جایگزینی فن‌آوری زیستی به‌جای روش‌های شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان

Replacement Biotechnology Instead of Chemical Methods to Convert Chitin Into Chitosan

یوسفعلی اسدپور اوصالو[1*]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲۲

چکیده

کیتین وکیتوزان دو فرآورده بسیار مهم از پلیمرهای زیستی هستند که در صنایع مصارف بسیار بالایی در صنایع ارزشمند دارند. تبدیل کیتین به کیتوزان با روش استیل‌زدایی و به شیوه ذوب قلیایی است که بدون حضور اکسیژن انجام می‌شود. تغییر ساختار شیمیایی، آلودگی شدید محیط‌زیست و دپلیمریزاسیون از مشکلات اساسی در صنعت تولید کیتوزان با کیفیت بالا می‌باشند. در این پژوهش برای تبدیل کیتین به کیتوزان به‌جای مواد شیمیایی از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* سویه (ATHUM-10864)، مولد آنزیم داستیلاز استفاده شد. کیفیت کیتوزان با آنالیزهای تجزیه عنصری دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، تعیین وزن مولکولی، درصد بلوری شدن، رنگ و ساختار مولکولی مشخص شد. نتایج نشان داد که بازده تبدیل کیتین به کیتوزان یا به‌عبارتی درجه استیل‌زدائی، در این روش ۵±۸۰ درصد است. کیتوزان حاصل دارای ۴۴/۴ درصد کربن، ۸/۹ درصد نیتروژن، ۷/۲ درصد هیدروژن و ۳۹/۵ درصد اکسیژن بود. مختصات فیزیکی آن شامل درصد بلورینگی ۹۴/۵ و رنگ آن قهوه‌ای کمرنگ بود و ساختارشیمیایی هر واحد کیتوزان به‌صورت ($C_6H_{12}NO_4$) به‌دست آمد. نتایج نشان داد که جایگزینی روش‌های زیستی به‌جای شیمیایی در دستیابی به این فرآورده با کیفیت مناسبی امکان‌پذیر بوده و موجب حذف استفاده از مواد شیمیایی مخرب محیط‌زیست نظیر هیدروکسیدسدیم غلیظ می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *آرتمیا اورمیانا*، سیست، کیتین، کیتوزان، *آسپرژیلوس نایجر*

*: استادیار، بخش زیست فناوری مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران (Email: dr.asadpour@outlook.com)

مقدمه

کیتوزان با فرمول شیمیایی ($C_6H_{12}NO_4$) و با نام علمی پلی (بتا-(۱←۴)-۲-آمینو-۲ دی اکسی- D- گلوکوپیرانوز)، پس از حذف گروه استیل از کیتین حاصل می‌شود. این ماده برای اولین بار از یک نوع قارچ از خانواده موکور توسط تارت استخراج و شناسایی گردید. در این قارچ کیتین به‌صورت آنزیمی به کیتوزان تبدیل می‌شود *کینپیکسو* (Knapczyk, 1993). کیتوزان از پلی‌ساکاریدهای ازت داری است که با واکنش استیل‌زدائی کیتین به‌صورت طبیعی ایجاد می‌شود. در این پدیده گروه N– استیل موجود بر روی کربن شماره دو کیتین به گروه آمین (NH2 -) تبدیل می‌شود. کیتوزان، یک بیوپلیمر طبیعی با خواص فیزیکی و شیمیایی کاملاً متفاوت از کیتین است *اراکی* و *ایتو* (Araki and Ito, 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 *چارلز* (Charles, 2011). برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کیتوزان شامل داشتن خاصیت انبساط و کشیدگی شدید، دارا بودن قدرت پالایش بیولوژیکی در طبیعت، غیرسمی و غیرحساسیت‌زا بودن، خاصیت ضدویروسی و ضدباکتریایی، امکان تشکیل ترکیبات پیچیده با یون‌های فلزی و هیدروکربورهای آروماتیکی، خاصیت ژله‌ای شدن، قدرت بالا در جذب مواد رنگی، ابر جاذب بودن و قابلیت فوق‌العاده برای تبدیل به مواد و مشتقات متعدد در شرایط مختلف است که این خصوصیات باعث شده که بیشتر از ۳۰۰ مورد کاربرد از آن‌ها در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، آرایشی، غذایی، تولیدات گیاهی، پالایش آب، پزشکی، کاغذسازی، پالایش فلزات‌سنگین، تغذیه حیوانات، صنایع شیمیایی، نساجی، تولید فیبر و پرتوزدایی به ثبت برسد *تهامی* و *تهامی* (Tahami and Tahami, 1994). کیتوزان به‌دست آمده از مواد خام مختلف از نظر ساختار شیمیایی و فیزیکی متفاوت بوده و با توجه به نوع منبع اولیه و نحوه فرآوری تا حدودی از نظر خواص، عملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهند *شهیدی* و *اترکی* (Shahidi and Arachechi, 2010). از عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمر، عدم دست‌یابی به ماده اولیه دایمی و فراوان و مشکلات ناشی از افت کیفیت درضمن استخراج با روش‌های شیمیایی است هن و همکاران (Hein *et al.*, 2001). همه ساله درخصوص بهینه‌سازی روش‌های عمل‌آوری و بررسی امکان دست‌یابی به روش‌های تازه در استخراج کیتوزان تحقیقات فراوانی صورت می‌پذیرد *پبردی* (Peberdy, 2010). در این تحقیق برای دست‌یابی به فن‌آوری نوین زیستی، کیتین مستخرج از پوسته سیست آرتمیا برای اولین بار با روش ریستی و با استفاده از آنزیم قارچی داستیلاز مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت. هدف تحقیق جایگزین فن‌آوری زیستی استیل‌زدائی از کیتین به‌جای روش شیمیایی است که درضمن مشکل آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از تخلیه پساب ماده شیمیایی هیدروکسید سدیم غلیظ در طبیعت که درحین تولید پیش می‌آید نیز برطرف می‌شود.

مواد وروش‌ها

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 استیل‌زدایی را مشخص می‌نماید. در این پژوهش برای تعیین گروه‌های آمین از رابطه N- acetylation% = $(A_{1655}/A_{3450})\times 115$ استفاده شد *پارک* و همکاران (Park *et al.*, 2000). در این رابطه حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{3450} گروه استیل و حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{1655} گروه آمین تعیین شد و براساس محور عمودی طیف‌سنجی FTIR، به‌صورت لگاریتمی مورد محاسبه قرار گرفت.

روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان

انجام این مرحله شامل تهیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مولد آنزیم طبیعی داستیلاز، کشت اولیه در محیط‌کشت عمومی قارچ، کشت اسلانت برای تعیین و تست مشخصات قارچ، استخراج آنزیم، انجام عمل استیل‌زدایی با محیط‌کشت حاوی آنزیم داسیتیلاز قارچی و در نهایت انجام آنالیزهای تشخیص کیفی و کمی کیتوزان حاصله می‌باشد.

تهیه و کشت اولیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر*

قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مولد آنزیم داستیلاز با شماره کد ATCC 10864 از کلکسیون قارچی گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی- مهندسی دانشگاه تربیت مدرس به‌صورت کشت اسلانت مادر تهیه گردید. برای انجام کشت اولیه از محیط‌کشت عمومی بیولایف (Potato Dextrose Agar) استفاده شد. مقدار ۱۰ گرم از این محیط‌کشت در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و در دمای ۱۲۱°C به‌مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد و به پلیت‌ها منتقل گردید. پس از رسیدن به دمای موردنظر مقدار یک سانتی‌مترمربع از اسپورهای اسلانت مادر به محیط‌کشت منتقل و به‌مدت سه روز در دمای ۳۵°C گرماگذاری شد سیمپسون و همکاران (Simpson *et al.*, 2000). به‌علت خطرناک بودن امکان گسترش اسپورهای قارچی در محیط آزمایشگاهی، محیط‌های کشت حاوی قارچ هیچ‌گاه در هوای آزاد قرار نگرفت.

کشت انبوه قارچ برای استیل‌زدایی

برای تهیه محیط‌کشت انبوه قارچ *آسپرژیلوس* که با تولید آنزیم داستیلاز عمل استیل‌زدائی کیتین را انجام می‌دهد، از محیط‌کشت اختصاصی این قارچ شامل پپتون یک درصد، عصاره مالت دو درصد، گلوکز دو درصد، منیزیم سولفات آبدار دو درصد و عصاره مخمر سه درصد در یک لیتر آب مقطر استفاده شد. میزان یک سانتی‌مترمربع از کشت روز سوم پلیت قارچ به یک لیتر محیط‌کشت اختصاصی مایع آن تلقیح گشته و سپس به‌مدت ۴۸ ساعت به‌منظور امکان رشد سریع‌تر و تولید آنزیم بیشتر در دمای ۳۵°C در شیکر- انکوباتور، گرماگذاری شد (*سیمپسون* و همکاران، 2000). پس از پایان مدت گرماگذاری، برای استخراج و خالص‌سازی نمونه‌ها، آنزیم‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شده و با ۱۰ میلی‌لیتر استات سدیم مخلوط گردیدند. محصول به‌دست آمده با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. مایع فوقانی حاصله از سانتریفیوژ جدا گردیده و مقدار ۲۰ گرم از پودر کیتین استخراجی از پوسته سیست آرتمیا با روش زیستی، به آن اضافه شد. مخلوط نهایی در دمای ۳۵°C به‌مدت ۲۴ ساعت دیگر در شیکر- انکوباتور با دور ۱۸۰ در دقیقه قرار داده شد. محصول نهایی پس از جداسازی، چند بار با آب مقطر کاملاً شستشو داده شده و در نهایت به‌مدت ۴ ساعت در آون دمای ۸۰°C خشک گردید *پینادو* و *پسترانا* (Pinado and Pastrana, 2011).

روش تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوزان حاصله با روش زیستی

برای تعیین درجه استیل‌زدایی یعنی تبدیل گروه‌های استیل به گروه‌های آمین، از تغییرات باندهای جذبی گروه‌های مذکور در طیف FTIR آن‌ها استفاده شد. ابتدا تغییرات مربوط به پیک‌های A_{1655} و A_{3450} اندازه‌گیری شده و درادامه از طریق رابطه مایا و دیوید یعنی معادله $N\text{-acetylation}\% = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115$، درجه استیل‌زدایی کیتوزان محاسبه گردید *مایا* و *داویس* (Maya and Davis, 1992).

روش آزمایش تجزیه عنصری (CHNO-analyser)

نمونه‌ها با دستگاه تجزیه عنصری مدل ABB-Bomem مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفتند. برای این منظور یک گرم از نمونه در دمای ۸۰°C خشک و هموژنیزه گردید. سپس نمونه آماده شده در ظرف مخصوص دستگاه از جنس قلع، قرار گرفته و درصد عناصر آن با دستگاه مشخص شد (*چارلز*، 2011).

روش طیف‌سنجی مادون قرمز

طیف‌سنجی مادون قرمز با دستگاه ABB-Bomem انجام شد. برای انجام این آنالیز ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از نمونه با پودر برمید پتاسیم مخلوط گشته و در هاون چینی دستی ساییده شد، تا هموژنیزه شود. سپس با کمک دستگاه پرس‌کننده مخصوص به‌صورت صفحات شفاف به ضخامت ۰/۲۵ میلی‌متری آماده‌سازی شد. سپس نمونه‌ها در دستگاه قرار گرفته و پس از تنظیمات اولیه مورد آنالیز طیف‌سنجی قرار گرفتند (*چارلز*، 2011).

روش پرتونگاری با اشعه ایکس

طیف‌سنجی با پراش پرتوهای ایکس، پس از آماده‌سازی نمونه به‌صورت قرص‌های ۴ میلی‌متری انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا مقدار ۳ گرم از کیتین حاصله کاملاً در آون در دمای ۸۰°C به‌مدت ۲ ساعت خشک گردید. سپس نمونه‌ها تا اندازه ۲۵ میکرومتر با دستگاه آسیاب شده و پودر حاصله با نیم گرم پودر اسیدبوریک به‌عنوان نگهدارنده و مقدار یک گرم موم سی به‌عنوان ماده هم‌بند بخوبی مخلوط گردید. مخلوط حاصله به‌وسیله دستگاه پرس و قالب‌گیر مخصوص به‌صورت قرص‌های ۴ میلی‌متری آماده گشته و به دستگاه طیف‌سنج XRD منتقل شد و مورد تجزیه و طیف‌گیری قرار گرفت *کلس* (Claus, 2000).

روش گرانروی‌سنجی (ویسکومتری)

تعیین گرانروی کیتوزان استخراج شده توسط دستگاه ویسکومتر، پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تنظیمات دستگاه، انجام شد. حلال مورد استفاده در این روش محلول دی متیل استامید با پنج درصد لیتیم کلراید (LiClDMAC-5%) بود (چارلز، 2011).

روش تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی کیتین براساس معادله مارک- هوینگ (1998) $[\eta] = KM_V^{\alpha}$ تعیین شد. در این معادله $[\eta]$ گرانروی و K و α ضرایبی هستند که به وزن مولکولی بستگی ندارند. حلال مورد استفاده برای کیتوزان پوسته سیست در این روش محلول دی متیل استامید به همراه پنج درصد لیتیم کلراید بود که میزان $K = 1.4\times10^{-2}$ و $\alpha = 0.8$ تعیین گردید. در این معادله K ضریب ثابت تفکیک یونی و آلفا ضریب ثابت مارک-هوینگ حلال مصرفی می‌باشند، که مقادیر آن‌ها از جدول مارک- هوینگ به‌دست می‌آید (*هن* و همکاران، 2001).

نتایج

با استفاده از عصاره از آنزیم قارچ *آسپرژیلوس* سویه (ATHUM-10864)، مولد آنزیم داستیلاز، به همراه ۲۰ گرم از پودر کیتین در نهایت مقدار۱± ۱۵ گرم کیتوزان به‌دست آمد. راندمان

محصول در این روش ۵±۸۰ درصد بود. نتیجه نهایی این‌که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* قادر به انجام واکنش استیل‌زدایی بوده و تولید کیتوزان با راندمان بالا را امکان‌پذیر می‌سازد.

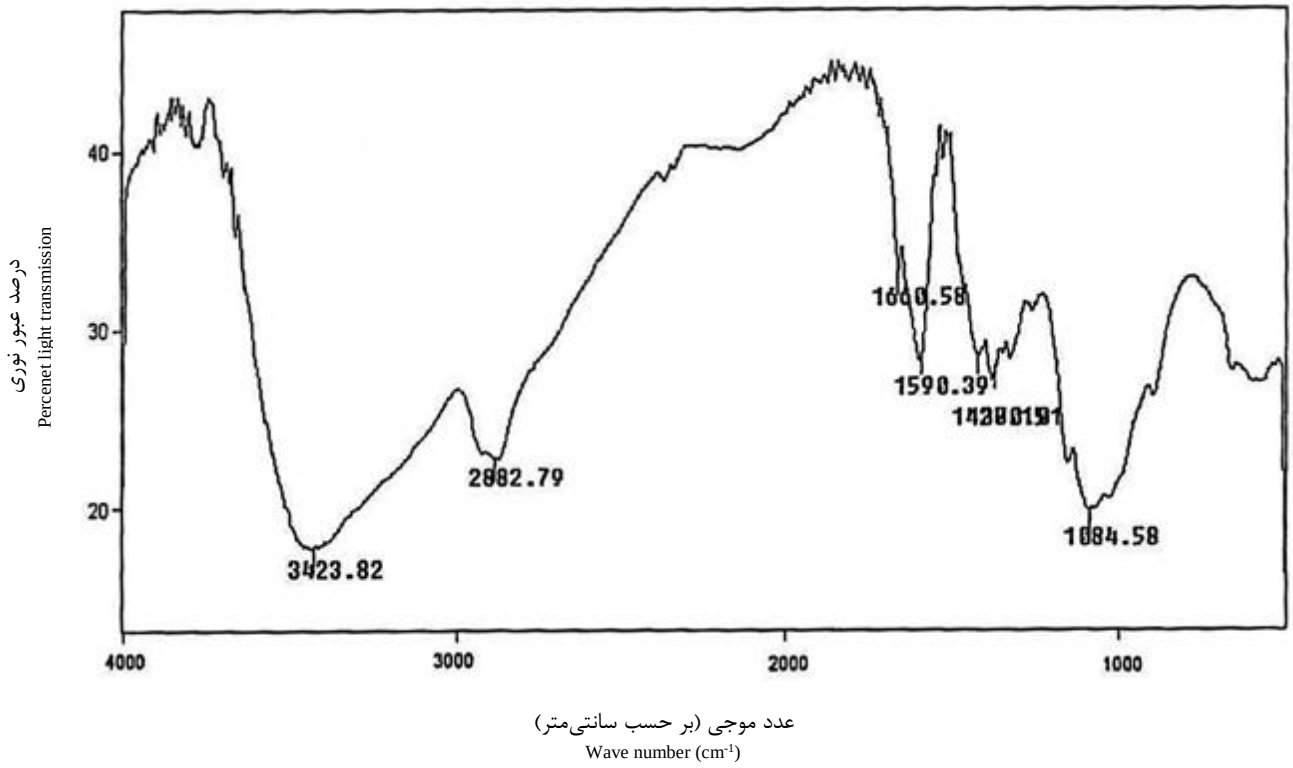
نتایج آنالیز

نتایج آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت روی نمونه تولید شده به شرح جداول ۱ و ۲ و اشکال ۱ و ۲ به‌دست آمد.

جدول ۱: نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتوزان حاصله از روش زیستی از پوسته سیست آرتمیا

Table 1:The results of CN analysis from *Artemia* cyst from extraction biological method

نوع عنصر Element type	کربن C	نیتروژن N	هیدروژن H	اکسیژن O
مقدار (درصد) Content (%)	44.4	8.9	7.2	39.5



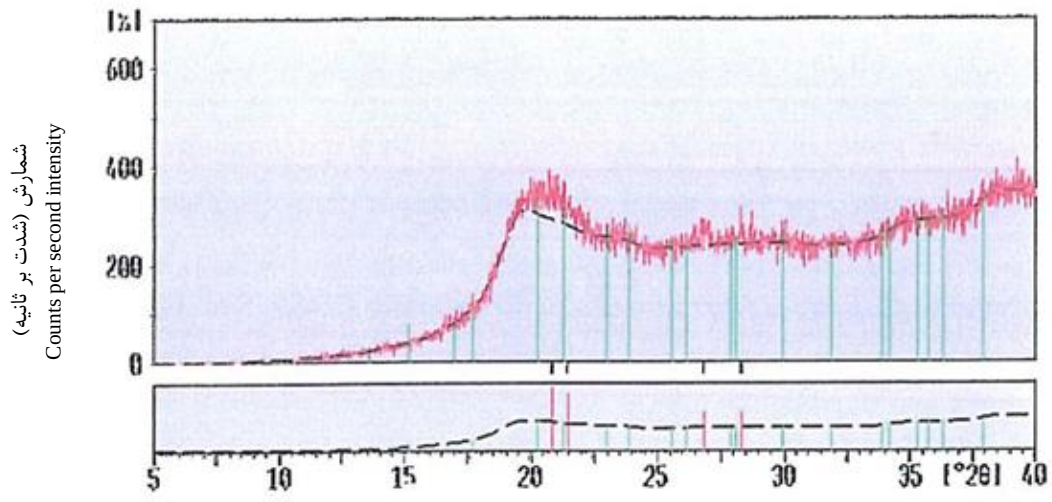
شکل ۱: طیف FTIR نمونه کیتوزان حاصله از روش زیستی

Fig. 1: FTIR spectrum chitosan extraction from biological method

جدول ۲: خصوصیات فیزیکی کیتوزان تولید شده با روش زیستی

Table 2: Chitosan physical characterisitcs produced by biological method

متوسط وزن مولکولی Average molecular weight	گرانروی Cps	رنگ Color	درجه استیل‌زدایی DDA	درصد بلورینگی Crystallinity percentage
5.1×10^5	18	قهوه‌ای کم‌رنگ Pale brown	80±5	90



DIFFRACTION LINES:

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 ۲: طیف XRD حاصله از کیتوزان
Fig. 2: XRD spectrum chitosan extraction

پیک به‌دست آمده در ۲۰ تتا، پیک شاخص ساختار بلوری پلیمر کیتوزان بود. حداکثر درصد بلورینگی به‌دست آمده از جدول پراش اشعه ایکس در پیک ۲۰ تتا، معادل ۹۰ درصد بود. نتایج آنالیزهای کمی و کیفی محصولات حاصله نشان داد که می‌توان با روش زیستی کیتین را به کیتوزان تبدیل نمود.

بحث

براساس آنالیزهای تجزیه عنصری با دستگاه طیف سنج مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، ویسکومتری، رنگ‌سنجی، تعیین درصد بلورینگی و تعیین درجه استیل‌زدایی، تمامی خصوصیات کیفی و کمی کیتوزان به‌دست آمده در این پژوهش با نوع مشابه به‌دست آمده از پوسته میگو و پوسته خرچنگ، در مطالعات پیشین برابری می‌کرد *آرسیدیاکونو* و همکاران (Arcidiacono *et al.*, 2010). مقایسه یافته‌های *آرسیدیاکونو* و همکاران (2010) که راندمان ۸۰ درصدی کیتوزان از کیتین را اعلام نمودند با نتایج تحقیق حاضر، بیانگر موفقیت در این پژوهش از یک منبع جدید می‌باشد.

کیتوزان به اشکال مختلف در بسیاری از صنایع داخل کشور ازجمله داروسازی، آرایشی، زیست فن‌آوری پزشکی و غیره مصرف می‌شود. تولید این فرآورده از پوسته سیست آرتمیاو براساس فنون بیولوژیکی می‌تواند جایگزین مناسب نوع مشابه وارداتی آن شود *بلوستین* و همکاران؛ *کونر* (Bluestone *et al.*, 2008; Knorr, 2000).

ساختار شیمیایی هر مونومر کیتوزان به‌دست آمده در این تحقیق، به‌صورت ($C_6H_{12}NO_4$) تعیین گردید که هم‌خوانی آن با ساختار مندرج در منابع استاندارد آلدریچ و سیگما ($(C_6H_{11}NO_5)_n$) *سوزانا* و همکاران (Susana *et al.*, 2000) بیانگر موفقیت در تولید این محصول با فن‌آوری زیستی می‌باشد. جایگزینی فنون زیستی به‌جای روش‌های رایج شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان، سبب حذف آلودگی‌های زیست محیطی شده و بدین ترتیب از تخلیه حجم وسیعی از پساب ماده شیمیایی هیدورکسید سدیم به اکوسیستم ممانعت به‌عمل می‌آید.

در تبدیل کیتین به کیتوزان به‌جای روش‌های شیمیایی می‌توان از روش زیستی استفاده کرد و آنزیم داستیلاز طبیعی مترشحه از کشت مایع قارچ *آسپیرژیلوس نایجر*، می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های رایج شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان باشد. در این‌حالت، براساس نتایج این تحقیق،

به‌کارگیری روش زیستی مانع از بروز پدیده‌های واسرشتگی و دپلمریزاسیون یا تغییر ماهیت ناشی از تاثیر مستقیم هیدروکسید سدیم درطی روش‌های شیمیایی شده *پارک* و همکاران؛ *پبردی* (Park *et al*., 2000; Peberdy, 2010) و افزایش کیفیت محصولات استخراج شده را در پی دارد.

باتوجه به اینکه بیش‌ترین کاربرد کیتوزان مربوط به مشتقات آن است و کیفیت در کاربرد آن‌ها نقش اساسی دارد، روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان در مقایسه با روش‌های رایج شیمیایی نتیجه مطلوب‌تری به‌دنبال داشته است. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که برای افزایش کیفیت، کیتین تجاری وارداتی با روش زیستی به کیتوزان تبدیل گردد که ضمن افزایش کیفیت، می‌تواند رفع مشکلات زیست‌محیطی این پلیمر را نیز به‌دنبال داشته باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش براساس طرح مصوب سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی به شماره مصوب ۲-۷۹-۱۲-۹۲۱۴۹ و به شماره ثبت ۴۷۶۶۸ مورخه۹۴/۶/۱۲ به انجام رسید. بدین‌وسیله از همکاری مرکز آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشکده شرکت نفت، پژوهشگاه پلیمر، موسسه علوم تحقیقاتی شیلات ایران و مرکز تحقیقات آرتمیای کشور نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۳ متن انگلیسی مراجعه شود.