مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2014) المجلد (30) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 241-255

إنتاج أغلفة الكيتوزان المُدعّمة بالكينونات المُنتجة إنزيمياً لأغراض التّغليف الحيوي للّحوم الطّازجة

محمّد عبد الله الشيخ علي[1] و نزار عيسى[2] و محمّد محمّد[3]

الملخّص

تمت أمثلة طريقة إنتاج بوليمير الكيتوزان اقتصادياً باستخدام مخلّفات قشور القريدس التي جُمعت من مصادر محلّية، إذْ طُوّر الكيتوزان الذي تم الحصول عليه بتعديله من خلال إخضاع جزيئاته لعملية ربط إنزيمية جزئية، يتوسّطها إنزيم اللّاكاز Laccase بنواتج أكسدة الفينولات (الكينونات) المُستخلصة من نواتج عصر الزيتون الصلبة والسائلة (البيرين) و(الجفت) على الترتيب وأُجريت مقارنة بين كمية الفينولات المُستخلصة من البيرين والجفت. وقد تبيّن تفوّق الجفت على البيرين وهذا ما أدى إلى اختياره بوصفه مصدراً غنياً بالفينولات على المستوى الإنتاجي لتحميلها على الكيتوزان حيث أن للفينولات والكينونات فعالية بيولوجية عالية ضد الميكروبات المُمرضة. صُنّعت أغلفة من الكيتوزان المُحمّل بالكينونات، إذْ أدى إلى الحصول على طريقة حفظ مركّبة وحاجز ضد الأحياء الدقيقة المُمرضة التي تهاجم اللحوم الطازجة التي غالباً ما تُحفظ أو تُباع مكشوفة وغير مُغلّفة؛ ممّا يعرضها لغزو الجراثيم في المسالخ و أماكن البيع. وقد قامت الدراسة بشكل أساسي على إعادة تدوير قشور القريدس غير المفيدة ومخلفات معاصر الزيتون السائلة التي ثبت تلويثها للبيئة.

الكلمات المفتاحية: كيتوزان، جفت، بيرين، أغلفة كيتوزان – كينونات، تغليف حيوي.

[1] طالب ماجستير، [2] باحث في الهيئة العامة للتّقانة الحيوية ومدرس في قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم،جامعة دمشق. [3] أستاذ الكيمياء الحيويّة في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

Production of chitosan films grafted with quinones produced enzymatically for fresh meat bio-packaging

Al-Cheikh Ali, M. A.[(1)], N. Issa[(2)] and M. Mohammad [(3)]

Abstract

The production of chitosan polymer had been cheaply optimized from collected shrimp shell wastes collected from Syrian local sources and the yielded chitosan was modified by subjecting molecules to the process of linking the enzymatic partial and to phenol compounds oxidation residues called quinines. The phenol oxidation was done by Laccase enzyme extracted from olive mill solid wastes (Pyrene) and liquid (jift). The amount of extracted phenols from liquid waste was more successful than the solid wastes and thus, it was chosen as a rich source of phenols for being grafted on the chitosan since both of phenols and quinones had a strong activity towards pathogenic microbes. Films were fabricated from the chitosan that was functionalized with quinones. Thus, a double barrier was designed against pathogenic microbes that usually attack uncovered red and white fresh meat in the slaughters and selling places. On the other hand, the research was mainly based on recycling the shrimp shells and olive mill residues that are useless and environmental pollutants.

Keywords: Chitosa, Jift, Pyrene, Chitosan-Quinones films, Bio-packaging.

[(1)]Master student, [(2)] Assistant Professor, Sci. Fac., [(3)] Prof. Food Sci. Dep Fac. Agric. Damascus Univ. Syria.

المقدمة

تزايد الاهتمام بموضوع الأغلفة الحيوية الصّالحة للاستهلاك البشري بسبب العديد من العوامل منها ما يتعلق بالبيئة وكذلك سهولة التداول وطرائق التخزين الحديثة (تبريد وتجميد) واستبدال المواد بطيئة التحلّل الحيوي كالبلاستيك والبوليميرات الكيميائية (Pérez وزملاؤه، 2006). يؤدي استخدام أغلفة ذات خصائص مضادّة للبكتيريا والفطور في التغليف الحيوي الغذائي إلى الحد من الحمولة الميكروبية، إذْ يستهدف أحياء دقيقة محددة مما يضمن سلامة وجودة أفضل للمنتج (Ahmed وVarshney، 2011)؛ ومن هنا اكتسبت أغلفة الكيتوزان أهميتها، والكيتوزان مادة شبه ليفية مشتقة من الكيتين، وهو بوليمير متجانس من وحدات N – أسيتيل – D – غلوكوز أمين مرتبطة مع بعضها بروابط (4→1)-β، وهو بوليمير حيوي يتم الحصول عليه بسهولة من الهيكل الخارجي للحشرات، وكذلك من بعض الحيوانات البحرية كالقريدس، سرطان البحر، والقواقع ومن القشرة الخارجية المتصلّبة للفطور، وينتج الكيتوزان بنزع أسْتلة الكيتين من الكربون الثاني بالمعالجة بمادة قلوية عالية التركيز (Hafdani وSadeghinia، 2011).

تعدُّ أغلفة الكيتوزان مثالية بسبب خصائصها الممانعة لنفوذ الغازات التي تعزى إلى الروابط بين جزيئاته على طول السلسلة بين مجموعات الأمين والكربونيل (Jones، 2010). ومن خصائص أغلفة الكيتوزان أنها ذات بنية متجانسة ومستقرة غير نفوذة للماء و تتمتع أيضاً بخصائص ميكانيكية مناسبة كالمرونة وقابلية التشكيل (Rabea وزملاؤه، 2003). تتحلّل أغلفة الكيتوزان حيويّاً بفضل إنزيمات الكيتوزاناز المختصة بالحلمهة الداخلية للروابط (4→1)-β التي تربط جزيئات الكيتوزان، وتوجد هذه الإنزيمات في العديد من الأحياء الدقيقة منها البكتيريا إذْ تفرزها 1–7 % من بكتيريا التربة، كما تُفرز من قبل الفطور والنباتات وبعض أنواع الفيروسات (Rafaat وزملاؤه، 2009). وهي صالحة للاستهلاك البشري في حال لم تُنزع عن المُنتج الذي تُغلفه إذ إنّ وظيفتها الأساسية هي حفظ اللّحوم الطّازجة أو المجمدة مدة طويلة بعيداً عن غزو الأحياء الدقيقة وخاصة الممرضة وهي غير قابلة للهضم في جسم الإنسان (Thumula، 2006). تتكون المركبات الفينولية من زمرة فينيل ($-C_6H_5$) مرتبطة بزمرة هيدروكسيل (-OH)، ومن مصادرها النواتج الثانوية الفينولات لعمليات الاستقلاب في النباتات، ولها فعالية مضادة للبكتيريا والفطور وخواص مضادّة للأكسدة (Lee وزملاؤه، 2010) وقد اختير إنزيم اللّاكاز كمؤكسد للفينولات لأنه يؤكسد طيفاً واسعاً من المركبات الفينولية (Prasetyo وزملاؤه، 2010). يضمن التحميل الإنزيمي لنواتج أكسدة الفينولات وهي (الكينونات) على الكيتوزان ثبات الفينولات المؤكسَدة على جزيئات الكيتوزان؛ لأن الفينولات ستتأكسد جزئياً بفعل إنزيمات بولي فينول أوكسيداز إلى كينونات ترتبط بشكل مباشر وقوي مع المجموعات الأمينية ($+NH_2$) الموجودة في بنية جزيئات الكيتوزان (Issa، 2009) مما

يزيد من فعالية أغلفة الكيتوزان المضادة للبكتيريا والفطور والعوامل الممرضة التي تهاجم اللحوم الطازجة والأغذية عموماً وهذه الفعالية يتمتع بها الكيتوزان بشكل طبيعي (Dutta وزملاؤه، 2009 وTripathi وزملاؤه، 2011). يؤدي التفاعل بين جزيئات الكيتوزان المشحونة إيجاباً مع أغشية الميكروبات المشحونة سلباً إلى ارتشاح خارجي للبروتينات والمكونات الأخرى للميكروبات (Limam وزملاؤه، 2011) وتزداد فعالية الكيتوزان المُحمّل بالفينولات أو الكينونات بشكل كبير وهذا ما ثبت في أبحاث (Pereira وزملاؤه، 2007) والتي تقضي بفعالية الفينولات أو الكينونات ضد الميكروبات؛ وهذا يضمن قدرة أغلفة الكيتوزان المعّدلة القضاء على نطاق أوسع من الأحياء الدقيقة الممرضة التي تهاجم اللحوم، فضلاً عن أن المركبات الفينولية تتميّز بخصائص مضادة للأكسدة طبيعية (Duarte وزملاؤه، 2012) مما يمكّنها من أداء دور مهم في تمديد مدة حفظ المنتج الغذائي.

الأهداف

إنتاج أغلفة حيويّة يمكن استخدامها في تغليف اللحوم الطازجة أو المُعدّة للتبريد أو التجميد بهدف إطالة مدة حفظها؛ وذلك من مخلفات حيوانية ونباتية كمصدر للكيتين الذي يشكل مادة أولية للكيتوزان.

مواد البحث وطرائقه

مكان إجراء البحث:

الهيئة العامة للتقانات الحيوية NCBT مخبر التقانات الحيوية الصيدلانية في جامعة دمشق، ومخابر كلية الزراعة وكلية العلوم في جامعة دمشق؛ والمخبر المركزي التابع لوزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك في دمشق.

جُمعت عينات قشور القريدس بشكل رئيسي من مزارع القريدس والمسامك الموجودة في المدن الساحلية السورية، وكذلك من الفنادق ومطاعم الأغذية البحرية في مدينة دمشق. وقد غُلفت القشور ضمن أكياس بلاستيكية شفافة من البولي إيثيلين، ثم نُقلت إلى المخبر حيث حُفظت في درجة حرارة التجميد (– 20 C°) إلى حين الاستخدام.

المعالجة الأولية للقشور: غُسلت القشور بشكل جيد بالماء الدافئ ثمّ بالماء المقطر عدة مرات وتُركت لتجف تحت أشعة الشمس مدة 24 ساعة، ثمّ طُحنت العينات في مطحنة مخبرية ألمانية الصنع من طراز (Janke وKunkel IKA) إلى أن تحولت إلى بودرة ناعمة لعزل الكيتين منها.

عزل الكيتين: عُزل الكيتين بحسب Khanafari وزملائه (2007) مع إجراء بعض التعديلات من حيث زيادة قساوة شروط العزل بما يضمن الحصول على أكبر كمية من

الكيتين (وتتضمن التعديلات زيادة زمن المعاملة في المحلول الحمضي، ورفع تراكيز المحلول القلوي NaOH المستخدمة، وكذلك رفع درجات الحرارة المُطبّقة) إذ وُضعت القشور المطحونة في محلول HCL ذي التركيز 4 % مدة 72 ساعة ثم غُسلت البودرة بالماء المقطر بهدف رفع قيمة pH إلى ما بين 6.5–7، بعد ذلك وُضعت في محلول قلوي من NaOH بتركيز 10 % ضمن وعاء زجاجي مقاوم للحرارة العالية ووُضع الأخير في حمام مائي ياباني الصنع من طراز (Advantec، TS-200) على الدرجة 70 C° مدة 48 ساعة بهدف نزع البروتينات التي تكون متبقية في أسفل القشور بعد نزعها عن القريدس، ثم غُسلت البودرة بالماء المقطر جيداً حتى pH مساوية إلى 7 وجُفّفت في الدرجة 40 – 50 C° مدة 3 ساعات.

نزع أستلة الكيتين والحصول على الكيتوزان وقياس درجة نزع الأستلة: حُضّر الكيتوزان بمعاملة الكيتين بمحلول مائي من هيدروكسيد الصوديوم (1:1، وزن/ وزن) ضمن وعاء زجاجي مقاوم للحرارة العالية، ثمّ وُضع الوعاء في الحمّام مائي في درجة حرارة تبلغ 90 C° مدة 2 ساعة حتى ينتج الكيتوزان، وبعد نزع الأستلة تم التخلّص من المحلول القلوي وغُسل الكيتوزان بالماء المقطر حتى تصل قيمة pH إلى 7 وجُفّف بدرجة حرارة الغرفة بحسب Limam وزملائه، (2011). تُعبّر درجة نزع الأستلة عن النسبة المئوية لوحدات الغلوكوز من بوليمير الكيتوزان التي نُزعت منها زمرة الأستيل CH3CO أي هي نسبة وحدات (D– غلوكوز أمين / N- أستيل ــ D– غلوكوز أمين البنيوية) *100 وتؤثر درجة نزع الأستلة على مدى امتصاص الرطوبة، وتوزُّع الشحنة، اللزوجة وانحلالية الكيتوزان في المحاليل المائية (Rafaat وزملائه، 2009) وقد قيست درجة نزع أستلة الكيتين بشكل غير مباشر وفق طريقة Liu وزملائه (2006) بواسطة جهاز قياس الامتصاصية الضوئية سبيكتروفوتومتر، وللحساب طُبقت معادلة تربط بين درجة نزع الأستلة وقيم امتصاصية محلول الكيتوزان.

استخلاص الفينولات من ثفل الزيتون: جرى اعتيان المخلفات الصلبة لثفل الزيتون (البيرين) من إحدى معاصر مدينة مصياف في محافظة حماه واعتيان المخلفات السائلة لثفل الزيتون (الجفت) من إحدى معاصر مدينة السويداء، ونُفذت طريقتين للاستخلاص، وهما كالآتي:

الطريقة الأولى لاستخلاص الفينولات من البيرين: استُخلصت الفينولات بحسب طريقة Winkelhausen وزملائه (2005) إذْ جُفّفت بقايا الزيتون الصّلبة والسائلة على الدرجة 60 C°، وحُفظت بأكياس بلاستيكية تحت تفريغ، وخُزّنت في درجة حرارة 4C° إلى حين الاستخدام. استُخلص الثفل كخطوة أولى من البقايا على ثلاث مراحل متعاقبة باستخدام مذيب الهكسان بمعدل 1:4 (وزن/حجم) لإزالة بقايا الزيت والصبغات حيث خُلط الثفل مع الهكسان بواسطة خلاّط بذراع دوراني كوري الصنع من طراز

(HG-15D ،Lab Tech)، وفي الخطوة الثانية استُخلصت الفينولات من الثفل باستخدام مزيج من الماء والإيتانول بنسبة حجمية 1:1 مع رفع قيمة pH إلى 9 باستخدام NaOH. وجرى استخلاص الفينولات من الثفل وفق نسبة محدّدة بين الثفل ومزيج الاستخلاص إذْ إنَّ كل واحد غرام من الثفل استُخدم ستة أضعافه حجماً من مزيج الاستخلاص. وبعد ذلك فلتر مستخلص الإيتانول الكلي (0، 45 مم) بعد استخلاصين متعاقبين بمضخة فلترة تحت الفراغ ألمانية الصنع من طراز (Boeco، R-300) ووُضع في مبخر دوراني تشيكي الصنع من طراز (INGOS RVO-400،) في الدرجة 30 C° والضغط 9 ميلي بار حتى تبخّر أكثر من نصف الحجم وخُزّن هذا المستخلص في الظلام في الدرجة 4 C°.

الطريقة الثانية لاستخلاص الفينولات من الجفت: استُخلصت الفينولات بحسب طريقة Afify وزملائه (2009)، إذْ مُزج 10 مل من الجفت مع 15 مل من الهكسان في أنبوب تثفيل ورُجّ المزيج، ثم ثُفّل مدة 5 دقائق 3000 دورة/دقيقة بمثفلة ألمانية الصنع من طراز (Tuttlingen، D-78532) فانفصل المزيج إلى طورين، وكرّر الغسيل بالهكسان مرتين متعاقبتين، وبعد أن خُفضت قيمة pH إلى 2 من خلال إضافة HCL استُخلصت الفينولات بإضافة 10 مل من الإيثيل أسيتات وفصلت الأطوار، وكُرّرت عمليةَ الاستخلاص أربع مرات متعاقبة، وبعد ذلك بُخّر الإيثيل أسيتات تحت تفريغ هواء، وحُلّت الخُلاصة الصلبة بكمية 3 مل من الميتانول، وحُفظ هذا المحلول إلى حين استخدامه لتقدير الفينولات.

التقدير الكمي للفينولات باستخدام جهاز قياس المطيافية الضوئي (السبيكتروفوتومتر): استُخدم جهاز المطيافية الضوئية بريطاني الصنع من طراز (PG Instrment، Ltd-T70S) لتقدير الفينولات الكلية بحسب طريقة كاشف فولين Folin Ciocalteu (Asami وزملاؤه، 2003) الذي يعتمد على إرجاع معقد (Phosphowolframate - Phosphohomolybdate) الموجودة في الكاشف بواسطة الفينولات إلى منتجات تفاعل زرقاء اللون، وهي الطريقة العالمية المتبعة لتحديد الفينولات إذْ أُخذ 2 مل الخلاصة الفينولية التي سبق تحضيرها وأُضيف إليها 3 مل من الماء المقطر و0.2 مل من كاشف فولين ووُضعت في دورق عياري سعة 10 مل، ثم رُجّ المزيج باستخدام محرك الأنابيب نحو دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم أُضيف بعد ذلك 4 مل من كربونات الصوديوم Na_2CO_3 بتركيز 7 % وأُكمل الحجم بالماء المقطر حتى حجم 10 مل عند العلامة، خلط المزيج السابق وتُرك مدة ساعتين بدرجة حرارة الغرفة، وبعدها ثُفّل ورُشّح وقيست امتصاصيته بجهاز قياس المطيافية الضوئي على طول الموجة 750 نانو متراً. استُعمل محلول حمض الغاليك كمحلول عياري مرجعي لتحضير المنحنى العياري بتراكيز 0.2، 0.4، 0.6، 0.8، 1 غ حمض غاليك/ 5 مل ميتانول.

التقدير النوعي للفينولات الكلّية في البيرين والجفت باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC: نُفّذ تحليل المركبات الفينولية بحسب طريقة Estevinho

وزملائه (2008) في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء من طراز HPLC)، (Shimadzu-class vp ياباني الصنع مُزوّد بمضخّة موديل LC-10AT vp وبكاشف UV موديل SPD-10A vp وعمود فصل C18. حيث تُحقن العينات في نظام HPLC بعمود C18 ذي درجة حرارة مضبوطة على 35.2 C°. وتألّف الطور المتحرك من محلول واقٍ من حمض الفوسفور ذي درجة الحموضة pH تبلغ 2.5 ووُصِل وعاء المحلول الواقيِ على أنبوب المضخة A، وفي الوعاء الثاني وُصل الميتانول علَى أنبوب المضخة B وحجم الحقنة الواحدة لكل عينة كان 10 ميكرولترات ومعدّل التدفق كان 0.5 مل/ دقيقة وطُبّق البرنامج الحراري المُتدرّج الآتي: 83 – 95 % A (10 دقيقة)، 74–83 % A (10 دقيقة)، 42–74 % A (20 دقيقة)، 5–42 % A (10 دقيقة) و5–95 % A (10 دقيقة). حُلّلت الفلافونويدات والحموض الفينولية على طول الموجة 280 نانومتراً، وحُدّدتْ هويتها بمقارنتها بزمن احتباس القمم وأطياف فينولية تجارية كشواهد.

تفاعل التّحميل الإنزيمي لنواتج أكسدة الفينولات (الكينونات) على الكيتوزان: اتّبعت طريقة Issa (2009) لتعديل جزيئات الكيتوزان بالكينونات حيث حُضّر محلول واقٍ من فوسفات الصوديوم ذي قيمة pH تبلغ 7.5 لضبط درجة الحموضة، باعتبار الفينولات حسّاسة لدرجة الحموضة، إذْ وُضع 13.46 مل، من المحلول الواقي النهائي ذي pH تبلغ 7.5 في بيشر حجم 15 مل ثم وُضع على جهاز الرج المغناطيسي الدّوار ألماني الصنع من طراز (Boeco)، MSH-300 500 دورة/ دقيقة مع ضبط درجة الحرارة على 30 C°، ثم أضيف 1.5 مل من خلاصة إيثيل أسيتات الأغنى بالفينولات، وأُضيف 0.3 غ من الكيتوزان المُنتج، وكذلك 400 وحدة من إنزيم اللاّكاز Laccase تركيزه 13.6 وحدة إنزيمية/ مغ أي ما يُعادل 0.03 غ منه، وتُرك المزيج على التحريك مدة 4 ساعات. بعد 4 ساعات رُشّح محلول الكيتوزان الملوّن بالأحمر الغامق الذي يدل على تشبّعه بالكينونات، وأخيراً تُرك الكيتوزان الملوّن بالكينونات ليجف بدرجة حرارة الغرفة مدة 4 أيام ليُستخدم في صناعة الأغلفة المُعدّلة.

صناعة أغلفة (الكيتوزان – كينونات) الملونة: استُخدم في صناعة أغلفة الكيتوزان المُعدّلة طريقة Issa (2009) التي تقضي بحل 0.3 غ من الكيتوزان المُعدّل (المُحمّل بالكينونات) في 19 مل من الماء المقطر، وأُضيف إليه حمض كلور الماء ذو التركيز 2 مول/ لتر حتى أصبحت قيمة pH المحلول تراوح بين 2 – 3، ثم وُضع المحلول على التحريك مدة 24 ساعة، وبعد ذلك أُجريت عملية ترشيح المحلول بمضخة تحت التفريغ، ومن ثم أُخذ 2 مل من الرشاحة ووضعناها في طبق بيتري قطره 3.5 سم ووُضع الطبق في فرن تجفيف بريطاني الصنع من طِراز (Carbolite، PF-60) في الدرجة 60 C° مدة ليلة واحدة، وبعدها تشكّل الغلاف وغُمر الغلاف بمحلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH ذي التركيز 1 مول/ لتر مدة 5 ساعات حتى يجري انتزاعه بسهولة، إذْ إنَّ الكيتوزان

يترسب في المحاليل القلوية، وبعد ذلك نُزع الغلاف وغُسل بالماء المقطر حتى بلغت قيمة pH الغلاف 7.5، وحُفظ في محلول واقٍ فوسفاتي ذي pH مساوية إلى 7.5 وتركيزه 50 ميلي مول/ لتر. وكتجربة شاهد طُبّقتْ تماماً الخطوات السابقة نفسها على الكيتوزان الخام غير المُعدّل للمقارنة بينهما من حيث الفعّالية المضادة للبكتيريا والفطور.

النتائج والمناقشة

مردود استخلاص الكيتين والكيتوزان وقيمة درجة نزع أستلة الكيتوزان: كان مردود الكيتين من القشور الخام 42% ومردود الكيتوزان من الكيتين 18%، وهذا موافق إلى حد كبير لنتيجة Andrade وزملائه (2012) التي توضح أن مردود الكيتين من القريدس 41%، ومردود الكيتوزان من الكيتين 22%، وكانت قيمة درجة نزع الأستلة للكيتوزان الذي أُنتج 84%، وهي مناسبة لصناعة الأغلفة وتعدُّ ممتازة مقارنة بدرجة نزع أستلة الكيتوزان التجاري 80% وهذه النتيجة تؤكد أن الطريقة التي طوّرت في استخلاص الكيتين والكيتوزان بحيث تخدم أهداف البحث للوصول إلى كيتوزان بدرجة نزع أستلة أكبر بالمقارنة بالكيتوزان التجاري وهي طريقة مثلى وهذا ما يجعل الكيتوزان المُحضّر بهذه الطريقة أكثر فعّالية لاستقطاب المركبات الكينونية الناتجة عن أكسدة الفينولات المستخلصة من جفت الزيتون.

مقارنة المردود الناتج عن طريقتي استخلاص الفينولات: يبيّن الجدول (1) كميات الخلاصات الفينولية في عينتي الجفت والبيرين في كلتا الطريقتين المستخدمتين مقدرة بـــ غرام/100غ عينة.

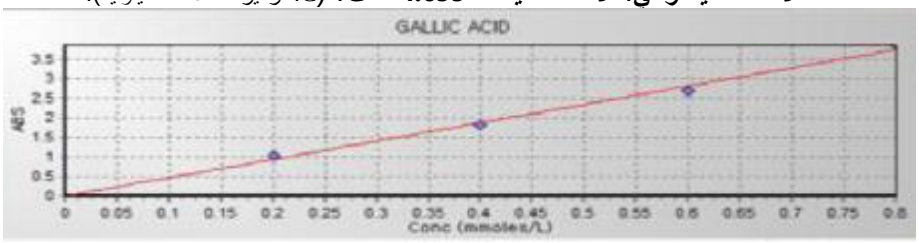
الجدول (1) كميات الخلاصات الفينولية في عينتي الجفت و البيرين حسب الطريقة المستخدمة.

نوع المذيب	خلاصة الفينول في البيرين %	خلاصة الفينول في الجفت%
كلوروفورم – طريقة 1	1.2	8
ميتانول – طريقة 1	2.6	5.6
إيثيل أسيتات – طريقة 2	2.5	2.6

بالنسبة إلى طريقة الاستخلاص الأولى التي اعتُمدت في البحث والمختصة بالبيرين فقد أشار Winkelhausen وزملائه (2005) إلى أن نسبة الفينولات الكلية المستخلصة من البيرين بالنسبة إلى الوزن الجاف بالطريقة ذاتها بلغت 2.43%. أمَّا بالنسبة إلى الطريقة الثانية في الاستخلاص التي اعتُمدت في البحث والمختصة بالجفت فقد أشار Afify وزملائه (2009) إلى أن نسبة الفينولات الكلية المستخلصة من الجفت بالطريقة ذاتها بلغت 3.46 غ/ 100 مل جفت، وكانت النسب التي حُصل عليها في البحث متوافقة مع هذه النسبة.

نتائج التقدير الكمي للفينولات باستخدام جهاز المطيافية سبيكتروفوتومتر: حُضّر في البداية محلول أم من حمض الغاليك بتركيز 5 ميلي مول/ لتر، وهو التركيز المُقترح الذي يمكن بموجبه اقتصاد كمية حمض الغاليك، يمكن اشتقاق تراكيز السلسلة العيارية بسهولة منهُ، وبعد تمرير تراكيز السلسلة العيارية على جهاز قياس الامتصاصية وقياس امتصاصية التراكيز على طول الموجة 306 نانو متراً وحُصل على المنحنى العياري الموضح بالشكل الذي حصلنا منه على معادلة الامتصاصية العامة، ومنها انطلقنا في حساب تركيز الخلاصة الفينولية في كل من عينات البيرين والجفت مقدرة على أساس وحدة حمض الغاليك.

الشكل (1) المنحنى العياري لمحلول حمض الغاليك وبشكل أوتوماتيكي أعطى الجهاز معادلة الامتصاصية وهي: الامتصاصية = 4.699 * C. (C: تركيز الخلاصة الفينولية).



يوضّح الجدول (2) قراءات الامتصاصية والتركيز الموافق بالنسبة إلى عينتي الجفت والبيرين.

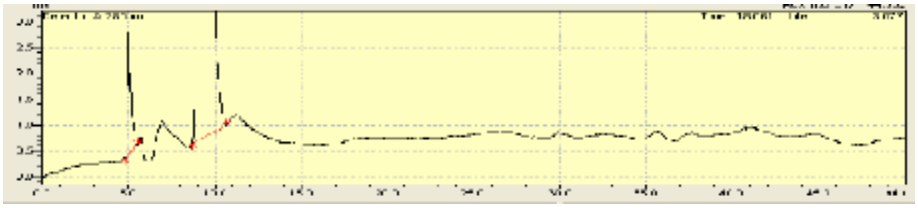
الجدول (2)

المذيب المستخدم في الاستخلاص	متوسط قراءات الامتصاصية على طول الموجة 750 نانو متراً		التركيز مغ / 100 غ على أساس حمض الغاليك	
	جفت	بيرين	جفت	بيرين
الكلوروفورم	0.952	1.384	340	494
إيثيل أسيتات	1.395	1.147	486	400
ميتانول	0.919	0.945	340	347

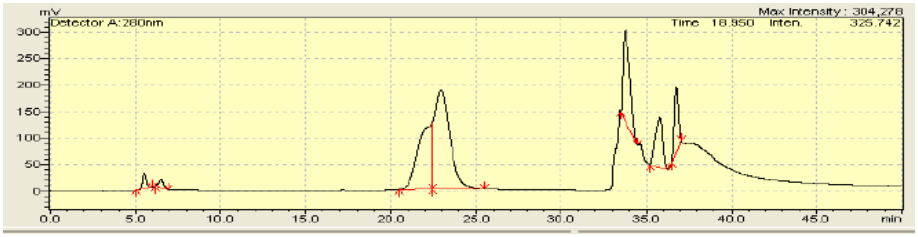
بملاحظة قيم متوسط الامتصاصية لعينات الجفت والبيرين تبيّن أن أفضل مذيب لاستخلاص الفينولات الكلية من البيرين هو الكلوروفورم لأنه أعطى قيمة الامتصاص (1.384)، وهي الأعلى بين الطرائق المستخدمة جميعها، ودليل على أنه تفوق على الميتانول وإيثيل أسيتات باستخلاص أكبر كمية من الفينولات، وهذا ما يرشح استخدامه بوصفه مذيباً فعّالاً في استخلاص الفينولات من المخلفات الصلبة لثفل الزيتون، أمّا بالنسبة إلى الجفت فقد تفوق مذيب إيثيل أسيتات على الميتانول والكلوروفورم في استخلاص

الفينولات من المخلفات السائلة لثفل الزيتون (الجفت)؛ لأنه أعطى قيمة الامتصاصية العليا (1.395)؛ لذلك يمكن ترشيحه كمذيب فعال في استخلاص الفينولات الكلية من الجفت.

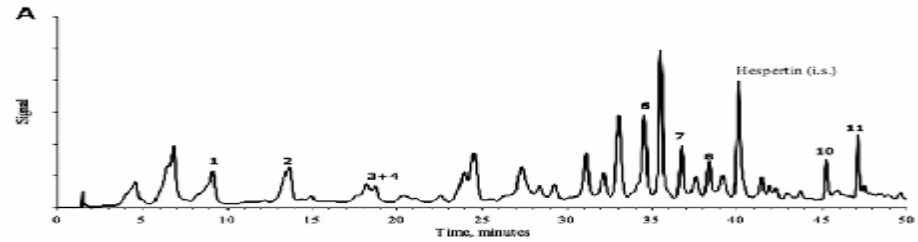
نتائج التقدير النوعي للفينولات الكلّية باستخدام HPLC: عُرفتْ هويــة المركبــات الفينولية -كل على حدة- في كل من عينتي الجفت والبيرين من خلال المقارنة بــشواهد فينولية. (الأشكال 2، 3، 4)



الشكل (2) القمم التي تدل على المركبات الفينولية في عينة البيرين



الشكل (3) القمم التي تدل على المركبات الفينولية في عينة الجفت



الــشكل (4) أطيــاف الــستاندرات وهــي الحمــوض الفينوليــة: (1) Protocatequic acid (2) Hydroxibenzoic acid (3) Caffeic acid (4) Chlorogeic acid (5) P-Coumaic acid (6) Ellagic acid (7) Cinnamic acid والفلافونويــدات: (8) Naringenin (9) Kaempferol (10) Pinocembrin (11) Chrysin.

بمقارنة أشكال القمم وزمن الاحتباس في العمود (Retention Time) في تحليل HPLC لعينة البيرين مع أشكال قمم وزمن الاحتباس للشواهد المحقونة في الشروط نفسها نلاحظ أنه عند زمن الاحتباس 5 دقيقة ظهر المذيب، وهو الميتانول، وعند الزمن 9.44 دقيقة ظهــرت قمة، وهي تعبر عن الحمض الفينولي Protocatequic acid. ومن ثمَّ فإن عينــة البيــرين

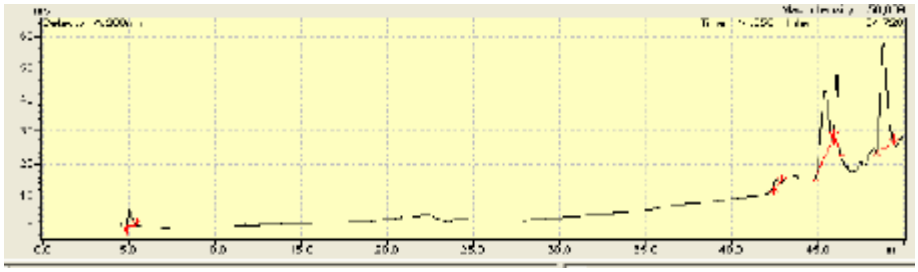
فقيرة بالفينولات ويعود ذلك إلى خضوع البيرين لعدة معالجات فيزيائية وكيميائية في معاصر الزيتون لاسترجاع نسبة الزيت المتبقية التي يحتويها، وهذا قد يؤثر في محتواه من الفينولات الحساسة للتغيرات مثل درجة الحموضة والحرارة وغيرها. وهذا ما أكّده تحليل HPLC الذي أُجري فبمقارنة أشكال القمم وزمن الاحتباس في العمود لعينة الجفت (المخلفات السائلة) ظهر الميتانول على الزمن 5.4 دقيقة، وظهرت بعد ذلك مجموعة حمض البينزوئيك، وهي (Caffeic acid الذي ظهر على الزمن 22.4، وChlorogeic acid الذي ظهر على الزمن 22.9، وP-Coumari الذي ظهر على الزمن 33.76 وظهر Ellagic acidعلى الزمن 35.7) وأخيراً ظهرت مجموعة حمض السيناميك Cinnamic acid على الزمن 36.7، وهي تعبّر عن حمضي الفيروليك والسينابيك Ferulic acid وsynapic acid. لوحظ أن الفينولات جميعها التي ظهرت في التحليل الكروماتوغرافي لعينتي الجفت والبيرين هي أحماض فينولية، في حين لم تتفصل الفلافونويدات بسبب وزنها الجزيئي العالي فهي معقدات فينولية منخفضة القطبية بالمقارنة بالحموض الفينولية، أو أن الجفت والبيرين لا يحتويان على الفلافونويدات. وقد توصلت دراسة مشابهة أجراها Obied وزملاؤه (2005) واختصت باسترجاع الفينولات الثنائية من جفت الزيتون إلى أن الفينولات البسيطة الأحادية في جفت الزيتون ظهرت في تحليل HPLC قبل الفينولات الثنائية، وهذه الأخيرة ظهرت قبل الفلافينويدات، وأخيراً ظهرت المعقدات البوليميرية. ويعود السبب في ظهور مجموعة حمض البنزوئيك على الكروماتوغرام قبل مجموعة حمض السيناميك إلى الوزن الجزيئي المنخفض والقطبية العالية لمجوعة حمض البنزوئيك إذْ إنّها الأغنى بزمر الهيدروكسيل -OH المسبّبة للقطبية، وهذا ما أدى إلى اختيار رشاحة إيثيل أستات التي نتجت عند استخلاص للفينولات من الجفت بتحميل فينولاتها على جزيئات الكيتوزان لصناعة الأغلفة المُعدّلة من بين الرشاحات جميعها لأنها احتوت على أكبر كمية من الحموض الفينولية، وهذا ما دعى لاستخدام الجفت كمصدر غني بالفينولات على المستوى الإنتاجي في التغليف الحيوي للّحوم.

نتائج تحميل الكينونات على الكيتوزان: رُوقبت وسُجّلت الدرجة اللونية للمحلول خلال تفاعل التحميل التي تُعبّر عن نشاط إنزيم اللاكاز في أكسدة الفينولات إلى كينونات ملوّنة (الجدول 3).

الجدول (3) الدرجات اللونية المأخوذة خلال 4 ساعات والزمن بالدقائق لتفاعل تحميل الكينونات الملوّنة على جزيئات الكيتوزان.

الزمن	0	5	10	15	30	45	
اللون	أصفر فاتح	بني فاتح	بني فاتح	برتقالي غامق	برتقالي غامق	برتقالي غامق	
الزمن	60	90	120	150	180	220	250
اللون	برتقالي غامق	أحمر فاتح	أحمر غامق	أحمر غامق	أحمر غامق	أحمر غامق	أحمرغامق جداً

كان لون الكيتوزان المُعدّل في نهاية التفاعل أحمرَ غامقاً، وبعد التجفيف بدرجة حرارة الغرفة مدة 4 أيام وجدنا أن الكيتوزان قد بقي محافظاً على لونه، وذا ما يؤكد أن اللون لا يتأثر بالعوامل الخارجية كالضوء والحرارة ويؤكد أيضاً ثباتية المركبات الناتجة عن أكسدة الفينولات الموجودة في الخلاصة بعد التصاقها مع الكيتوزان، وعلى الأغلب أنه يوجد ارتباط كيميائي من نوع روابط مضاعفة نشأت بين الكينونات ومجموعات NH_2+ للكيتوزان، وهذا ما يُفسر ثباتية اللون. وتؤكد الدراسة المشابهة في جامعة نانسي في فرنسا التي أجراها Issa (2009) ثبات لون الكيتوزان بعد تحميله بنواتج أكسدة الفينولات. لمعرفة نسبة الفينولات التي تأكسدت إلى كينونات ملونة ارتبطت مع الكيتوزان، أُخذ مقدار 100 ميكرو لتر من الرشاحة ضمن 900 ميكرولتر من الميتانول لإجراء تحليل كروماتوغرافي HPLC عليها، وأجرينا التحليل على غرار البروتوكول الذي اتُبع سابقاً لتحديد الفينولات الكلية قبل تحميلها على الكيتوزان، وقورنت النتائج التي تمّ الحصول عليها بنتائج قياس الفينولات الكلية قبل التحميل؛ وذلك بمقارنة ارتفاعات قيم الامتصاصية للفينولات بعد الأكسدة بارتفاعاتها قبل الأكسدة.



الشكل (6) يوضّح الفينولات المتبقية في عينة الجفت بعد الأكسدة بإنزيم اللّاكاز

بملاحظة الكروماتوغرام تبيّن أنه ظهرت قمة المذيب وهو الميتانول على الزمن 5، وظهرت عدة قمم على الزمن 42، 45، 46 و48، وبسبب عدم ظهور قمم الحموض الفينولية التي ظهرت قبل تفاعل الأكسدة يمكن القول: إنّها قد تأكسدت بشكل كامل إلى كينونات، إذ إنّ قسماً من هذه الكينونات ارتبط مع زمر NH_2+ للكيتوزان وشكّل الكيتوزان المُعدّل، وقسماً منها بقي غير مرتبط في الرشاحة إذْ تعرّضت لتفاعلات بلمرة حيث اتّحدت الكينونات فيما بينها لتشكل معقدات كينونية ثنائية، ثلاثية ورباعية مما يزيد من وزنها الجزيئي ويُؤخر زمن فصلها، وهذا ما حصل مع مجموعتي حمض البنزوئيك والسيناميك اللتين تأكسدتا بشكل كامل وتحولت حموضها الفينولية إلى منتجات أكسدة بفعل إنزيم اللّاكاز، وهي المعقدات الكينونيّة، وظهرت قممها لاحقاً كون وزنها الجزيئي أعلى بالمقارنة بالفينولات الأم قبل الأكسدة، وهذا التفسير خلُصت إليه دراسة مشابهة أُجريت من قبل Mustafa وزملائه (2005)، وكان موضوعها عن الملوّنات الفينوليّة المُستحصلة

بالاصطناع الإنزيمي باستخدام إنزيم اللّاكاز الفطري الذي حوّل حمض الفيروليك (وهو حمض فينولي استخدم في البحث) إلى كينونات، أنصاف كينونات وجذور فيروليل ونواتج الأكسدة الثانوية هذه غير مستقرة في المحاليل المائية فلا تلبث أن تتبلمر مباشرة من دون مساعدة الإنزيم لتشكل معقدات ثانوية مستقرة ذات لون بني مما زاد من وزنها الجزيئي وخفّض من قطبيتها فتأخر فصلها في عمود HPLC على غرار حمض الفيروليك الذي ظهر أولاً بسبب انخفاض وزنه الجزيئي وارتفاع قطبيته أمام المعقدات الكينونية.

واستنتج أن أفضل طريقة لاستخلاص للكيتوزان المُعد لصناعة الأغلفة الحيوية من قشور القريدس، تتمثّل بمعاملة القشور بحمض كلور الماء تركيز بين 4 – 7 % على البارد مدة تراوح من 24 – 72 ساعة، في حين يفضل لنزع البروتينات تُفضل المعاملة بوسط قلوي بتركيز من 8-12 % على الدرجة 60 C° مدة 36 – 48 ساعة، ويفضل لتحقيق تفاعل نزع الأستلة المعاملة بوسط قلوي عالي التركيز على درجة الغليان مدة 1 – 3 ساعة. ويُنصح باستخدام المخلفات السائلة لعصر الزيتون بوصفها مصدراً غنياً بالفينولات، ويُنصح بمذيب الإيتيل أسيتات بوصفها مذيباً فعالاً في الاستخلاص، وعدم تسريع تفاعل تكوّن أغلفة الكيتوزان المُعدّلة برفع درجة الحرارة لتبخير الحمض بل يجب ترك محاليل الأغلفة بدرجة حرارة الغرفة، ويجب مراقبة تشكلها كل 6 ساعات.

References المراجع

Afify, A. S., M. A. Mahmoud, H. A. Emara and A. I. Khadega. 2009. Phenolic compounds and COD removal from olive mill wastewater by chemical and biological procedures. Australian journal of basic and applied sciences. 3(2):1087-1095.

Ahmed, J and S. K. Varshney. 2011. Polylactides Chemistry, Properties and green packaging technology. International journal of food properties. 14:37–58.

Andrade, S.M.B., R. Ladchumandasivam, B. G. Rocha., D. D. Belarmino and A. O. Galvao. 2012. The use of exoskeletons of shrimp (*litopenaeus vanammei*) and crab (*ucides cordatus*) for the extraction of chitosan and production of nanomembrane. Materials sciences and applications. 3: 495–508.

Asami, D. K., Y. J, Hong., D. M. Barett and A. E, Mitcell. 2003. Comparasion of the total phenol and ascorbic acid content of freeze-dried and air dried mariano berry, strawberry and corn grown using conventional and sustainable agricultural pesticides. Journal of agriculture and food chemistry. 51(5): 1237–1241.

Dutta, P. K., S. Tripathi., G. K. Mehrotra and J. Dutta. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food chemistry. 114: 1173-1182

Duarte, A. P., Â, Luís., N, Gil and M. E. Amaral. 2012. Antioxidant activities of extracts from *acacia melanoxylon, olea europaea* and alkaloids estimation. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 4(1): 225-231.

Estevinho, L., A. P. Pereira, L, Moreira, L. G. Dias and E. Pereira. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of northeast portugal honey. Food and chemical toxicology. 46: 3774–3779.

Hafdani, F. N. and N. Sadeghinia. 2011. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. World academy of science, engineering and technology. 74: 257-261.

Issa, N. 2009. Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *myceliophthora thermophila*: application a la fonctionalisation du chitosane. Phd thesis at institut polytechniqe de lorrine, france.

Jones, J. B. 2010. Physical characteristics and metal binding applications of chitosan films. Master thesis at University of Tennessee, Knoxville. USA.

Khanafari, A., R. Marandi and Sh. Sanatei. 2007. Recovery of chitin and chitosan from shrimp wastes b chemical and microbial methods. Journal of environmental health science and engineering. 5(1): 19-24.

Limam, Z., S. Selmi., S. Sadok and A. El Abed. 2011. Extraction and characterization of chitin and chitosan from crustacean by-products: biological and physicochemical properties. African journal of biotechnology. 10(4): 640-647.

Liu, D., Y, Wei., P, Yao and L. Jiang. 2006. Determination of the degree of acetylation of chitosan by uv spectrophotometry using dual standards. Carbohydrate research. 341: 782-785.

Mustafa, R., L, Muniglia., B, Rovel and M, Girardin. 2005. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydro-organic biphasic system. Food research international. France. 38: 995-1000.

Obied, H.K., M. S. Allen., D. R. Bedgood, P. D. Prenzler, K. Robards and R. Stockmann. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. Journal of agriculture and food science. 53: 823-837.

Lee, O. H and B. Y, Lee. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *olea europea* leaf extract. Bioscience and technology. 101: 3751-3754.

Pereira, A. P., I. C. F. R. Ferreira., F. Marcelino., P. Valentão, P. B, Andrade., R. Seabra., L, Estevinho., A, Bento and J. A, Pereira. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*olea europaea* and *cv.* cobrançosa) leaves. Molecules. 12: 1153-1162.

Pérez, C., R. C. González., C. A. Rodríguez., J. R. Rodríguez and F. Ortega. 2006. Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. Advances in agricultural and food biotechnology. 81: 193-216.

Prasetyo, E. N., T, Kudanga., W, Steiner., M, Murkovic., G.S, Nyanhongo and G.M, Guebitz. 2010. Laccase generated tetramethoxy azobismethylene quinone (TMAMQ) as a tool for antioxidant activity measurement. Food Chemistry. 118(2) 437–444.

Rafaat, D and H. G. Sahl. 2009. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. Microbiolgical Technolgy. 2: 186-201.

Rabea, E.I., M. E. T. Badawy., C. V. Stevens., G, Smagghe and W, Steuerbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 4:1457-1465.

Tripathi, S., G. K. Mehrotra and P. K. Dutta. 2011. Chitosan–silver oxide nanocomposite film: Preparation and antimicrobial activity. Indian academy of sciences. 34 (1): 29-35.

Thumula, P. 2006. Studies on storage behavior of tomatoes coated with chitosan-lysozyme films. Master thesis at faculty of agricultural and environmental Sciences, McGill University. Canada.

Winkelhausen, E., R. Pospiech and G. Laufenberg. 2005. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. Bulletin of the chemists and technologists of macedonia. 24(1): 41–46.

Received	**2013/02/18**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/07/02**	**قبول البحث للنشر**