انتاج مشتقات ذائبة بالماء من الكايتوسان المستخلص من قشورالروبيان بواسطة تفاعلات ميلارد ودراسة خواصها الكيميائية والوظيفية

علي حسين عبد الكريم منير عبود جاسم *عالية جميل علي السعد

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة

الخلاصة

تم تحضير الكايتوسان من الكايتين المستخلص من قشور الروبيان *Penaeus semisulcatus* بازالة مجاميع الاستيل من الكايتين بالطريقة الكيميائية ,حضرت مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء بتفاعل الكايتوسان المحضر مع خمسة انواع من السكريات المختزلة بواسطة تفاعلات ميلارد بمعاملتين المعاملة الاولى على درجة حرارة 100°م لمدة (1–7) ساعة والمعاملة الثانية على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة بواسطة الاوتوكليف ,حملت مشتقات الكايتوسان الناتجة من التفاعل الرموز (G t–d , F t–d , Ga t–d , M t–d , L t–d) حيث t درجة حرارة التفاعل,d زمن التفاعل , اما الرموز (G, F , Ga, M وL) فتمثل سكر (الكلوكوز, الفركتوز,الكالاكتوز,المالتوز واللاكتوز) على التوالي, ثم درست خواص هذه المشتقات كتقدير الحاصل, الذائبية , الثباتية, تقدير المجاميع الامينية الحرة والتغير في السكريات المختزلة حيث اعطت المعاملة الثانية اعلى نسبة في قيمة الحاصل ,الذائبية والثباتية , تراوحت قيمة الحاصل بين (30.50 – 45.20)% لجميع مشتقات هذه المعاملة, اما الذائبية فتراوحت بين (0.68 – 1.10) غم /100مل وأبدت مشتقات هذه المعاملة ثباتيتها عند pH تراوح بين (7.10– 10.50) , اما المعاملة الاولى فتراوحت قيمة حاصل مشتقاتها بين (30.0 – 43.50) %, اما الذائبية فتراوحت بين (0.450– 0.780) غم/100 مل وأبدت مشتقات هذه المعامله ثباتيتها عند pH تراوح بين (7.2– 10.0) , كما قدرت المجاميع الامينية الحرة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد والذائبة بالماء وقد امتلكت جميع مشتقات المعاملة الثانية اقل محتوى من المجاميع الامينية الحرة والسكريات المختزلة مقارنةً بالمعاملة الاولى حيث تراوحت اعلى قيمة للامتصاصية بين (0.060–0.201) وبين (0.100–0.400) لمشتقات المعاملة الاولى .

Key word: Chitosan Deriveties ,Millard Reaction , functional properties

***البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثالث**

المقدمة

يعد الكايتوسان من البوليمرات المستقيمة والمتكون من وحدات متشابهة ذات سلاسل مستقيمة من N – acetyl – D – glucosamine و D – glucosamine المرتبطة باصرة كلايكوسيدية نوع بيتا (1- 4) β [9]

يتحول الكايتين الى كايتوسان عندما تكون درجة ازالة مجاميع الاستيل اكثر من 50% بالاعتماد على اصل البوليمر وتوزيع مجاميع الاستيل على طول السلسلة البوليميرية وعندها يصبح ذائبا" في معظم المحاليل الحامضية العضوية المخففة الضعيفة والمعتدلة الحامضية كمحاليل حامض الخليك ,الستريك والفورميك ,الماليك والاوكزاليك والذي تكون قيمة pH لها اقل من 6 [3] يحتوي الكايتوسان على ثلاث مجاميع فعالة وهي مجاميع الهيدروكسيل الابتدائية عند ذرة الكاربون السادسة ومجاميع الهيدروكسيل الثانوية عند ذرة الكاربون الثالثة في كل وحدة متكررة والمجاميع الامينية عند ذرة الكاربون الثانية عند كل مجموعة مزال منها مجاميع الاستيل وهذه المجاميع هي موضـــع مختلف التحويـــرات الكيميـــائية لانتاج مختلف المشتـــــقات مثل 5 – carboxymethyl chitosan , pyrrolidinone chitosan , methyl dicarboxymethyl chitosan, *N* - , quaternis, sulfofuryl chitosan,

تحدث تفاعلات هذه المشتقات في نظام معقد وصعب السيطرة عليه, وبسبب ذائبية الكايتوسان في الاوساط الحامضية في pK_a يتراوح بين (6.2 –7) فان بعض التفاعلات لاتحدث الا باضافة مجاميع وظيفية محبة للماء كالسكريات المختزلة الى جزيئات الكايتوسان لجعله ذائباً في مدى واسع منpH لانتاج مشتقات تتراوح ذائبيتها بين (0.3– 1)% [3] من خلال بعض التفاعلات الكيميائية كتفاعلات ميلارد ,ان نواتج تفاعلات ميلارد هي المنتجات الواعدة للمنتجات التجارية للكايتوسان الذائب بالماء بتطويرها خواص الكايتوسان النوعية والوظيفية والفيزيوكيميائية كالذائبية والثباتية باستعماله مشتقات (الكايتوسان – سكريات مختزلة) [19].

المواد وطرائق العمل

1- المواد الأولية :- جهزت قشور الروبيان من الروبيان سوق البصرة القديمة في محافظة البصرة كنواتج عرضية لعملية تنظيف الروبيان غسلت القشور بماء الحنفية وجففت في الظل وطحنت الى مسحوق لغرض استخلاص

الكايتوسان اجري تصنيف الروبيان في مركز علوم البحار- جامعة البصرة .

2– أستخلاص الكايتين :– استخلص الكايتين من مسحوق قشور الروبيان المحضر بمرحلتين شملت :

a - أزالة المعادن :- وضع مسحوق قشور الروبيان في محلول 4 % HCl (حجم / حجم) بنسبة 14:1 (وزن / حجم) وعلى درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة بعدها ثم غسل الراسب المتبقي بالماء المقطر [15] .

b - أزالة البروتين :- أزيل البروتين بمعاملة الناتج من المرحلة الاولى بعد ذلك مع محلول NaOH بتركيز 5 % (وزن / حجم) بنسبة 12:1 (وزن/ حجم) لمدة 24 ساعة ثم غسل الراسب عدة مرات لحين الوصول لمرحلة التعادل (pH7) وجففت العينة على درجة حرارة 4 °م لمدة 20 ساعة لانتاج الكايتين [15] .

3- أستخلاص الكايتوسان من الكايتين المحضر:- حضر الكايتوسان من الكايتين حسب طريقة [12] بازالة مجاميع الاستلة Deacetylation من الكايتين وذلك بالمعاملة القاعدية للكايتين باستعمال 50 % (وزن / حجم) محلول NaOH بنسبة (10:1) (وزن/ حجم) على درجة حرارة 100 °م لمدة 20 ساعة , غسل الناتج عدة مرات بالماء المقطر لحين الوصول الى pH7 ثم جفف على درجة حرارة 45 °م لمدة 20 ساعة .

4- تحضير الكايتوسان الذائب بالماء :-

حضرت مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء من الكايتوسان المحضر قيد الدراسة حسب طريقة [20] وذلك بتحويره بواسطة تفاعلات ميلارد حيث حضر 1% (وزن / حجم) من محلول الكايتوسان في 0.2 مولاري حامض الخليك , اضيف 1 غم من السكريات المختزلة [كلوكوز (glucose), كالاكتوز (Galactose) ,فركتوز (fructose), مالتوز (maltose) ولاكتوز(lactose) الى محلول الكايتوسان كل سكر على حدة وخلطت على هزاز مغناطيسي لحين الذوبان واستعملت معاملات مختلفة لغرض تفاعلات ميلارد شملت الدرجات الحرارية التالية :

100°م لمدة (7,6,5,4,3,2,1,0) ساعة [13]
121 °م لمدة 1/4ساعة باستعمال الاوتوكليف [7]

وبعد التفاعل مباشرة ووضعت العينات في حمام ثلجي , وتمت معادلتها بمحلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 2 مولاري ونبذت مركزيا على 8000 دورة/ دقيقة . اخذ الراشح وتمت عملية الديلزة باكياس الديلزة المجهزة من شركة Guangzhou Zhenrui للادوات الطبية بوزن جزيئي (14) كيلودالتون بوجود الماء المقطر لمدة 5 ايام ثم جفد المحلول المديلز واجريت له الفحوصات اللازمة . ان مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد (نواتج تفاعلات ميلارد) Millard Reaction Products (MRPs) حملت الرموز التالية :

L t–d , M t–d , Ga t–d , F t–d , G t–d , حيث t درجة حرارة التفاعل, d زمن التفاعل, (L, M ,Ga , F ,G) سكر (الكلوكوز, الفركتوز, الكالاكتوز, المالتوز, اللاكتوز) على التوالي فمثلا:-

(Ga100–7) ساعة (تفاعل الكالاكتوز على درجة حرارة 100 °م لمدة 7 ساعة)

(M121–1/4) ساعة (تفاعل المالتوز على درجة حرارة 121°م لمدة ربع ساعة)

5- تنشيط اكياس الديلزة (النضح الغشائي):-

نشطت اكياس الديلزة حسب طريقة [2] حيث استعملت المحاليل التالية :-

أ- محلول حامض الخليك الثلجي بتركيز 1% (حجم/ حجم): اخذ 10 مل من حامض الخليك الثلجي واكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

ب- محلول 1% (وزن / حجم) من كربونات الصوديوم ,10^{-3}مول من EDTA : وزن 20 غم من كربونات الصوديوم و0.652

غم من EDTA واذيبت في الماء واكمل الحجم الى لترين بالماء المقطر, واتبعت

الخطوات التالية :- غمرت اكياس الديلزة بمحلول (أ) لمدة ساعة ثم تركت في اناء يحتوي على ماء مقطر لمدة بضع دقائق على محرك مغناطيسي , ثم استبدل الماء بمحلول (ب), استبدل EDTA القاعدي بمحلول جديد وسخن على درجة حرارة 75 °م مع التحريك على المحرك المغناطيسي ثم التخلص من المحلول الساخن بمحلول EDTA جديد وسخن مرة اخرى الى 75 °م مرة اخرى , ثم استبدل محلول EDTA بماء مقطرساخن واستبدل عدة مرات لدقائق قليلة ثم وضعت اكياس الديلزة في عبوة بلاستيكية تحوي ماء مقطر مع قطرات قليلة من الكلوروفورم وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

6- الفحوصات الكيميائية والوظيفية لمشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء

1- ألحاصل :- حسبت النسبة المئوية لحاصل مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد باختلاف الوقت ودرجات الحرارة حسب طريقة [8] باستعمال المعادلة التالية :-

الكايتوسان الذائب بالماء%=

$$\frac{\text{وزن الكايتوسان الذائب بالماء}}{\text{الوزن الكلي للكايتوسان المضاف والسكريات}} \times 100$$

2 - الذائبيـــــة :- حسبت ذائبية مشتقات الكايتوسان الذائب بالماء باختلاف الوقت ودرجات الحرارة حسب طريقة [8] وذلك بخلط 1 غم من الكايتوسان الذائب بالماء مع 100 مل من الماء المقطر على هزاز مغناطيسي مدة 3 ساعات او لحين الذوبان ثم رشح المحلول خلال ورق ترشيح (0.4 مايكروليتر) معلومة الوزن, حسبت الذائبية للنواتج من خلال التغير او الفرق في وزن ورقة الترشيح .

3 - الثباتيـة :- قيست ثباتية مشتقات الكايتوسان الذائب بالماء بالاعتماد على طريقة [19] وذلك باذابة 0.3 غم في 10 مل من الماء المقطر مع مراقبة او متابعة pH المحلول وذلك باضافة 2 مولاري من محلول NaOH الى ان تصبح امتصاصية المحلول على 600 نانومتر اكبر من 0.1

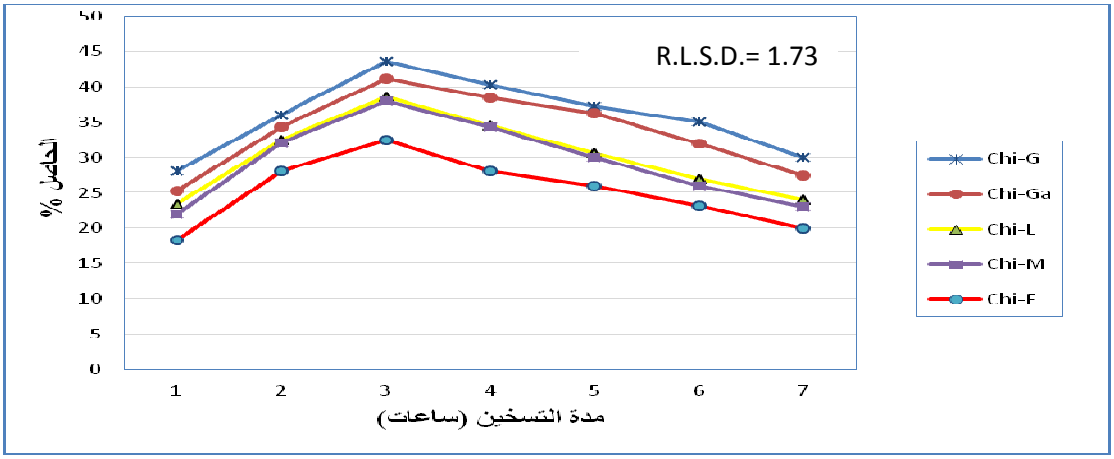
4 - تقدير المجاميع الامينية الحرة:- قدر محتوى المجاميع الامينية الحرة لمشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء بموجب طريقة [1] حيث خلط 125 مايكروليتر من النماذج المحضرة في 1% (وزن / حجم) من الماء المقطر مع 2 مل من 0.21 مولاري من محلول الفوسفات المنظم (pH 8.2) و 1 مل من محلول (TNBS) 2,4,6- Trinitrobenzenesulfonic acid بتركيز % 0.01(وزن/حجم) , مزج المحلول بقوة ووضع في حمام مائي على درجة حرارة 50 °م مدة 30 دقيقة , ثم اضيف 2.0 مل من 0.1 مولاري كبريتات الصوديوم , بعدها برد الخليط الى درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة , قيست الامتصاصية على 420 نانومتر باستعمال جهاز الطيف الضوئي spectrophotometer .

5- تقدير السكريات المختزلة:- قدر محتوى السكريات المختزلة لجميع مشتقات الكايتوسان

الناتجة من تفاعلات ميلارد باختلاف المعاملات بموجب طريقة [4] حيث خلط 1 مل من المشتقات مع 1 مل من كاشف Somogyi copper ووضع في حمام مائي على درجة حرارة 100°م لمدة 15 دقيقة في انبوب اختبار محكم الغلق ثم برد باستخدام ماء الحنفية و اضيف 1 مل من كاشف Nelson arsenomolybdate الى الخليط وخلط جيدا ثم اضيف للخليط 3 مل من الماء الخالي من الايونات , قيست الامتصاصية على 520 نانومتر

النتائج والمناقشة

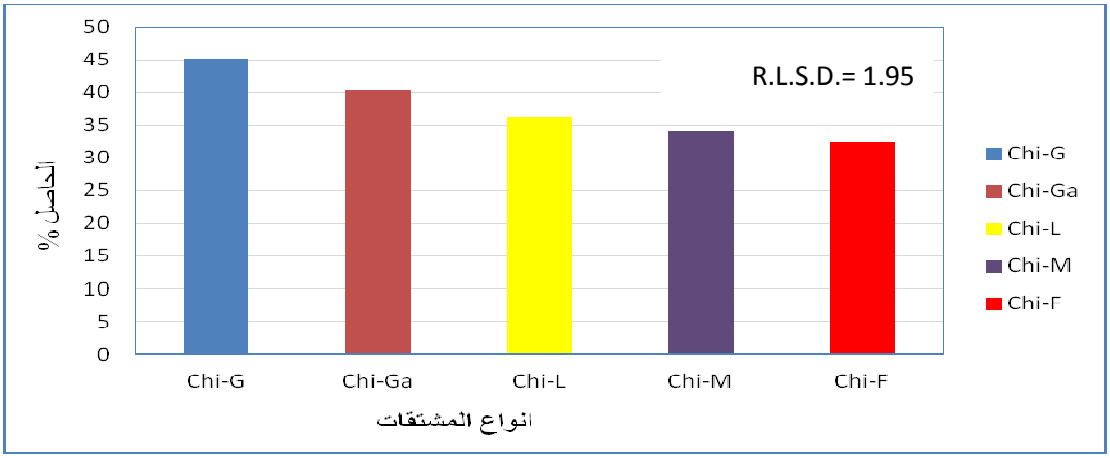
الحاصل:- يبين الشكل (1) حاصل مشتقات الكايتوسان المحضرة من الكايتوسان المحضر والناتجة من تفاعلات ميلارد مع السكريات المختلفة والذائبة بالماء والمعاملة على درجة حرارة 100°م لمدة (1-7) ساعة فقد اعطى مشتق الكايتوسان – كلوكلوز بعد مرور ثلاث ساعات اعلى قيمه للحاصل (G100-3) ساعة يتبعه المشتقات (F100-3, M100-3, L100-3, Ga100-3) ساعة حيث بلغ (38.0,38.5 ,42.1,43.5 %) على التوالي, وتبين النتائج ان اعلى قيمة للحاصل لجميع المشتقات كانت بعد مرور 3 ساعة ثم بدأ بالانخفاض تدريجيا لجميع المشتقات, في حين كانت اقل قيمة له في الساعة الاولى من التفاعل , وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية $p<0.05$ في قيمة الحاصل لجميع المشتقات خلال مدة التسخين



شكل (1) حاصل مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 100 °م لمدة (1-7) ساعة باختلاف انواع السكريات

المعاملة الثانية تتوضح في الشكل2 الذي يبين حاصل المشتقات الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4ساعة حيث نلاحظ ان مشتق الكايتوسان – كلوكوز (G121-1/4) ساعة قداعطى اعلى قيمة للحاصل يليه المشتقات M121- F121-1/4 , (1/4, L121-1/4, Ga121-1/4) ساعة على التوالي حيث بلغ الحاصل(45.20

%(30.50,34.10,36.20,40.40 على التوالي , واختلفت نسبة الحاصل باختلاف انواع السكريات ولكنه تراوح بين (32.5-45.2) % وقد امتلكت هذه المعاملة اعلى قيمة للحاصل مقارنة مع بقية المعاملات للمشتقات المناظرة لها, وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية $p<0.05$ في قيمة الحاصل لجميع المشتقات خلال مدة التسخين .

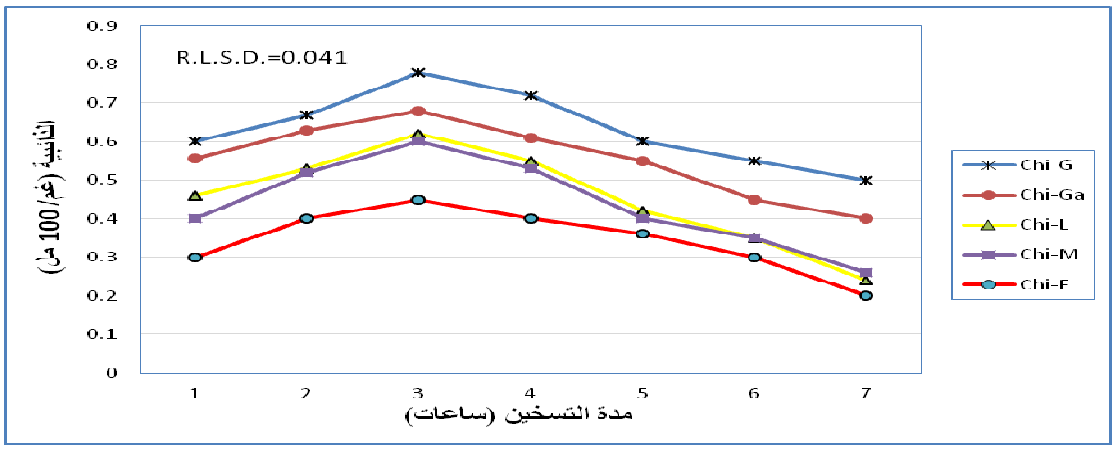


شكل (2) حاصل مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 121م لمدة 1/4ساعة باختلاف انواع السكريات.

وجد الباحث والعاملون معه [7] زيادة في حاصل مشتقات الكايتوسان والناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 65م لمدة 10 يوم مع سكر (كلوكوز,كلوكوز امين ,مالتوز,لاكتوز , فركتوز) مع زيادة وقت التفاعل ويصل اعلى قيمة له عند اليوم الثالث من التفاعل لكلا مشتقات سكر الكلوكوز والمالتوز حيث بلغ (52 و45) % على التوالي , اما مشتقات سكر الفركتوز فبلغ اقصى حاصل 42 % في اليوم السادس من التفاعل , كما وجدوا ان درجة ازالة مجاميع الاستيل تتناسب مع كمية الحاصل حيث ان ارتفاع هذه الدرجة يزيد من نسبة الحاصل على الرغم من ارتباطها بنفس السكريات. كما اتفقت النتيجة مع [6] حيث بلغ حاصل مشتقات الكايتوسان مع سكر (الكلوكوز و الفركتوز) المعاملة على درجة حرارة 121م لمدة 1/4 ساعة ووجد ان نسبة حاصل المشتق (G121-1/4) ساعة اكبر من نسبة حاصل المشتق (F121-1/4) ساعة كما وجد ان تقليل وقت التفاعل بزيادة عامل التسخين يسرع من التفاعلات فلا تتكون فرصة لترسيب مركبات اخرى مما يزيد من كمية الحاصل .

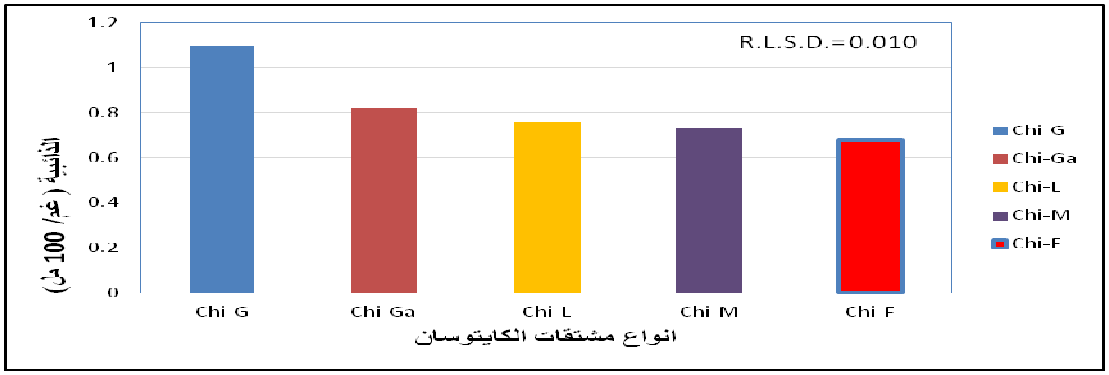
الذائبية :- يبين الشكل 3 ذائبية مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والمعاملة على درجة حرارة 100م لمدة (1-7) ساعة باختلاف انواع السكريات المتفاعلة فقد اعطى مشتق الكايتوسان – كلوكلوز بعد مرور ثلاث ساعات (G100-3) ساعة اعلى قيمه للذائبية يليه (Ga100-3 ,F100-3,M100-3,L100-3) ساعة بلغت (0.780, 0.68 ,0.600,0.620 و0.450) غم/100مل على التوالي , وتبين نتائج المعاملة ان اعلى قيمة لذائبية جميع المشتقات كانت بعد مرور

3 ساعات ثم تبدأ بالانخفاض تدريجيا لجميع المشتقات ولكن اقل قيمه كانت في الساعة الاولى من التفاعل, وتراوحت اعلى قيم لذائبية مشتقات المعاملةبين(0.450–0.780)غم/100مل, وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية $p<0.05$ في قيمة الذائبية لجميع المشتقات خلال مدة التسخين وقد تفوقت المعاملة بعد مرور3 ساعات معنويا على بقية المعاملات لجميع المشتقات .



شكل (3) ذائبية مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 100°م لمدة (1–7) ساعة.

يوضح الشكل 4 ذائبية المشتقات الناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 121 °م لمدة 1/4ساعة حيث نلاحظ ان مشتق (G121–1/4) ساعة قد اعطى اعلى قيمة للذائبية يليه المشتقات (Ga121–1/4, M1211/4, L121–1/4 و F121–1/4) ساعة حيث بلغت الذائبية (0.73, 0.76, 0.82, 1.10 و0.68) غم/100 مل على التوالي, واختلفت قيمة الذائبية باختلاف انواع السكريات , وقد امتلكت هذه المعاملة اعلى قيمه للذائبية مقارنة مع المعاملة الاولى وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية $p<0.05$ لجميع المشتقات خلال مدةالتسخين



شكل (4) ذائبية مشتقات الكايتوسان الذائبة بالماء والناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 121°م لمدة 1/4 ساعة.

أكد [11] ان العديد من مشتقات الكايتوسان باختلاف طرق التحوير تتراوح ذائبيتها بين (0.3-1) غم/100مل , كما تعتمد الذائبية والحاصل لمشتقات تفاعلات ميلارد الذائبة بالماء على ظروف التفاعل ونوع السكريات المختزلة كما ان التغير البسيط في التركيب الكيميائي للسكريات المختزلة يسبب اختلافات كبيرة في خواص المشتقات الناتجة من التفاعل . توافقت النتيجة مع [6] حيث وجد ان ذائبية مشتقات الكايتوسان – (الكلوكوز و الفركتوز) المعاملة على درجة حرارة 65°م لمدة 6 يوم بواسطة تفاعلات ميلارد بلغت (0.95 و0.64) غم/100 مل على التوالي , اما المشتقات الناتجة من المعاملة على درجة حرارة 121 °م لمدة 1/4 ساعة فكانت ذائبيتها اعلى من المعاملة السابقة حيث بلغت (1.30 و0.70) غم/100 مل على التوالي, كما وجد ان المعاملة الحرارية ونوع السكر المختزل وخواص الكايتوسان الخام يؤثر تاثيراً كبيراً على الذائبية فهناك تداخل بين الكايتوسان ونوع السكر والمعاملة الحرارية فالمعاملة الحرارية الواطئة بزيادة وقت التفاعل تعطي ذائبية اقل بينما المعاملة الحرارية العالية مع قصر وقت التفاعل تعطي ذائبية اعلى حيث ان الحرارة الواطئة تبطأ من تفاعلات ميلارد بينما الحرارة العالية مع زيادة وقت التفاعل تسبب في تكوين مركبات مختلفة غير ذائبة, كما وجد الباحث والعاملون معه [7] ان درجة ازالة مجاميع الاستيل تتناسب مع الذائبية حيث ان ارتفاع هذه الدرجة سوف يزيد من الذائبية كما ان نوع السكر المختزل له تاثير كبير على الذائبية حيث تختلف الذائبية باختلاف انواع السكريات المختزلة المتفاعلة.

يعود ارتفاع ذائبية مشتقات كايتوسان – سكريات مختزلة الى ان المركبات المتكونه في مرحلة اعادة ترتيب هينز Heyn's rearrangement والايزومرية Isomerization واعادة ترتيب امادوري Amadoris rearrangment قد تعيق تكوين المركبات المتبلورة او غير الذائبة في الكايتوسان الذائب بالماء [16]

تكون تطبيقات الكايتوسان محدودة بسبب عدم ذوبانه عند pH التعادل والقاعدي كونه يذوب فقط في بعض الحوامض العضوية الضعيفة والتي بدورها توفر فائدة محدودة من التطبيقات , لذلك تطوير قابلية ذوبانه في اوساط حامضية ومتعادلة وقاعدية من خلال تحويره الى مشتقات ذائبة بالماء ومن ثم فحص ثباتيتها عند pH مختلفة تعتبر من المتطلبات الاساسية لنجاحها في التطبيقات الصناعية , حيث تعتبر تلك المشتقات الذائبة بالماء هي الشكل التجاري للكايتوسان الذائب بالحامض [17].

الثباتية

يبين الجدول1 ثباتية مشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 100 °م لمدة (1-7) ساعة حيث أظهرت المشتقات ثباتيتها في pH تراوح بين (7.2 – 10.0) وكان اكثر المشتقات ثباتية (G100-7) ساعة يليه (M100-7 , F100-7 , Ga100-7 , L100-7 ,) ساعة حيث لوحظ زيادة الثباتية بزيادة وقت التفاعل وبينت نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند

مستوى معنوية $p<0.05$ بين المشتقات خلال مدة التسخين.

يوضح الجدول2 ثباتية المشتقات المعاملة على درجة حرارة 121 ºم لمدة 1/4ساعة وكانت ثباتيتها في مدى واسع من pH تراوح بين (7.3-10.5) , لوحظ ذائبية هذه المشتقات على الرغم من زيادة قيمة pH نحو القاعدي وذلك باضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم وكانت ثباتية المشتق (G121-1/4) عندpH يساوي 10.5 وهي اعلى قيمة لثباتية المشتقات يعقبه (Ga121-1/4 , L121-1/4 , M121-1/4 , F121-1/4) ساعة وهذه المعاملة كانت اكثر ثباتية من المعاملة الاولى لجميع المشتقات, كما بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين المشتقات خلال مدة التسخين بينما لم تكن هناك فروقات في ثباتية المشتقين (L121-1/4 وM121-1/4) ساعة عند مستوى معنوية $p<0.05$

جدول (1) ثباتية مشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 100ºم لمدة (1-7) ساعة

المشتقات	وقت التسخين (ساعة)	1	2	3	4	5	6	7
	قيمة pH قبل المعاملة	ثباتية المشتقات بتغير قيمة pH بعد المعاملة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم						
Chi-G	7.3 a	8.0 a	8.5 a	8.5 a	8.8 a	9.0 a	9.5 a	10.0 a
Chi-Ga	7.2 a	7.8 b	8.0 b	8.2 b	8.5 b	8.8 b	9.1 b	9.6 b
Chi-L	7.2 a	7.7 c	7.8 c	8.0 c	8.2 c	8.5 c	9.2b	9.4 c
Chi-M	7.2 a	7.7 cd	8.0 b	8.2 b	8.5 b	8.7 b	8.9 c	9.4 c
Chi-F	7.2 a	7.6 d	8.0 b	8.2b	8.3c	8.5c	8.7 d	9.1 d

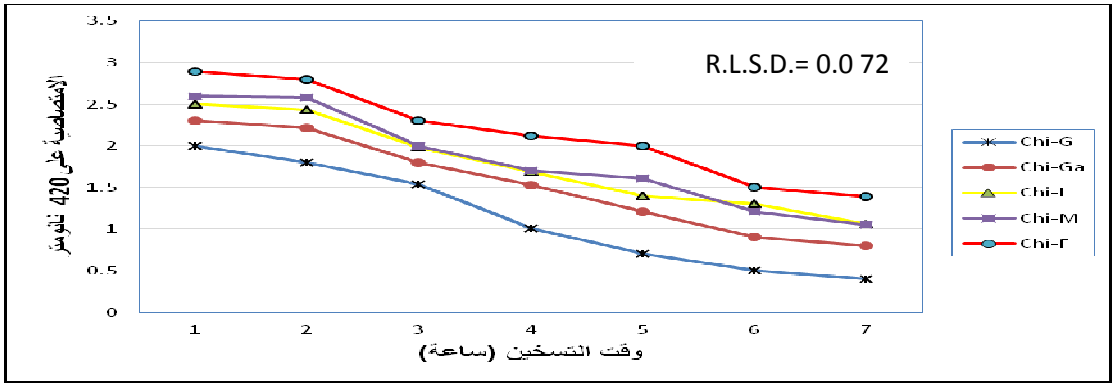
المشتقات	قيمة pH قبل المعاملة	ثباتية المشتقات بعد المعاملة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم
G121-1/4	7.3	10.5[a]
Ga121-1/4	7.3	10.0 [b]
L121-1/4	7.3	9.6[c]
M121-1/4	7.3	9.5[c]
F121-1/4	7.3	9.2[d]

, جاءت النتيجة متطابقة مع نتيجة [18] حيث لاحضوا زيادة الثباتية مع زيادة وقت التفاعل لجميع مشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 100ºم لمدة (1-7) يوم , كما لوحظ ثباتية المشتقات عند pH تراوح بين (10.1- 7.6) لكل من مشتقات (G 100-7, Ga100-7 , L100-7, F100-7) يوم , توافقت النتيجة التي **تقدير المجاميع الامينية الحرة** :- من الشكل 5 نلاحظ انخفاض مستمر وبصورة تدريجية للامتصاصية لجميع مشتقات هذه المعاملة بتقدم وقت التسخين بالساعات وكان اكثر المشتقات تغييراً للمجاميع الامينية الحرة (G100-7) ساعة حيث امتلك اقل قيمة للامتصاصية بلغت 0.400 اي انه احتوى على اقل كمية من المجاميع الامينية الحرة يليه المشتقات (Ga100-7, L100-7, F100-7, M100-7,) ساعة على التوالي حيث بلغت

تم الحصول عليها مع نتيجة [6] أذ أبدت مشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 121ºم لمدة 1/4ساعة (G121-1/4) ثباتيتها عند pH تراوح بين (7.2-10.3) , في حين ثباتية مشتقات (F121-1/4) ساعه عند pH تراوح بين (7.0-9.4) .

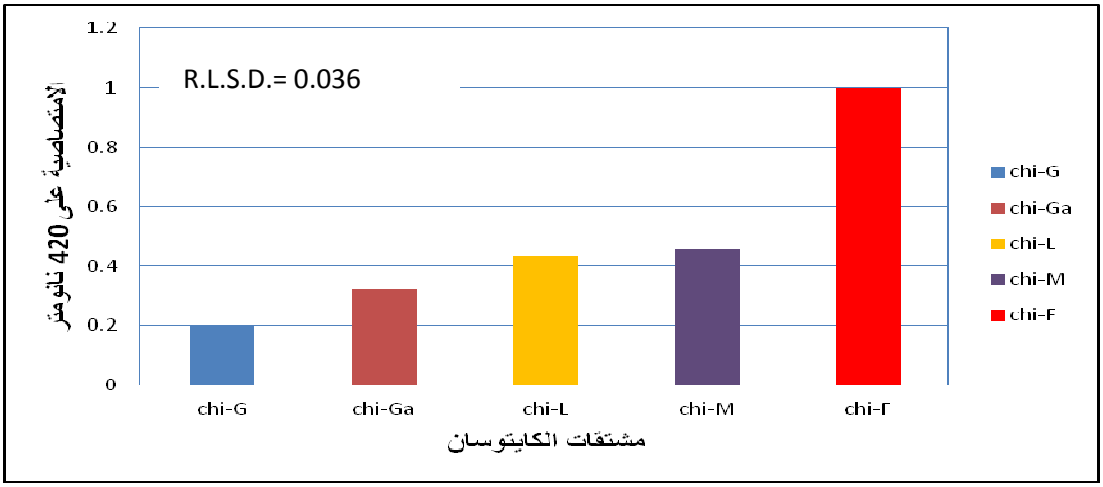
الامتصاصية بعد مرور7 ساعة من التفاعل(0.800 ,1.050و1.060,1.386) على التوالي وبفروقات معنوية واحتوت هذه المعاملة على كمية اكبر من المجاميع الامينية الحرة مقارنة بالمعاملة الثانية لارتفاع قيمة امتصاصية مشتقاتها.

يبين الشكل 6 ان مشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد على درجة حرارة 121ºم لمدة 1/4 ساعة قدامتلكت اقل قيمه للامتصاصية مقارنة مع بقية المعاملات لاحتواءها على كمية اقل من



شكل (5) التغيرفي المجاميع الامينية الحرة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على 100 °م لمدة (1-7) ساعة.

المجاميع الامينية الحرة وكان اقلهم امتصاصية المشتق (G121-1/4) ساعة بلغت 0.20 وتاتي بعده المشتقات M121-Ga121-1/4) L121-1/4, 1/4 و F121-1/4) ساعة حيث بلغت امتصاصيتها (0.321 , 0.434, 0.456 و 1.00) على التوالي , وتبين نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية في محتوى المجاميع الامينية عند مستوى معنوية $p<0.05$ بين المشتقات خلال مدة التسخين ولكن المشتق(F121-1/4) ساعة تفوق معنوياً على بقيةالمشتقات

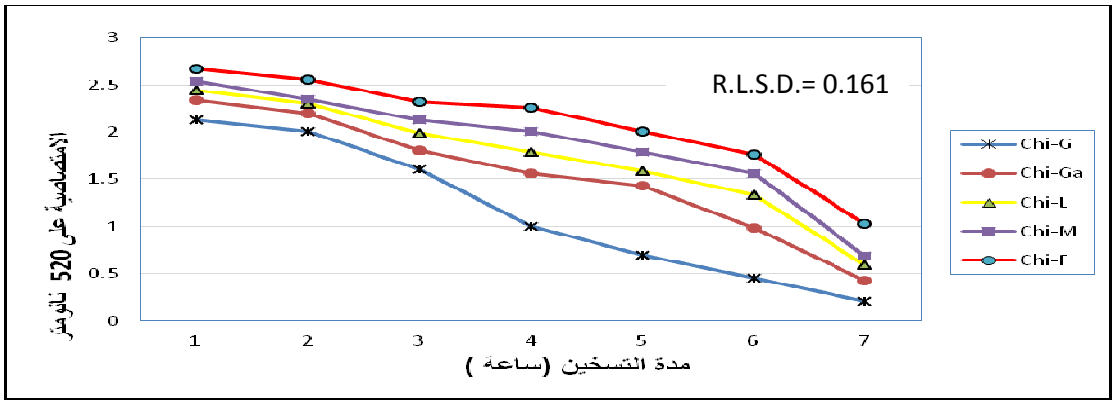


شكل (6) التغيرفي محتوى المجاميع الامينية الحرة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على 121°م لمدة 1/4 ساعة

بين الباحث والعاملون معه [14] ارتباط قسم من المجاميع الامينية الفعالة لجميع مشتقات الكايتوسان مع الاصرة الهيدروجينية الواسعة والممتدة على طول سلسلة البوليمر وبالتسخين تتكسر الاصرة الهيدروجينية وتتكشف المجاميع الامينية ومع زيادة وقت التسخين يستمر النقصان في المجاميع الامينية والذي يؤدي الى زيادة الكثافة اللونية . فسر [10] انخفاض محتوى المجاميع الامينية

لمشتقات الكايتوسان لارتباطها تساهميا مع السكر لتكوين منتجات عملية glysation , قاعدة شف Schiff base , اعادة الترتيب للحصول على نواتج ثابتة او نواتج امادوري Amadori products التي تكون فيما بعد روابط متقاطعة مع المجاميع الامينية مسببة تجمع البوليمر . لاحظ الباحث والعاملون معه [5] انخفاض نسبة المجاميع الامينية الحرة بواسطة تفاعلات ميلارد على درجة 121 °م لمدة (1–3) ساعة في الحمام المائي لنظام السكريات المختزلة (كلوكوز, كالاكتوز وفركتوز) مع الحامض الاميني الكلايسين حيث تقل الامتصاصية بدرجة كبيرة خلال فترة التسخين من 2.091 الى 1.151 لنظام كلوكوز– كلايسين ومن2.060 الى 1.197 لنظام كالاكتوز– كلايسين ومن 2.004 الى 1.373 لنظام فركتوز – كلايسين

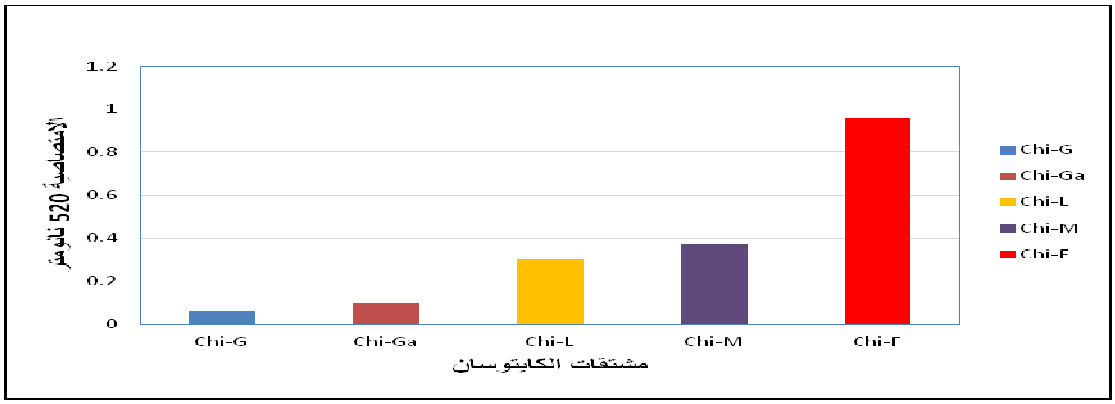
تقدير السكريات المختزلة:– يبين الشكل 7 ان هناك انخفاص تدريجي في كمية السكريات المختزلة بتقدم وقت التسخين بالساعات واحتوى المشتق(G100–7) ساعة اقل كمية من السكريات المختزلة باقل قيمة للامتصاصيه تليه المشتقات(Ga100–7,L100–7, M100–7 و F100–7) ساعة على التوالي حيث بلغت الامتصاصية بعد مرور 7 ساعة من التفاعل (0.10 , 0.230 , 0.561 , 0.590 و 1.030) على التوالي, وارتفع محتوى السكريات المختزلة مقارنة بالمعاملة الثانية , وتشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنوية عند مستوى معنوية P<0.05 بين المشتقات خلال مدة التسخين .



شكل (7) التغير في محتوى السكريات المختزلة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 100 °م لمدة (1–7) ساعة .

اما الشكل 8 يبين ان انخفضت قيمة الامتصاصية لمشتقات المعاملة على درجة حرارة 121 °م مقارنة بالمعاملة الاولى لقلة محتوى هذه المشتقات من السكريات المختزلة نتيجة سرعة التفاعل وارتفاع درجة حرارة التفاعل والتي انسجمت مع الكثافة اللونية البنية وكان اكثرها تفاعلاً واقلها امتصاص (G121–1/4) ساعة وتاتي بعده المشتقات M121–,, L121–1/4, Ga121–1/4)

1/4و1/4–F121) ساعة,حيث بلغت قيمة (0.960 على التوالي وبفوقات معنوية الامتصاصية (0.373,0.300,0.099,0.060 و



شكل (8) التغير في محتوى السكريات المختزلة لمشتقات الكايتوسان الناتجة من تفاعلات ميلارد المعاملة على درجة حرارة 121 °م لمدة 1/4 ساعة .

تدل النتائج على تفاعل المجاميع الكربونيلية للسكريات المختزلة مع المجاميع الامينية للكايتوسان خلال التسخين لتكوين مشتقات تفاعلات ميلارد وبالنتيجة ستنخفض كمية السكريات المختزلة والمجاميع الامينية نتيجة استهلاكها خلال التفاعل وان ارتفاع درجة حرارة التفاعل سيزيد من التفاعل بتحفيز التداخل بين المجاميع الامينية مثل مجموعة NH2– للكايتوسان والمجاميع الكربونيلية للسكريات المختزلة خلال عملية glycation حيث تتكون المركبات الوسطية ثم تتحول الى صبغات بنية بزيادة الكثافة اللونية البنية وبالتالي تقل كمية السكريات المختزلة والتي تتناسب مع الكثافة اللونية وقلة الامتصاصية . تقاربت النتيجة التي تم الحصول عليها من نتيجة الباحث والعاملون معه

[5] الذين لاحضوا انخفاض نسبة السكريات المختزلة بواسطة تفاعلات ميلارد على درجة 121 °م لمدة (1–3) ساعة في الحمام المائي لنظام السكريات المختزلة (كلوكوز , كالاكتوز وفركتوز) مع الحامض الاميني الكلايسين , حيث قلت الامتصاصية بدرجة كبيرة خلال فترة التسخين من 2.091 الى 1.007 لنظام كلوكوز– كلايسين ومن 2.060 الى 1.78 لنظام كالاكتوز– كلايسين ومن 2.004 الى 1.971 لنظام فركتوز – كلايسين , حيث احتوى النظام الاول على اقل كمية من السكريات المختزلة ثم يليه النظام الثاني واعلاهم كمية من السكريات المختزلة عند ارتباط سكر الفركتوز

production of water soluble derivatives of chitosan extracted from shrimp shells by Millard reactions and study the chemical and functional properties

Ali Hussein Abed-Al-Kareem Munir Abood Jasim Al-Tai

***Alya Jameel Ali Al-Saad**

Basrah University/ College of Agriculture/Food Science

Abstract

Chitosan prepared from Chitin that extracted from shrimp shell (*Penaeus semisulcatus*) by removal acetyl groub from Chitin by chemical methods, water soluble Chitosan derivatives prepared by interaction Chitosan with five types of reducing sugars by Millard reactions at 121 °c for 1/4 hour by autoclaving and at100°c for (1-7) hour, Chitosan derivatives resulting from the interaction carried symbols (Gtd, F td, Ga td, M td, L td) where t reaction temperature, d reaction time, either symbols (G,F,Ga,M and L) represents the sugar (glucose, fructose, galactose, maltose and lactose) respectively,and the properties of these derivatives were studied estimate yield, solubility, stability, free amino groups and the change in reducing sugars. the second treatment Where gave the highest percentage in the value of yield, solubility and stability.The yield value ranged between (30.50- 45.20)% of all derivatives of this treatment, either solubility ranged between (0.68- 1.10) g /100ml and have shown this treatment derivative stability at pH ranged between (7.10 - 10.50), , while the first treatment yield value ranged between (30.0 - 43.50)%, the solubility ranged between (0.450-0.780) g /100 ml, and stability of this treatment at pH ranged between (7.2-10.0) , while all derivatives of the second treatment have less content of free amino groups and sugars containt compared to the first treatment, the absoribtion was (0.201 and 0.060) while the first treatment absoribtion was (0.400 and 0.100).

المصادر

1- Benjakul, S. and Morrissey, M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3423-3430.

2- Brewer, J.M.(1974). Generd techniques : preparation of materials In : Experimental techniques in biochemistry. Brewer, J.M.; pesce, A.J. and Ashwor, R.B. . practice. Techniques in Biochemistry . practice.H all , Inc; Englewood cliffs . New Jersey.

3- Brugnerottoa, J . ; Lizardib, J.; Goycooleab, F.M. ; Argueelles-Monalc,W.; Áresa D,J. and Rinaudoa, M. (2001) . An infrared investigation in relation with chitin and chitosan Characterization . Carbohydrate Polymer, 42 : 3569-3580.
4- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F.(1994). Carbohydrate Analysis. A practical approach. Oxford. IRL Press.

5-Chen, M.X.; Durance,T.D. and Kitts, D.D. (2010). Study the chemical properties in different sugar-amino acid Maillard reaction models. Journal of Food Science, 75: 535-547.
6- Chen, J.L.(2012). Investigation of Film Forming Properties of β-chitosan from Jumbo Squid Pens (*Dosidicus gigas*) and Improvement of Water Solubility of β-chitosan . Tesiss , Department of Food Science and Technology . Oregon State University, :169 .
7- Chung , Y.C.; Kuo, CL.; and Chen ,C.C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. Bioresource Technology , 96(13):1473-1482.
8- Chung, Y. C. ; Fang, C. and Fung, C.(2006). Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Maillard reaction Fisheries Science , 72: 1096–1103.

9- Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M. and Chiellini, E. (2011). Chitosan-a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science, 36(8) : 981–1014.

10- Friedman, M.(1996). Food browning and its prevention: an overview. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 631-653.

11- Jia, Z. ; Shen, D. and Xu ,W. (2001). Synthesis and antibacterial activitiesn of quaternary ammonium salt of chitosan. Carbohydrate Research, 333: 1–6.
12- Kamil, J. Y. ; Jeon, Y. and Shahidi ,F. (2002) . Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (Clupea harengus) . Food Chemistry , 79 : 69–77 .
13- Phisut, N. and Jiraporn, B. (2013). Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. International Food Research Journal, 20(3): 1077-1085.
14- Rao, M.S. ; Chawla,S. P. ; Chander,R. and Shama, A.(2011). Antioxidant potential Millard reaction products formed by irradiation of chitosan – glucose solution. Carbohydrate Polymers, 2 (83) : 714-71.

15- Rodde , R. H. ; Enbu , A. and Varum, K.M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). Carbohydrate Polymers, 71: 388–393.
16- Weerakkody, R. ; Labbett, D. ; Cheng ,L.J. and Kosaraju, S.L. (2011) .Effect of Physicochemical Modifications on Antioxidant Activity of Water-soluble Chitosan. Food Biophysics, 6 (1) :127-132.
17- Xie, W. ; Xu, P. and Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water- soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 11: 1699-1701.
18-Yang ,T.C. ; Chou, C.C. and Li, C.F. (2001). Preparation, water solubility and rheological property of the mono or disaccharide derivetives chitosan derivatives by millard reaction . Food Reserch International , 32: 654–686.

19-Yang ,T.C.; Chou, C.C. and Li, C.F.*(* 2002) . Preparation water solubility and rheological property of the *N*-alkylated mono or disaccharide chitosan derivatives. Food Reserch International , 35: 707–713.
20-Ying, C.; Chung, C. F. and Chin , F. (2006) . Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Maillard reaction Fisheries Science, 72: 1096–1103**.**