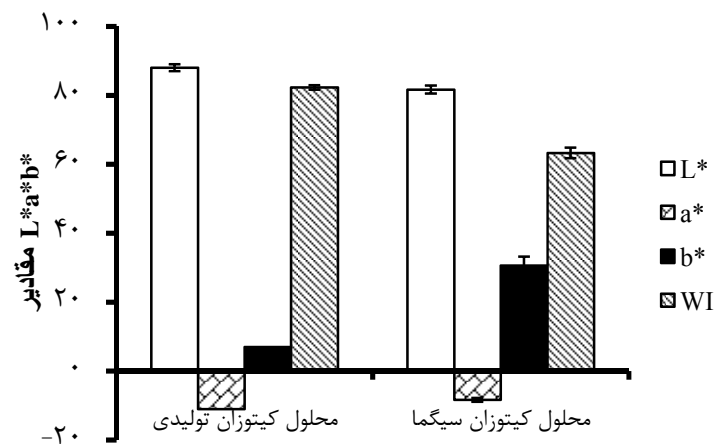
در این تحقیق برای تولید کیتوزان از پوسته میگو ابتدا از لاکتیک اسید برای کانی زدایی استفاده شد و سپس پروتئین زدایی با محلول هیدروکسید سدیم انجام گرفت و در آخر رنگ بری با استون انجام شد. به منظور تولید کیتوزان، از محلول غلیظ هیدروکسید سدیم استفاده گردید.



شکل ۳ پارامترهای رنگ پودر پوسته میگو، کیتین و کیتوزان

* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده ها در هر نمونه

می باشد ($p < 0.05$)



شکل ۴ پارامترهای رنگ محلول ۲٪ کیتوزان

* حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی دار میان داده‌ها در هر نمونه می‌باشد ($p < 0.05$)

۵- منابع

- [6] Suyatma, N.E., Copinet, A., Tighzert, L., and Coma, V. (2004). Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. *Journal of Polymers and the Environment*, 12(1):1-6.
- [7] Ziani, Kh., Osés, J., Coma V., and Mate, J.I. (2008). Effect of presence of glycerol and tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT- Food Science and Technology*, 41:2159-2165.
- [8] Mahmoud, N.S., Ghaly, A.E., and Arab, F. (2007). Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(1):1-9.
- [9] Shahidi, F., and Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value added products from crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 39:1527-1532.
- [10] Khanafari, A., Marandi, R., and Sanatei, S. (2008). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal Environmental Health Science and Engineering*, 5(1):19-24.
- [11] Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., and Elsabee, M.Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77:410-419.
- [12] Ghanem, A., Ghaly, A.E., and Chaulk, M. (2003). Effect of shrimp processing procedures on the quality and quantity of extracted chitin from the shells of northern
- [1] Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 43(2):145-171.
- [2] Tajik, H., Moradi, M., Razavi Rohani, S.M., Erfani, A.M., and Shokouhi Sabet Jalali, F. (2008). Preparation of chitosan from brine shrimp (*Artemia uremiana*) cyst shells and effects of different chemical processing sequences on the physicochemical and functional properties of the product. *Molecules*, 13:1263-1274.
- [3] Kamil, J.Y.V.A., Jeon, Y.J., and Shahidi, F. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79:69-77.
- [4] Beverly, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatkula, W., and No, H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25:534-537.
- [5] Casariego, A., Souza, B.W.S., Vicente, A.A., Texeira, J.A., Cruz, L., and Diaz, R. (2007). Chitosan coating surface and permeation properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentration-application to vegetables. *CIGR Section VI International Symposium on Food and Agricultural Products; Processing and Innovations*, pp:1-16.

- [24] Yam, K.L., and Papadakis, S.E. (2004). A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces, *Journal of Food Engineering*, 61:137-142.
- [25] Abdou, E.S., Nagy, K.S.A., and Elsabee, M.Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99:1359-1367.
- [26] Allan G.G., Fox J.R., and Kong, N. (1978). Marine polymers. Part 8: a critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. *Processing International Conference of Chitin and Chitosan*, 1:64-78.
- [27] Hansen, M.E., and Illanes, A. (1994). Applications of Crustacean Wastes in Biotechnology. In *Fisheries Processing: Biotechnological Applications*, Ed. Martin, A.M., London, UK: Chapman and Hall.
- [28] Simpson, B.K., Gagne, N., and Simpson, M.V. (1994). Bioprocessing of chitin and chitosan. In: Martin AM (ed) *Fisheries processing: biotechnological applications*. Chapman and Hall, London., 155-173.
- [29] Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., and Prinyawiwatkul, W. (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 83:366-373.
- [30] Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A., and Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film; preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21:185-192.
- [31] Bangeykan, C., Aht-Ong, D., and Srikulkit, K. (2006). Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 63:61-71.
- [32] Nathalie Gontard, S.G.J.L.C.U.Q. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57(1):190-195.
- [33] McHugh, T.H., Avena-Bustillos, R., and Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4):899-903.
- [34] Rout, S.K. (2001). Physicochemical, functional, and spectroscopic analysis of crawfish chitin and chitosan as affected by process modification. Dissertation. Louisiana State University: Baton Rouge, LA, USA.
- [35] Cho, Y.I., No, H.K., and Meyers, S.P. (1998). Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:3839-3843.
- shrimp *Pandalus borealis*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12:63-79.
- [13] No, H.K., Cho, Y.I., Kim, H.R., and Meyers, S.P. (2000). Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121°C. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(6):2625-2627.
- [14] Kittur, F.S., Kumar, K.R., and Tharanathan, R.N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206:44-47.
- [15] Bourtoom, T., and Chinnan, M.S. (2008). Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food Science and Technology*, 41:1633-1641.
- [16] Zhong, Q.P., and Xia, W.S. (2008). Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 46(3):262-269.
- [17] Singh, R.P., and Heldman, D.R. (2001). *Introduction to food engineering*. New York: Academic Press.
- [18] Reinhold, J.G. (1953). Total protein, albumin, and globulin in standard methods in clinical chemistry. Ed. M. Reiner, Academic Press, N.Y. Vol. I, p:88.
- [19] AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemistry, 17th ed. The Association of Official Analytical Chemistry Inc; Washington, DC.
- [20] Moosavi-Nasab, M., Taherian, A., Bakhtiyari, M., Farahnaky, A., and Askari, H. (2010). Structural and rheological properties of succinoglycan biogums made from low-quality date syrup or sucrose using *Agrobacterium radiobacter* inoculation. *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-010-0407-4.
- [21] Moore, G.K., and Roberts, G.A.F. (1978). Studies on the acetylation of chitosan. In Muzzarelli, R.A.A., and Pariser, E. P. (Eds.), *Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan* Cambridge, Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, pp:421-429.
- [22] Kasaai, M.R. (2008). Calculation of viscometric constants, hydrodynamic volume, polymer-solvent interaction parameter, and expansion factor for three polysaccharides with different chain conformations. *Carbohydrate Research*, 343:2266-2277.
- [23] Yen, M.T. Yang, J.H., and Mau, J.L. (2009). Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate and Polymer*, 75:15-21.

Qualitative properties evaluation of the produced chitosan From shrimp shell and commercial chitosan of crab shell

Moosavi-Nasab, M. ^{1*}, Moosavi-Nasab, S, A. ², Mesbahi, G. ³, Jamalian, J. ⁴

1. Associate Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University and Seafood Processing Research Group, Shiraz University
 2. Former Msc. Student of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University
 3. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University
 4. Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University
- (Received: 91/8/23 Accepted: 91/12/8)

The aim of this study was production of chitosan from chitin of local shrimp shell and comparison its qualitative properties with commercial chitosan which has been produced by crab shell. In the first step, the shells of Persian Gulf shrimps were prepared and chitin was produced from them by demineralization, deproteinization and discoloration treatments. Then, chitosan was obtained by deacetylation of the chitin. Film samples were prepared by the chitosan and their thickness and water vapor permeability (WVP) were determined and compared with the commercial chitosan. Also, chemical composition (moisture, ash and protein), degree of deacetylation, water binding capacity, fat binding capacity and color of the produced chitosan samples were determined and compared with the commercial chitosan. The results showed that the chitosan production yield was acceptable (%19.43). In view of the chemical properties, the produced chitosan had lower protein and ash impurities, lower degree of deacetylation, higher water binding capacity and higher fat binding capacity than the commercial chitosan. The prepared film samples of the produced chitosan showed lower water vapor permeability (WVP) than the commercial ones. Also, the produced chitosan had more color lightness than the commercial chitosan. Overall, it can be concluded that it is possible to produce suitable quality chitosan by shells and waste of local shrimp, therefore, the shrimp production and shrimp packaging factories of Iran can be proposed to produce chitosan.

Keywords: Chitosan, Qualitative properties, Edible films, Crustaceans waste, Deacetylation

* Corresponding Author E-Mail Address: mesbahi@shirazu.ac.ir