

مقایسه خصوصیات زیستی کیتوزان استخراج شده از ضایعات میگوی پرورشی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)، اسکوئید هندی (*Uroteuthis duvaucelii*) و خرچنگ گرد (*Portunus pelagicus*)

- **هومن تیموری***: گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **مسعود رضائی**: گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
- **مهدی طبرسا**: گروه عمل‌آوری فرآورده‌های شیلاتی دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

در این تحقیق با روش‌های مختلف از ضایعات سه منبع آبی، کیتین و کیتوزان استخراج و سپس برخی خصوصیات زیستی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در استخراج اسیدی کیتوزان حاصل از پوسته میگو ۰/۲ گرم و پوسته خرچنگ ۰/۱۵ گرم به‌ازای هر ۵ گرم پوسته خشک حاصل آمد. در استخراج اختصاصی برای خرچنگ بیش‌ترین میزان کیتوزان از خرچنگ به‌میزان ۰/۴ گرم و در رتبه بعدی میگو با ۰/۳ گرم گزارش گردید. تنها در استخراج اختصاصی اسکوئید بود که ۰/۳ گرم کیتوزان به‌ازای هر ۵ گرم کاتل داخلی خشک شده اسکوئید به‌دست آمد. وزن ملکولی متوسط کیتوزان از طریق اندازه‌گیری ویسکوزیته ذاتی تعیین شد، که بیش‌ترین وزن ملکولی مربوط به پوسته میگو با ۱۸۰۳۹ گرم/مول و کم‌ترین مربوط به کاتل داخلی اسکوئید با ۱۶۶۸ گرم/مول است. بالاترین انحلال در آب را کیتوزان حاصل از پوسته اسکوئید هندی ۹۲/۸۱٪ نشان داد. مطالعه طیف FT-IR نشان داد که بالاترین درصد داستیلاسیون نیز مربوط به کیتوزان اسکوئید با ۹۲/۳۹٪ می‌باشد. ارزیابی SEM نیز به‌منظور مطالعه ساختار مولکولی کیتوزان استخراجی از سه منبع مختلف با سه دقت متفاوت انجام شد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، وزن ملکولی، FT-IR، SEM، زیست‌فعال



مقدمه

استفاده از ضایعات حاصل از آبزیان و در کنار آن بهره‌گیری از آبزیان کم‌مصرف یا حتی بدون مصرف در ایران به‌منظور تولید کیتین و کیتوزان و مشتقات آن‌ها به‌منظور استخراج این مواد با ارزش، اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. خواص جالب کیتوالیگو ساکاریدهای استخراجی از آبزیان و سایر منابع کیتینی در مورد برخی از خواص زیستی ازجمله خواص: ضدالتهابی، انعقادکننده خون، کاهندگی فشارخون، کاهندگی سطوح کلسترول در حال انجام بوده و در مورد خواص آنتی‌دیابتی، ضدسرطان و آنتی‌اکسیدانی نیاز به بررسی‌های بیش‌تر و عمیق‌تری می‌باشد (Liang و همکاران، ۲۰۱۸). بهره‌گیری از پوسته خارجی غیرقابل مصرف در سخت‌پوستان که طی فرآوری این آبزیان جدا شده و درصدوزنی چشمگیری حتی در برخی موارد بیش از ۵۰٪ را به‌خود اختصاص می‌دهند. با عنایت به افزایش تولید میگوی پرورشی در کشور که در سال ۹۳ به ۲۲۴۷۵ تن رسید (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۹۳-۱۳۹۲) و تولید بیش از ۲۷ هزار تن در سال ۱۳۹۶ (شبکه اطلاع‌رسانی مستقل جامعه دریایی "مانا") و افزایش تولید به بیش از ۵۰ هزار تن تا پایان برنامه ششم شاهد افزایش مصرف سرانه میگو در جوامع ایرانی نسبت به سال‌های اخیر و توسعه رستوران‌هایی که غذای دریایی ارائه می‌دهند، و میگو نیز در لیست غذایی اکثر این رستوران‌ها و حتی در مواردی فست فودها مشاهده می‌گردد. هم‌چنین به‌دلیل عدم مصرف خرچنگ گرد در داخل کشور تمامی خرچنگ‌های جمع‌آوری شده که اغلب به‌صورت صید ضمنی می‌باشند، بلااستفاده و در موارد بسیار زیادی به دریا بازگردانده می‌شوند. از ذخایر خرچنگ در داخل کشور به‌علت عدم مصرف آمار دقیقی در دست نیست. ذخایر اسکوئید و ماهی مرکب در کشور با داشتن میزان صیدی بین ۱۰۰۰ تا ۲۷۰۰ تن در سال (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۹۳-۱۳۸۰)، که غالباً به‌صورت فیله جهت صادرات آماده می‌گردند، حاوی اسکلت داخلی مناسبی جهت استخراج ترکیبات کیتینی می‌باشند. در حال حاضر ضایعات حاصل از کارخانه‌های فرآوری میگو (سرکنی و پوست‌کنی میگو) متأسفانه در شرایط بسیار نامناسب نگهداری، به کارخانه‌های تولید غذای میگو انتقال و پس از خشک نمودن و پودر کردن آن‌ها به غذای میگو افزوده می‌گردند. کیتین و ترکیب استیل‌زدائی شده آن به‌نام کیتوزان دو پلیمر طبیعی شناخته شده هستند که سابقه استخراج و استفاده‌های متعدد از آن‌ها به ۲۰۰ سال قبل برمی‌گردد (Alder، ۲۰۰۰). یکی از مهم‌ترین تحقیقات انجام یافته بر روی کیتین، تبدیل آن به کیتوزان با روش استیل‌زدایی بوده است. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد، تبدیل کیتین به کیتوزان در فرآیند استیل‌زدائی شیمیایی با روش‌های

یکسانی بوده است، این دو پلیمر ازت‌دار توسط برخی حیوانات و گیاهان ساخته می‌شوند که بعد از سلولز فراوان‌ترین پلیمرها در طبیعت به‌شمار می‌آیند. سنتز آن‌ها در طبیعت همراه با سایر ترکیبات پروتئینی، مواد چربی، معدنی و مواد رنگی است که در بدن حیوانات و گیاهان نقش ماده حفاظتی دارند (Walton و همکاران، ۲۰۰۱). استخراج و عمل‌آوری آن‌ها با روش‌های متداول شیمیایی با اندکی تغییرات حاصل می‌شود (Hein و همکاران، ۲۰۰۱). تاکنون بیش از ۳۰۰ منبع مختلف از انواع بی‌مهرگان دریایی، قارچ‌ها، باکتری‌ها، گیاهان، جلبک‌ها، نرم‌تنان، دیاتومه‌ها، مخمرها، آلگ‌ها، حشرات و غیره مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته است و بیش از ۳۰۰ نوع از مشتقات آن در صنایع مختلف داروسازی، آرایشی، زیست‌فناوری، کشاورزی، غذایی، شیمیایی و غیره به‌کار برده شده است (Pariser و همکاران، ۲۰۰۴). در داخل کشور بیش‌تر تحقیقات در زمینه تولید کیتین از آبزیان، معطوف نوع استخراج، و مقایسه روش‌های مختلف استخراج و بهینه‌سازی تولید کیتین و کیتوزان بوده است. در تحقیقی بهینه سازی استخراج کیتین و کیتوزان از پوست میگو و بررسی عوامل استیل‌زدائی کیتین و ارزیابی زیست‌سازگاری محصول تولید شده انجام گرفت (یعقوبی و همکاران، ۱۳۸۱). اصلاح و بهینه‌سازی فرآیند استخراج کیتین از پوست میگو با تغییر در الگوی پروتئین زدائی و املاح‌زدائی قابلیت تولید کیتین را تا ۸۲ درصد افزایش داد (غیاث‌الدین و همکاران، ۱۳۹۰). هم‌چنین در تحقیق دیگری استخراج کیتین و کیتوزان از اندام‌های مختلف خرچنگ‌های نر و ماده و مقایسه آن‌ها، و نیز تفاوت در جنس نر و ماده توسط خاکشور و همکاران (۱۳۹۱) گزارش گردید. استخراج کیتوزان از پوسته میگوی سفید هندی و مطالعه خواص ضد میکروبی و ضد قارچی آن در مقایسه با داروهای معمول ضد باکتریایی و قارچی، اثرات مذکور را به‌خوبی تایید نمود (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱). در تحقیق دیگر کیتوزان تولیدشده از پوست میگو در مقایسه کیفی با کیتوزان تجاری حاصل از خرچنگ قرار گرفت و در برخی موارد کیفی نتایج بهتر از نمونه صنعتی نیز حاصل شد (موسوی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۱). استخراج کیتین و کیتوزان از اسکلت خارجی خرچنگ صید شده در منطقه بندرعباس انجام گردید (خاکشور و پازوکی، ۱۳۹۲). در پژوهش دیگر معدنی‌زدائی و استیل‌زدائی شیمیایی ضایعات میگوی موزی با روش‌های مختلف و استیل‌زدائی با سه روش مختلف مورد بررسی قرار گرفت و روش‌های با کارایی بهتر معرفی گردید (صداقت و همکاران، ۱۳۹۴). تاثیر درجه داستیل‌اسیون بر کیتوزان تولید شده از ضایعات میگوی صورتی بر مهار رشد باکتری سودوموناس توسط خنابری و همکاران (۱۳۸۸) انجام پذیرفت که در نهایت مشخص شد درجه داستیل‌اسیون بر

شستشو در سینی‌های مخصوص انجماد صفحه‌ای قرار گرفت و پس از انجماد در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد و کارتن‌گذاری به انبار نگه‌داری انتقال یافت. نمونه‌ها با استفاده از یخ و جعبه‌های یونولیتی نمونه‌ها توسط هواپیما به تهران منتقل و بلافاصله به دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافت. پس از انتقال به آزمایشگاه و نگه‌داری در فریزر به مرور جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. پوسته‌های کیتینی سخت‌پوستان مورد استفاده در پژوهش در دمای اتاق دیفرست شد (Peplow و همکاران، ۱۹۷۳). پس از تبخیر رطوبت سطحی، به منظور خشک کردن توسط ترازوی دیجیتال حساس توزین و به مدت ۳ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در داخل آن قرار گرفتند. پس از خشک شدن نمونه‌ها را دوباره توزین کرده و توسط آسیاب برقی، آسیاب نموده و به شکل پودر درمی‌آوریم. مقدار ۵ گرم از پوسته پودر شده را با ترازو توزین کرده و به روش‌های مختلفی که در زیر آورده شده است برای استخراج کیتین و کیتوزان مورد استفاده قرار گرفت.

روش استخراج اسیدی کیتوزان: ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد سود ساخته و با پوسته‌های پودر شده مخلوط نمودیم سپس مخلوط را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ قرار دادیم. پس از سانتریفیوژ مایع سطحی را دور می‌ریزیم و سانتریفیوژ را ۳ مرتبه دیگر با آب مقطر تکرار شد. ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسیدسولفوریک ۵/۵ مولار ساخته و به رسوب اضافه نمودیم. سپس آن را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت به منظور زدودن املاح معدنی قرار دادیم. بعد از این مرحله نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم، رسوب با آب مقطر برای چندین بار شستشو داده شد. دپروتئینه کردن نمونه با محلول هیدروکسید سدیم ۲ درصد با نسبت (۳۰:۱) انجام پذیرفت، به منظور خالص‌سازی کیتین استخراج شده به مدت ۲ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد نمونه را قرار می‌دهیم و بدین ترتیب پروتئین را حذف می‌نماییم. پس از شستشو این مخلوط را در مجاورت اسیداستیک ۱۰ درصد در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت قرار می‌دهیم. به منظور استخراج کیتوزان از رسوب، نمونه را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ می‌کنیم. فاز رویی که حاوی کیتوزان محلول در اسیداستیک است، با سود ۴ مولار به pH حدود ۹ رسانده می‌شود. در این هنگام، کیتوزان به صورت معلق درآمده و سپس ته‌نشین می‌شود. رسوب حاصل با آب مقطر، اتانول و استون شسته و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شود. رسوب حاصل در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌گیرد و سپس وزن آن تعیین گردید. چون از سه منبع مختلف سخت‌پوست برای استخراج کیتوزان استفاده شد، لذا از روش Demir و همکاران (۲۰۱۶) برای پوسته خرچنگ و نیز Tolaimate و همکاران (۲۰۰۸) برای اسکونید استفاده شد.

افزایش خاصیت میکروبی تأثیر مثبت دارد. خاصیت ضد میکروبی کیتوزان استخراج شده از پوست میگوی خلیج فارس بر روی باکتری-های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در تحقیق منگلی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) اثر ضد میکروبی آن را تأیید نمود. با بیان این مطالب می‌توان بیان داشت که در مورد خواص کاربردی کیتین و کیتوزان هیچ‌گونه پژوهشی در داخل کشور انجام پذیرفته است، علی‌الخصوص خواص زیستی این پلیمرها و الیگوساکاریدهای آن نیاز به تحقیق و بررسی بیشتر می‌باشد. اقتصادی‌ترین منابع استخراج آن‌ها در دنیا در حال حاضر پوسته میگوها، خرچنگ و کریل در دنیا است. عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمرها عبارتند از: عدم دستیابی به ماده اولیه دایمی و فراوان، پایین بودن درصد پلیمر در ماده اولیه، فصلی بودن منابع و مشکلات ناشی از افت کیفیت در استخراج با روش‌های شیمیایی است. از پوسته و کاراپاس میگو، اسکلت داخلی اسکونید و خرچنگ‌های گرد در داخل کشور هیچ استفاده صنعتی به عمل نمی‌آید و در حالی که منابع ذکر شده دارای مقدار فراوانی کیتین هستند در این تحقیق، هدف بر آن است که با تولید کیتوالیگوساکاریدها از این منابع کیتینی مختلف و ارزیابی خواص زیستی نظیر آنتی‌دیابتی، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی آن‌ها مسیر روشنی در استفاده از این منابع ارزشمند به دست آید. از ترکیبات و مشتقات فراوان این بیوپلیمرها به صورت مختلف در صنعت داروسازی، شیمی، مواد غذایی، بیوتکنولوژی، آرایشی و غیره به صورت وارداتی استفاده می‌شود، میزان نیاز جهانی به این دو بیوپلیمر در سال ۲۰۱۰ معادل ۲۵۰ هزار تن برآورد شده است (AOAC، ۲۰۰۲). در حالی که عملاً توان تولیدی در حدود ۵۰۰۰ تن در دنیا می‌باشد (Seaborn، ۲۰۰۱). پس نیاز جهانی برای این محصول هم‌چنان موجود است و بایستی منابع دیگری یافت شود، اقتصادی‌ترین منابع استخراج آن‌ها در دنیا در حال حاضر پوشش خارجی (میگوها، خرچنگ و کریل) در دنیا است (Anderson و همکاران، ۲۰۰۱). عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمرها عبارتند از: عدم دستیابی دایمی و فراوان به ماده اولیه، پایین بودن درصد خلوص پلیمر در پوسته، فصلی بودن برخی منابع و مشکلات ناشی از افت کیفیت در استخراج با روش شیمیایی است (Hein و همکاران، ۲۰۰۱). در خصوص یافتن منابع جدید، بهینه‌سازی و اقتصادی کردن روش‌های عمل‌آوری و بررسی امکان دستیابی به روش‌های تازه در استخراج، سالانه تحقیقات فراوانی انجام می‌پذیرد (Peberdy و همکاران، ۲۰۱۰).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های نرم‌تنان: نمونه‌برداری‌ها

در بندر بوشهر انجام شد، نمونه‌های مورد نیاز جداسازی و پس از



انحلال پذیری کیتوزان: برای این منظور ۰/۱ گرم از نمونه کیتوزان‌های استخراج شده را با ۱۰ میلی لیتر اسیداستیک ۱۰٪ مخلوط نموده و به مدت ۳۰ دقیقه در تیوب‌های سانتریفیوژ که قبلاً توزین شده‌اند، قرار می‌دهیم. محلول حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم غوطه‌ور و سپس در دمای اتاق خشک می‌نماییم. سانتریفیوژ به مدت ده دقیقه و ۱۰۰۰۰g انجام می‌پذیرد. سوپرناتانت جدا شده و شستشو با آب مقطر انجام می‌پذیرد. سانتریفیوژ دوباره انجام پذیرفته و سوپرناتانت را جدا می‌نماییم. تیوب و محتویات به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک می‌شوند. در نهایت درصد حلالیت از فرمول زیر به دست آمد (Fernandez-Kim, ۲۰۰۴).

$$[(\text{وزن نهایی تیوب} + \text{کیتوزان}) - (\text{وزن اولیه تیوب} + \text{کیتوزان})]$$

= انحلال پذیری (%)

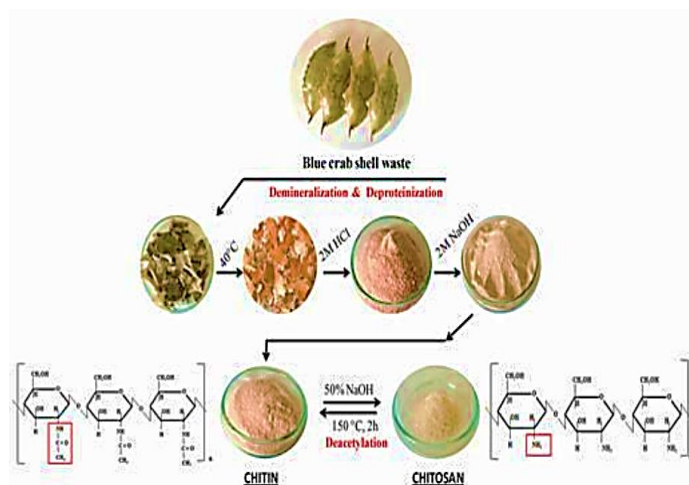
$$[(\text{وزن اولیه تیوب}) - (\text{وزن اولیه تیوب} + \text{کیتوزان})]$$

آنالیز طیف سنجی FT-IR: به منظور تعیین درجه استیل‌شدن از روش FTIR و از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز و بهره‌گیری از فرمول $DA = [(A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1/33]$ استفاده گردید (Moore و Roberts, ۱۹۷۸). در طیف FT-IR به بررسی گروه‌های عاملی موجود در ساختار پرداخته می‌شود. با توجه به طیف‌های IR به دست آمده از ترکیب ساختار کیتوزان حاصل از سه منبع مختلف کیتینی با مقایسه آن‌ها با طیف‌های مرجع می‌توان ساختار را براساس حضور گروه‌های عاملی موجود که در طیف آمده مورد بررسی قرار داد.

ارزیابی SEM: به منظور ارزیابی تصاویر SEM از میکروسکوپ الکترونی روبشی TESCAN مدل VEGA III ساخت کشور چک و پوشش‌دهی Nano-Structure Coating مدل DSR1 ساخت کشور ایران استفاده گردید. در آزمایشگاه دانشکده مهندسی مواد دانشگاه علم و صنعت عکس‌برداری از نمونه‌های کیتوزان در ابعاد مختلف انجام پذیرفت. دتکتورهای موجود عبارت بودند از BSE, EDS SE و آنالیز عنصری EDS به صورت نقطه‌ای، خطی و صفحه‌ای انجام گرفت. به منظور سانسازی نمونه‌ها پوشش‌دهی نقره بر روی نمونه‌ها انجام شد.

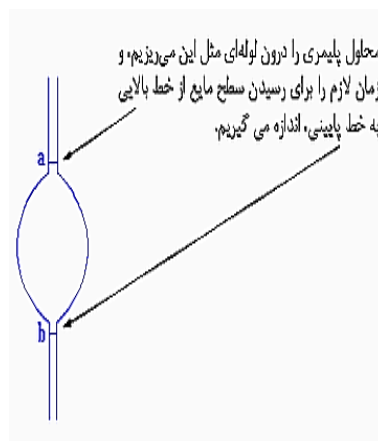


شکل ۳: میکروسکوپ الکترونی روبشی TESCAN



شکل ۱: نمودار شماتیک مراحل تولید کیتوزان به روش اختصاصی از پوسته خرچنگ گرد

اندازه‌گیری وزن مولکولی: وزن مولکولی متوسط کیتوزان از طریق اندازه‌گیری ویسکوزیته ذاتی تعیین شد. در این روش از معادله مارک-هوینک $[\eta] = kM^\alpha$ استفاده گردید (Brugnerotto و همکاران, ۲۰۰۰). در این معادله $[\eta]$ ویسکوزیته ذاتی، k و α ثابت بوده و به نوع حلال بستگی دارند و به ترتیب برابر 1.81×10^{-3} و 0.93 می‌باشند. برای تعیین وزن مولکولی میانگین کیتوزان با غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۸، ۰/۰۱۶، ۰/۰۲۴، ۰/۰۳۲، ۰/۰۴۸، ۰/۰۶۴، ۰/۰۹۶ و ۰/۱۲۸ گرم بر دسی لیتر) در سامانه حلال اسیداستیک ۰/۱ مولار و سدیم کلراید ۰/۲ مولار حل شده و با استفاده از ویسکومتر زمان عبور محلول در دستگاه اندازه‌گیری گردید و سپس ویسکوزیته درونی و کاهشی برای هر غلظت محاسبه گشت و معادله خط بر حسب غلظت رسم شد و در نهایت در غلظت صفر ویسکوزیته ذاتی به دست آمد و وزن مولکولی میانگین بر حسب گرم بر مول محاسبه گردید (Fernandez-Kim, ۱۹۹۱).



شکل ۲: ویسکومتر جهت تعیین ویسکوزیته

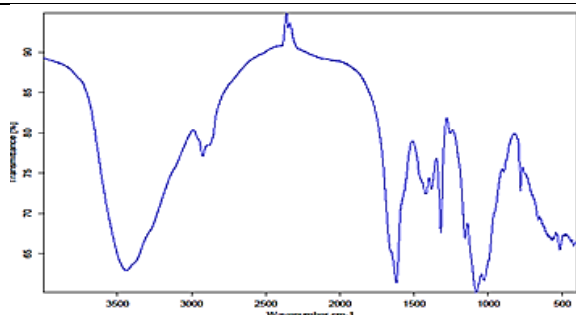
نتایج

استخراج کیتوزان: با توجه به این که از سه منبع مختلف از نرم تنان

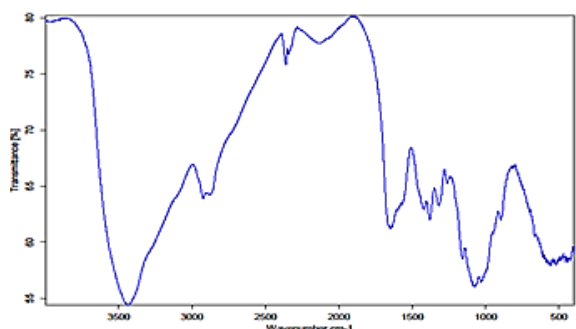
جهت استحصال کیتوزان استفاده گردید، لذا جهت به دست آوردن مقدار متناسبی از کیتوزان از ۳ روش مختلف بهره بردیم. که میزان استحصال در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: نتایج تولید کیتوزان از پوسته نرم تنان به روش های مختلف

گونه	وزن خشک	روش Ghaly و Mahmoud	روش دوم (اختصاصی اسکوئید)	روش سوم (اختصاصی خرچنگ)
میگو وانامی	۵	۱	۰/۹	۰/۳ ^b
خرچنگ گرد	۵	۰/۸	۱/۲	۰/۴ ^a
اسکوئید هندی	۵	۰/۲	۱/۳	۰/۰۲ ^f
		۰/۲ ^c	۰/۱ ^e	۰/۴ ^a
		۰/۱۵ ^d	۰/۳ ^b	۰/۰۸



شکل ۵: طیف FT-IR مربوط به کیتوزان خرچنگ گرد



شکل ۶: طیف FT-IR مربوط به اسکوئید هندی

در طیف FT-IR به بررسی گروه های عاملی موجود در ساختار پرداخته می شود. با توجه به طیف های IR به دست آمده از ترکیب دو ساختار کیتوسان و کیتین و با مقایسه آن ها با طیف های مرجع ساختار را بر اساس حضور گروه های عاملی موجود که در طیف آمده مورد بررسی قرار دادیم.

تعیین درصد داستیلاسیون: جهت بررسی مقدار تبدیل گروه آمیدی کیتین به گروه آمینی کیتوزان و یا به عبارت دیگر تعیین درجه داستیلاسیون از فرمول زیر استفاده شده است که نتایج ذیل حاصل شد:

$$DA\% = [(A1655/A3450) \times 100/1/33]$$

جدول ۴: درصد داستیلاسیون زدائی نمونه های کیتوزان

نمونه کیتوزان	درصد داستیلاسیون
میگو وانامی	۸۳/۹۵ ^b
خرچنگ گرد	۷۴/۷۶ ^c
اسکوئید هندی	۹۲/۳۹ ^a

نتایج ارزیابی وزن مولکولی: وزن مولکولی کیتوزان های استحصال شده از منابع مختلف نرم تنان بر حسب گرم بر مول در جدول ۲ آورده شده است.

میزان انحلال پذیری کیتوزان: درصد انحلال پذیری کیتوزان های استحصال شده به شرح زیر به دست آمد. همان گونه که ملاحظه می گردد بیشترین درصد حلالیت را کیتوزان استحصال از اسکوئید نسبت به کیتوزان حاصل از خرچنگ گرد و میگوی وانامی نشان داد (جدول ۳).

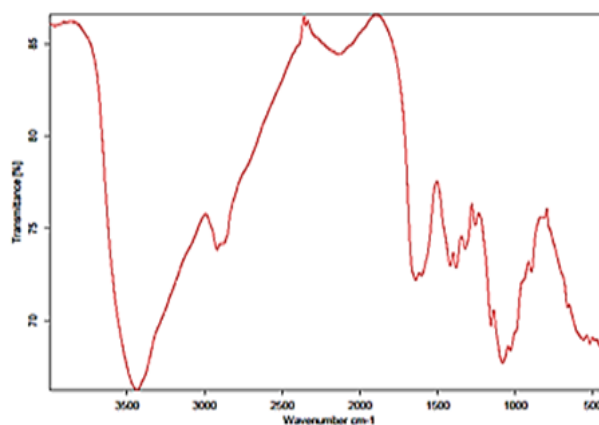
جدول ۲: وزن مولکولی کیتوزان نمونه نرم تنان

گونه	وزن مولکولی (گرم/مول)
میگو وانامی	۱۸۰۳۹ ^a
خرچنگ گرد	۵۱۵۱ ^a
اسکوئید هندی	۱۶۶۸ ^b

جدول ۳: تعیین درصد حلالیت نمونه های کیتوزان استخراج شده

نمونه کیتوزان	حلالیت در آب (%)
میگو وانامی	۸۲/۷۵ ± ۰/۳۶ ^c
خرچنگ گرد	۷۳/۵۸ ± ۰/۸۸ ^b
اسکوئید هندی	۹۲/۸۱ ± ۱/۲۱ ^a

آنالیز طیف سنجی FT-IR

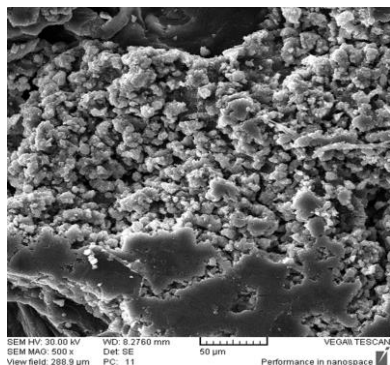


شکل ۴: طیف FT-IR مربوط به کیتوزان میگوی پاسبید غربی (وانامی)

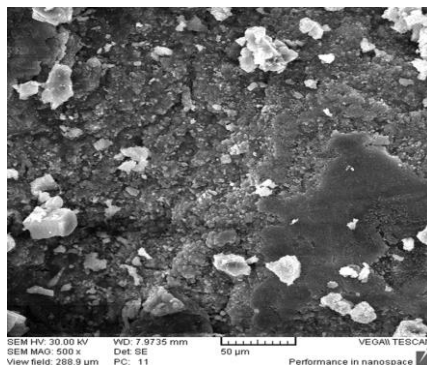


ارزیابی SEM: ساختار مولکولی کیتوزان استخراجی از

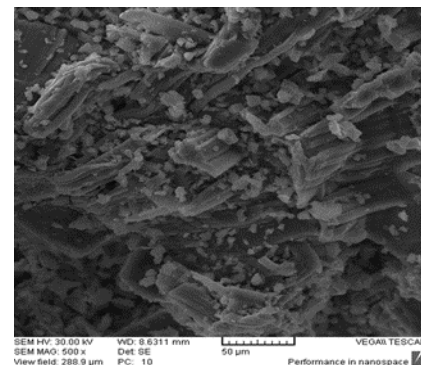
سه منبع مختلف با سه دقت متفاوت بررسی شد:



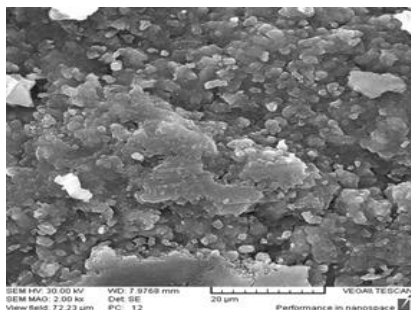
شکل ۷-۳: اسکوئید هندی - ۵۰ میکرومتر



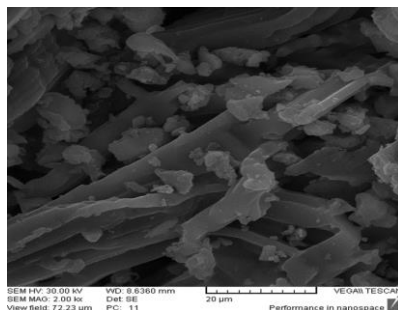
شکل ۷-۲: خرچنگ گرد - ۵۰ میکرومتر



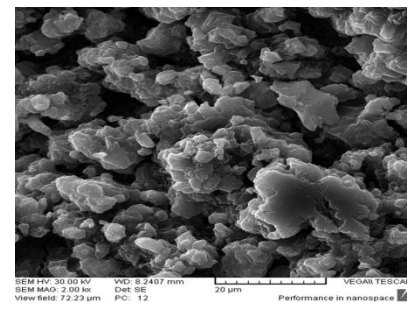
شکل ۷-۱: میگو وانامی - ۵۰ میکرومتر



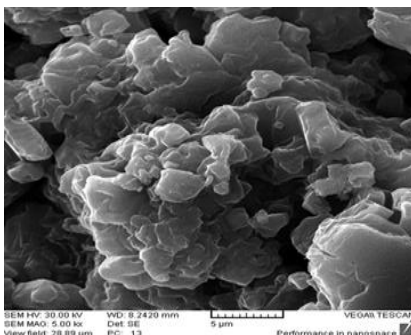
شکل ۷-۶: اسکوئید هندی - ۲۰ میکرومتر



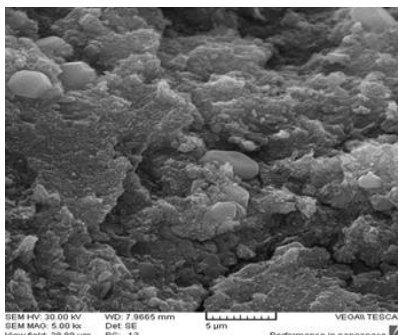
شکل ۷-۵: خرچنگ گرد - ۲۰ میکرومتر



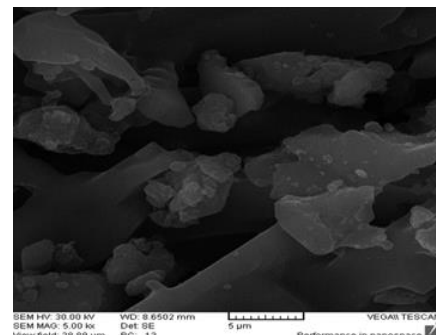
شکل ۷-۴: میگو وانامی - ۲۰ میکرومتر



شکل ۷-۹: اسکوئید هندی - ۵ میکرومتر



شکل ۷-۸: خرچنگ گرد - ۵ میکرومتر



شکل ۷-۷: میگو وانامی - ۵ میکرومتر

بحث

میگونیز افزایش نشان داد، هم چنین تا حدی کیتوزان از منبع اسکوئید هندی به دست آمد. با عنایت به این که مقدار تولید شده کیتوزان از منبع اسکوئید هم چنان نسبت به سایر منابع مقدار کمی به شمار می آمد. لذا روش اختصاصی Tolaimate و همکاران (۲۰۰۸) برای استخراج کیتوزان مورد آزمایش قرار گرفت، نتایج به دست آمده قابل توجه بود: میزان کیتوزان استحصال شده از خرچنگ باز میزان بیش تری بود. علاوه بر این میزان کیتوزان استحصال شده از اسکوئید به طور معنی داری افزایش نشان داد. ولی شاهد کاهش معنی داری در استخراج کیتوزان از میگو با این روش بودیم. بیش ترین میزان استخراج کیتوزان برای میگو مربوط

با توجه به این که در روش Ghaly و Mahmoud (۲۰۰۷) که به منظور استخراج کیتوزان از پوسته میگو انجام گرفت، عملاً هیچ کیتوزانی از منبع اسکوئید حاصل نشد، لذا با استفاده از روش های اختصاصی برای هر یک از منابع کیتینی به دست آمده کیتوزان استحصال شد. برای این منظور از روش اختصاصی Demir و همکاران (۲۰۱۶) برای پوسته خرچنگ استفاده شد. در این روش علاوه بر این که میزان کیتوزان تولیدی از منبع خرچنگ تا حدی افزایش یافت. میزان کیتوزان تولید شده از

به روش اختصاصی خرچنگ است که به جای اسیدسولفوریک از اسید کلریدریک به منظور معدنی‌زدائی استفاده می‌شود. همچنین پروتئین زدائی برخلاف روش اول که ابتدا فرآیند قرار دارد، در روش اختصاصی خرچنگ در مرحله بعد از معدنی‌زدائی بوده و در هر دو روش از سود دو مولار استفاده گردید. فرآیند حرارتی بالاتر و مقدم داشتن معدنی زدائی بر پروتئین زدائی در روش اختصاصی خرچنگ می‌تواند دلیل افزایش راندمان استحصال کیتوزان از پوسته میگو و خرچنگ باشد. در روش سوم هم که به طور اختصاصی برای استحصال کیتوزان از اسکوئید طراحی شده بود، از اسید و باز ضعیف‌تر (با مولاریته پایین‌تر) استفاده شد و کیتوزان بیش‌تری نسبت به دو روش قبل حاصل شد. با توجه به این‌که کیتوزان حاصل از منبع اسکوئید هندی از نوع بتا کیتوزان هست لذا استفاده از اسید و باز قوی موجب آسیب جدی به ساختار آن شده و کیتوزان نهایی استحصال شده را کاهش خواهد داد. با توجه به مطالب ذکر شده بهتر است از روش اختصاصی برای اسکوئید و خرچنگ بهره‌برد. نتایج حاصل از سنجش وزن مولکولی کیتوزان نشان داد که کیتوزان استخراجی از سه منبع مختلف آبری وزن مولکولی کاملاً متفاوت از هم دارند، و با تفاوت معنی‌داری کیتوزان استخراج شده از اسکوئید هندی با وزن مولکولی ۱۶۶۸ گرم/مول کم‌ترین وزن کیتوزان را به خود اختصاص داد. وزن مولکولی خرچنگ گرد ۵۱۵۱ گرم/مول و برای میگوی وانامی ۱۸۰۳۹ گرم/مول تعیین گردید، نتایج گزارش شده پژوهش حاضر با تحقیق Hajji و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی سه گونه میگوی *Penaeus kerathurus*، خرچنگ *Carcinus mediterraneus* و ماهی مرکب *Sepia officinalis* انجام شد، مطابقت دارد. در مطالعه ایشان نیز وزن مولکولی کیتوزان نماینده سرپایان ۱۰۳۰ گرم/مول، خرچنگ ۶۱۲۰ گرم/مول و میگو ۱۷۰۳۰ گرم/مول تعیین گردیده بود. انحلال‌پذیری از پارامترهای مهم برای کیتوزان است. چرا که بهبود آن می‌تواند باعث افزایش کاربرد کیتوزان در سایر زمینه‌ها شود. از عوامل مؤثر بر انحلال‌پذیری، وزن مولکولی است. تغییر وزن مولکولی ماده، مقدار انحلال‌پذیری آن را در آب و محلول‌های اسیدی نشان می‌دهد. به عنوان مثال، با افزایش وزن مولکولی مقدار انحلال‌پذیری کیتین و کیتوزان در آب کاهش می‌یابد. بیش‌ترین درصد حلالیت را کیتوزان استحصالی از اسکوئید نسبت به کیتوزان حاصل از خرچنگ گرد و میگوی وانامی نشان داد و مشخص گردید که عوامل دیگری از جمله ساختار مولکولی علاوه بر درجه استیل‌زدائی و وزن مولکولی بر میزان حلالیت کیتوزان مؤثر است. همان‌گونه که پیش‌تر هم عنوان شد، کیتوزان استخراجی از اسکوئید هندی ساختار بتا کیتوزان دارد که احتمالاً همین امر موجب شده با دارا بودن وزن مولکولی پایین‌تر نسبت به سایر نمونه‌ها بیش‌ترین میزان حلالیت را داشته باشد. میزان حلالیت هر سه کیتوزان استحصال شده تفاوت

معنی‌داری داشته، و کم‌ترین میزان حلالیت مربوط به کیتوزان خرچنگ می‌باشد همان‌گونه که در تحقیق Hossain و Iqbal (۲۰۱۴) بر روی ضایعات حاصل از میگو میزان حلالیت ۷۱ تا ۹۷ درصد تعیین گردید که با مقدار تعیین شده در پژوهش حاضر از ضایعات میگوی وانامی که تقریباً ۸۲ درصد تعیین گردید، هم‌خوانی دارد. Hossain و Iqbal (۲۰۱۴) نشان دادند که با افزایش غلظت هیدروکسید سدیم میزان حلالیت و درصد داستیله شدن کیتوزان افزوده می‌شود. همان‌طور که حلالیت اسکوئید هندی نشان داد در مطالعات Chandumpai و همکاران (۲۰۰۴) و Abdelmalek و همکاران (۲۰۱۷) نیز تایید شده بود، کیتوزان حاصل از اسکوئیدها به خاطر ساختار بتا کیتوزان حلالیت بهتر و بیش‌تری نسبت به کیتوزان حاصل از سایر منابع آبریان نشان می‌دهند و با ۹۳٪ بیش‌ترین درصد حلالیت به کیتوزان حاصل از اسکوئید تعلق گرفت. در تحقیقی که توسط Sarbon و همکاران (۲۰۱۴) بر روی خرچنگ گونه *Scylla olivacea* انجام پذیرفت، درصد حلالیت کیتوزان استخراج شده حدود ۷۰٪ به دست آمد که با نتایج اخیر برای خرچنگ گرد (۷۳/۵۸٪) هم‌خوانی دارد. وجود رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی بیش از سایر منابع در پوسته خرچنگ می‌تواند یکی از عوامل اصلی در پائین بودن درصد حلالیت کیتوزان حاصل از خرچنگ گرد باشد. با توجه به طیف‌های IR به دست آمده از ترکیب دو ساختار کیتوزان و کیتین و با مقایسه آن‌ها با طیف‌های مرجع می‌توان ساختار را براساس حضور گروه‌های عاملی موجود که در طیف آمده مورد بررسی قرار داد (Negrea و همکاران، ۲۰۱۵). پیک نوک تیز در محدوده ۳۴۰۰ نشانگر وجود گروه NH در ساختار می‌باشد اما از آن‌جاکه پیک مربوط به ارتعاشات کششی OH با یک نوار پهن در همین ناحیه (محدوده ۳۴۰۰-۳۵۰۰) ظاهر می‌شود این دو پیک overlap داشته و پیک NH قابل مشاهده نیست و پوشیده شده است. در محدوده ۱۴۰۰ پیک C-O مربوط به COH ساختارها قابل مشاهده است. ارتعاشات کششی C-O-H و C-O-C به صورت دو پیک در ناحیه ۱۱۰۰-۱۰۵۰ قابل مشاهده است. پیک مشاهده شده در ۲۸۵۰ مربوط به گروه آمیدی بوده و به طور دقیق‌تر پیک موجود در ۱۵۶۰ مربوط به گروه کربونیل (C=O) آمید موجود در ساختار کیتین می‌باشد. پیک موجود در ۱۱۵۰ نیز مربوط به همین گروه عاملی است. پیک‌های موجود در محدوده ۲۸۰۰ برای ارتعاشات کششی CH ساختارهای کیتین و کیتوزان بوده و دو پیک در ۱۳۸۰ و دو پیک در ۱۳۲۰ را می‌توان برای ارتعاشات خمشی CH₃ های ساختار کیتین در نظر گرفت. در محدوده ۸۹۰ نیز پیک CH مربوط به ارتعاشات رفت و برگشتی قابل مشاهده است. با استفاده از روش‌های اختصاصی برای استخراج کیتوزان از نرم‌تان و بررسی درصد داستیلاسیون، نتایج نشان داد که بیش‌ترین درصد داستیلاسیون مربوط به پوسته اسکوئید بوده و به فاصله کمی از آن میگوی وانامی قرار می‌گیرد. ولی کم‌ترین میزان داستیلاسیون رادر



ساختاری شگفت‌انگیزی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند، به‌عنوان محدود کننده و نابود کننده باکتری‌ها مطرح گردند. هم‌چنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی که این مواد از خود نشان دادند، کیتوزان را به‌عنوان عاملی بازدارنده در برابر فعالیت سلول‌های سرطانی مطرح می‌سازد که نیاز به مطالعات تکمیلی و بررسی‌های بیش‌تر است. کیتوزان استخراج شده از ضایعات حاصل از سه منبع مختلف آبی هر چند با اندکی تفاوت خصوصیات زیستی قابل قبولی نشان دادند. امید است که علاوه بر دارا بودن عنوان غذای سلامتی برای آبزیان، بتوان از این محصولات فراسودمند حاصل از ضایعات آبزیان نیز جهت آسایش هرچه بیش‌تر بشر استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نهایت تشکر و قدردانی را از آقایان دکتر مهدی عبدالمهدی و دکتر بهروز محمدزاده ابراز نموده و هم‌چنین تشکر از همکاری بی‌دریغ مسئولین آزمایشگاه دانشکده علوم دریائی تربیت مدرس، مهندس نورانی و مهندس کمالی که در راستای انجام این پژوهش داشته‌اند را ابراز می‌دارد.

منابع

۱. خاکشور، م.ص. و پازوکی، ج.، ۱۳۹۳ استخراج ترکیبات کیتین و کیتوزان موجود در اسکلت خارجی خرچنگ شناگر. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۱۲ تا ۱۸.
۲. خاکشور، م.ص.؛ پازوکی، ج.؛ طادی، ف. و طاهری، س.، ۱۳۹۱. مقایسه میزان کیتین و کیتوزان استخراج شده در بین جنس‌های نر و ماده، اندام‌های مختلف و فصول متفاوت صید خرچنگ *Portunus Segnis*. خلیج فارس. همایش ملی فرآورده‌های طبیعی و گیاهان داروئی بجنورد. دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی.
۳. خانفري، آ. و صنعتی‌کوپایی، ش.، ۱۳۸۸. تاثیر درجه داستیلاسیون کیتوزان بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا بیمارستانی. مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران. دوره ۱۹، شماره ۷۱، صفحات ۱۰ تا ۱۹.
۴. صداقت، ف.؛ یوسف‌زادی، م.؛ تویسرکانی، ح. و نجفی‌پور، س.، ۱۳۹۴. معدنی‌زدائی و استیل شیمیایی ضایعات میگوی موزی *Penaeus merguensis* به‌منظور استخراج کیتین و کیتوزان. مجله زیست‌شناسی دریا. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. دوره ۷، شماره ۲۸، صفحات ۱ تا ۱۲.
۵. طاهری، ع.؛ سیفان، ا. و جلالی‌نژاد، س.، ۱۳۹۲. اثر ضد میکروبی و ضد قارچی کیتوزان محلول در اسید و آب پسته میگوی سفید

کیتوزان استخراجی از خرچنگ گرد شاهد هستیم. وجود رنگ‌دانه‌های کاروتنوئیدی بیش از سایر منابع در پوسته خرچنگ می‌تواند یکی از عوامل اصلی در پائین بودن درصد داستیلاسیون کیتوزان حاصل از خرچنگ گرد باشد. در مطالعه‌ای که بر روی میگو انجام شد بسته به درصد هیدروکسید سدیم میزان درصد داستیلاسیون از ۶۱ تا ۸۲٪ متغیر بود (Iqbal و Hossain، ۲۰۱۴)، که بابت نتیجه درصد داستیلاسیون ۸۳ درصدی برای میگوی وانامی هم‌خوانی دارد. هم‌چنین Sarbon و همکاران (۲۰۱۴) داستیلاسیون پوسته خرچنگ mud crab را حدود ۶۰ درصد تعیین نمودند که در پژوهش حاضر نیز ۷۴٪ به‌دست آمد. Kurita و همکاران (۱۹۹۳) درصد داستیلاسیون کیتین اسکوئید گونه *Ommastrephes bartrami* را بین ۵۶٪ تا ۹۶٪ تعیین نمودند که با افزایش غلظت هیدروکسید سدیم این درصد افزایش یافت. در پژوهش حاضر نیز درصد داستیلاسیون کیتوزان استخراجی از اسکوئید *Uroteuthis duvaucelii* ۹۲/۳۹٪ تعیین گردید. ارزیابی ساختار مولکولی کیتوزان از سه منبع مورد آزمایش و با سه دقت ۵۰، ۲۰ و ۵ میکرومتر ارزیابی و اختلافات ساختاری در مولکول‌های آن‌ها را به‌وضوح نشان داد، این تفاوت ساختاری بالطبع یکی از عوامل اصلی متفاوت بودن خواص زیست‌فعالی کیتوزان و پیرو آن کیتوالیگوساکاریدهای حاصل از این سه منبع خواهد بود، که بر خواص زیست‌فعالی هر کدام از آن‌ها تاثیر خواهد گذاشت. تداخل یکی از ویژگی‌های مهم زیست‌ماده به‌شمار می‌آید که می‌تواند به‌عنوان یک ویژگی مطلوب یا نامطلوب در نظر گرفته شود وجود حفره در زیست ماده باعث می‌شود تا تنش در آن ناحیه متمرکز شده و استحکام مکانیکی کاهش یابد. اما برای چسبندگی سلولی و رشد بافت وجود تداخل الزامی است. در این حالت اندازه تداخل در موقعیت‌هایی که رشد بافت مورد نظر است، حائز اهمیت است. رشد بافت در زمینه‌های متخلخل مطلوب است زیرا امکان درگیری و محکم شدن ماده کاشته شده در اطراف بافت را فراهم می‌کند (Madihally و Matthew، ۱۹۹۹). قطر تداخل‌های ایجاد شده در سطح و توده‌های تولید شده بر پایه کیتوزان به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مقایسه قرار گرفت. اندازه حفرات کیتوزان‌ها با وزن‌های مولکولی متفاوت تحت تأثیر وزن مولکولی قرار می‌گیرند. کیتوزان با وزن مولکولی بالا در مقایسه شده از کیتوزان با وزن مولکولی پایین دارای حفرات درشت‌تری هستند، به عبارت دیگر با افزایش وزن مولکولی اندازه حفرات نیز افزایش می‌یابد. همان‌طور که انتظار می‌رود با افزایش جرم مولکولی و افزایش گرانیوی محلول پلیمری، اندازه تداخل‌ها افزایش یافته است.

کیتوزان را می‌توان از چند جهت به‌عنوان ماده‌ای سودمند معرفی کرد. همان‌گونه که پیش‌تر هم اشاره شد مجموع آبزیانی که دارای پوشش کیتینی هستند، به‌عنوان منابعی با توان زیستی بالا شناخته شده و پژوهش در این مقوله می‌تواند درست در زمانی که باکتری‌ها تغییرات



- and Chitosan from Blue Crab and Synthesis of Chitosan Cryogel Scaffolds. JOTCSA. Vol. 3, No. 3, pp: 131-144.
۱۷. **Fernandez-Kim, S.O., 2004.** Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols (Master's thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Baton Rouge, LA.
 ۱۸. **Hajjia, S.; Islem, Y.; Olfa, G.B.; Rachid, H.; Marguerite, R.; Moncef, N. and Kemel, J., 2014.** Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. Vol. 65, pp: 298-306.
 ۱۹. **Hein, S.; Chuen, N.; Chandkrachang, S. and Stevens, F., 2001.** A systematic approach to quality assessment system of chitosan, in Asian Institute of Technology Internet pdf <<http://www.Southmblue.Com/chitosan>> Bangkok. 6 p.
 ۲۰. **Hossain, M.S. and Iqba, A., 2014.** Production and characterization of chitosan from shrimp waste. Journal of Bangladesh Agril. Univ. Vol. 12, No. 1, pp: 153-160.
 ۲۱. **Kurita, K.; Tomita, K.; Tada, T.; Ishii, S.; Nishimura, S.I. and Shimoda, K., 1993.** Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. Vol. 31, No. 2, pp: 485-491.
 ۲۲. **Liang, S.; Sun, Y. and Dai, X., 2018.** A Review of the Preparation, Analysis and Biological Functions of Chitooligosaccharide. International Journal of Molecular Sciences. Vol. 19, No. 8, pp: 2197.
 ۲۳. **Madihally, S.V. and Matthew, H.W.T., 1999.** Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. Biomaterials. Vol. 20, No. 12, pp: 1133-1142.
 ۲۴. **Mahmoud, N.S.; Ghaly, A.E. and Arab, F., 2007.** Unconventional Approach for Demineralization of Deproteinized Crustacean Shells for Chitin production. Am J Biochem Biothec. Vol. 3, No. 1, pp: 1-9.
 ۲۵. **Negrea, P.; Caunii, A.; Sarac, I. and Butnariu, M., 2015.** Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. Vol. 10, No. 4, pp: 1129-1138.
 ۲۶. **Pariser, E.R. and Lombardi, D.P., 2004.** A guide to the research literature chitin. Source book. Plenum press, New York. USA. 560 p.
 ۲۷. **Peberdy, J.F., 2010.** Biotechnological approaches to the total utilisation of crustacean shellfish waste. In Euro. Commission. Supported. STD. 3 projects (1992-1995), Internet, pdf: <http://user.Chollian.net/~Chitin>. 5 p.
 - هندی. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، دوره ۳، شماره ۱، صفحات ۴۹ تا ۵۵.
 ۶. **غیاث‌الدین، ع.؛ شجاع‌الساداتی، س.ع. و واشقانی‌فراهانی، ا.، ۱۳۹۰.** اصلاح و بهینه‌سازی فرایند استخراج کیتین از پوست میگو. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران. دوره ۳۰، شماره ۱، صفحات ۱ تا ۹.
 ۷. **منگلی‌زاده، ن.؛ جعفرزاده‌حقیقی‌فرد، ن.؛ تکدستان، ا. و هرمزی‌نژاد، م.، ۱۳۹۳.** ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی زیست پلیمر کیتوزان استخراجی از پوست میگو. مجله علوم و تکنولوژی پلیمر. دوره ۲۷، شماره ۶، صفحات ۳۷۱ تا ۳۸۰.
 ۸. **موسوی‌نسب، م.؛ موسوی‌نسب، س.؛ مصباحی، غ. و جمالیان، ج.، ۱۳۹۳.** ارزیابی خصوصیات کیفی کیتوزان تولیدی از پوسته میگو و کیتوزان تجاری پوسته خرچنگ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران. دوره ۱۱، شماره ۴۵، صفحات ۱۶۳ تا ۱۷۴.
 ۹. **یعقوبی، ن.؛ میرزاده، ح. و هرمزی، ف.، ۱۳۸۱.** بهینه‌سازی استخراج کیتین و تهیه کیتوزان از پوست میگو: بررسی عوامل موثر بر واکنش استیل‌زدائی کیتین. مجله علوم و تکنولوژی پلیمر. دوره ۱۵، شماره ۱، صفحات ۵۵ تا ۶۳.
 ۱۰. **Abdelmalek, B.E.; Sila, A.; Haddar, A.; Alibougatfe, A. and Ayadi, M.A., 2017.** β -chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 17, pp: 505-526.
 ۱۱. **Alder, E., 2000.** Chitin natural macromolecules. J. Chem. Of Macromolecules. Internet. Pdf. <http://www.seaborne.com/chitinzuide.htm>. 10.p.
 ۱۲. **Anderson, C.G.; Pablo, N. and Romo, C., 2001.** Antarctic krill (*Euphausia superba*) as a source of chitin and chitosan, in proceedings of the first International conference on chitin/chitosan
 ۱۳. **AOAC. 2002.** Official methods of analysis Association of Official Analytical Chemistry, 17th ed. The Association of Official Analytical Chemistry Inc: Washington, DC.
 ۱۴. **Brugnerotto, J.; Heux, L.; Desbrieres, J.; Versali, M.F.; Rinaudo, M., 2000.** Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. Biomacromolecules. Vol. 1, pp: 746-751.
 ۱۵. **Chandampai, A.; Singhpibulporn, N. and Faroongsarng, D., 2004.** Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. Journal of Carbohydrate Polymers. Vol. 58, pp: 467-474.
 ۱۶. **Demir, D.; Ofkeli, F.; Ceylan, S. and Bolgen, N., 2016.** Extraction and Characterization of Chitin



۲۸. **Peplow, A.J.; Appledorf, H. and Koburger, J.A., 1973.** Effect of boiling, frying, microwave, heating and canning on the proximate, mineral and thiamin content of shrimp. Florida agricultural experiment station series. Vol. 935, pp :94-101.
۲۹. **Sarboon, N.M.; Sandanamsamy, S.; Kamaruzaman, S.F.S. and Ahmad, F., 2014.** Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties. Journal of Food Science and Technology. Vol. 52, No. 7, pp: 4266-4275.
۳۰. **Seaborne. 2001.** A natural product for the 21th century, in Guide to Chitin, Internet Pdf: URL [http. VAvww.Seaborne. Com/Chitin2uide.htm](http://www.Seaborne.Com/Chitin2uide.htm). 5 p.
۳۱. **Tolaimate A.; Rhazi, M.; Alagui, A.; Desbrières, J. and Rinaudo, M., 2008.** Valorization of waste products from fishing industry by production of the chitin and chitosan Phys. Chem. News. Vol. 42, pp: 120-127.
۳۲. **Walton, A.G. and Rudall, K.M., 2001.** Biopolymers in Analysis of Chitin and Chitosan, (Anthonsen, P. and Ford, S., Eds) Elsevier, London. 276 p.

