

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کیتوزان بازیافتی از پوسته میگو سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) با روش فرآوری بهینه شده

ماهرخ چادوش^۱، سید علی جعفرپور^{۲*}، سکینه یگانه^۱، علیرضا عالیشاهی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه کشاورزی ساری، ایران.

۲. دانشیار، گروه شیلات دانشکده علوم دامی و شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. دانشیار، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۲۸

چکیده

به منظور بهینه‌سازی شرایط بازیابی کیتوزان از پوسته میگو سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)، میزان توان میکروویو در سطوح ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ وات، زمان ۷، ۹ و ۱۱ دقیقه و نسبت سدیم‌هیدروکسید به سوبسترا ۱:۱۵، ۱:۲۰ و ۱:۲۵ درصد، به‌عنوان متغیرهای مستقل مورد آزمون قرار گرفتند. ظرفیت اتصال آب برای کیتوزان بهینه و مرکزی به ترتیب ۶۰۰/۳۵ و ۶۰۰/۳۲ و به‌صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان تجاری با مقادیر ۵۱۶/۶۳ درصد بود ($P < 0/05$)، همچنین ظرفیت اتصال چربی برای نمونه کیتوزان بهینه ۵۰۰/۳۴ و کیتوزان مرکزی ۵۰۰/۳۳ بود که به‌صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان تجاری با میزان ۴۶۲/۴۵ درصد بود ($P < 0/05$). در خصوص پارامترهای رنگ، پارامتر سفیدی (W) برای کیتوزان تجاری ۷۷/۹۹ بود که به‌صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان‌های تولیدی بهینه و مرکزی (به ترتیب ۶۹/۹۶ و ۷۰/۹۹) بود ($P < 0/05$). بر اساس داده‌های FT-IR باندهای جذبی مربوط به گروه‌های NH و CH و باندهای اطراف ۱۶۸۰-۱۶۱۰، ۱۵۶۰-۱۵۱۵ و ۱۳۸۵-۱۳۴۵ به امید I، II و III در کیتوزان‌های بازیافتی مشاهده گردید در حالی که ساختار کششی C-O در جذب ۱۰۸۵-۱۰۱۰ اتفاق افتاد و گروه OH در جذب ۷۰۰-۶۷۰ مشاهده شد. میزان بلورینگی در کیتوزان بهینه (۲/۰۸) ثبت گردید که به‌صورت معنی‌داری کمتر از نمونه تجاری (۶۴/۲۱) و مرکزی (۷۵/۶۰) بود. پتانسیل زتا ذرات کیتوزان بهینه ۸/۵۶، مرکزی ۴/۴۸ و تجاری ۱۱/۶۰ میلی‌ولت بود، ($P < 0/05$). تصویر برداری SEM برای هر دو کیتوزان تجاری و تولیدی (بهینه و مرکزی) نشان دهنده ساختاری ناهمگن، با شکل تقریباً کروی و صفحه‌ای، بدون خلل و فرج بوده و همچنین ساختارهای رشته‌ای بهم پیوسته (میکرو فیبر) و پودری نیز مشاهده گردید، همچنین اندازه ذرات برای کیتوزان بهینه، مرکزی و تجاری به ترتیب ۳۵۲۴ و ۱۴۴۱ نانومتر بود. نتیجه این که جدای از سایز ذرات، کیتوزان بازیافتی از پوسته میگو سفید هندی درجه داستیلاسیون بالا به همراه ویژگی‌های کیفی و ساختاری مطلوب نشان داد.

واژگان کلیدی: کیتوزان، رنگ، بلورینگی، مورفولوژی ذرات، پتانسیل زتا.

۱. مقدمه

داستیله شدن از کیتین به دست می‌آید. کیتوزان از لحاظ شیمیایی دارای وزن مولکولی بالا، ساختار خطی و یک هتروپلی ساکارید پلی کاتیونی شامل دو مونوساکارید به نام N-استیل-گلوکوزآمین (N-D-acetyl-glucosamine) و D-گلوکوزآمین (D-glucosamine) می‌باشد. راندمان کیتوزان استخراج شده و خواص کارکردی آن به واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده کیتوزان بستگی دارند که مقادیر نسبی این واحدها در کیتوزان‌های مختلف به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت می‌باشند. دامنه‌ی درجه‌ی D-استیلاسیون کیتوزان بین ۹۵-۵۰ درصد، وزن مولکولی ۲۰۰۰-۱۰ کیلودالتون، و ویسکوزیته‌های متفاوت می‌باشد (Pillai et al., 2009; Alishahi and Aider, 2012).

تامین دمای فرایند استیل‌زدایی با استفاده از روش گرمادهی سنتی انجام می‌شود که نه تنها نیازمند زمان طولانی ۴ تا ۶ ساعت است، بلکه انرژی زیادی نیز هدر می‌رود و در نهایت کیفیت کیتوزان تولیدی در مقایسه با کیتوزان تجاری پایین بوده در نهایت این کاستی‌ها منجر به در نظر گرفتن تکنیک‌های سریع و آسان در آماده‌سازی نمونه مانند استخراج با میکروویو گردید. استفاده از انرژی میکروویو برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ و به طور هم‌زمان توسط Gedye و همکاران (۱۹۸۶) در سنتز و توسط Ganzler و همکاران (۱۹۸۶) برای استخراج نمونه‌های بیولوژیکی و آنالیز ترکیبات آلی گزارش شده است. به همین دلیل امروزه از تکنیک میکروویو برای این فرایند استفاده می‌شود زیرا باعث کاهش زمان استخراج به ۱۰-۵ دقیقه می‌گردد. از مزایای دیگر این تکنیک، انتقال سریع انرژی، کنترل آسان گرمایش نمونه، بهبود بازدهی استخراج، کاهش گرادیان حرارتی، ایجاد تلاطم و هم‌زنی در طی استخراج بوده و با توجه به این‌که در این مرحله همگن بودن محلول ضروری می‌باشد، انجام فرایند به صورت اتوماتیک، باعث می‌گردد که ویژگی‌ها و کیفیت کیتوزان از جمله خواص آنتی اکسیدانی آن در این روش نسبت به روش‌های دیگر بهتر حفظ می‌شود. همچنین کیتوزان تولیدی با میکروویو در مقایسه با کیتوزان تجاری از کیفیت بهتری برخوردار بوده و می‌توان محصول کیتوزان با درجه‌ی استیل‌زدایی متفاوت پایین، متوسط و بالا جهت کاربرد در صنایع مختلف با

میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) یکی از گونه‌های مهم تجاری است و زیستگاه عمده آن در حوزه شرقی استان هرمزگان واقع در دریای عمان و آب‌های جاسک و نواحی جگین می‌باشد. آمار صید میگو در سال ۱۳۹۴ در جنوب کشور حکایت از برداشت میزان تقریبی ۸۵۶۷ تن میگو در این منطقه را دارد. هر میگو با در نظر گرفتن مراحل مختلف رشدی همچون ناپلی، مایسیس، زوآ و پست لارو در طول زندگی خود چندین بار پوست‌اندازی می‌کند. ۴۰ تا ۶۹ درصد از وزن بدن این میگو را ضایعات از جمله پوست و سر تشکیل می‌دهد (Fanimo et al., 2000) و همین امر موجب شده که سالانه ۸۰۰۰۰ تن ضایعات توسط استخرهای پرورش میگو در جهان تولید شود. به علاوه مقدار زیادی ضایعات حاصل از میگو‌هایی که در دریا زندگی می‌کنند در فصول پوست‌اندازی به علت سبکی همراه با باد به سواحل آمده و در آنجا تجمع پیدا می‌کنند. همچنین ضایعات زیادی حاصل از کارخانه‌های فرآوری، بسته بندی و بازار میگو دور ریخته می‌شود که علاوه بر آلودگی، به دلیل رطوبت بالا، به سرعت فاسد شده و باعث ایجاد تعفن شده، مشکلات زیست‌محیطی را به وجود می‌آورند که از بین بردن آن‌ها نیازمند صرف هزینه‌های زیادی است، که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیست. این ضایعات حاوی مواد زیست‌فعال مانند کیتین، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه و رنگدانه هستند، بنابراین برای حل مشکلات زیست‌محیطی می‌توان از این ضایعات برای تولید مواد زیست‌فعال از جمله کیتین استفاده کرد (Sachindra et al., 2005).

کیتین (β -D-(1-4)N-acetyl-glucosamine)، پلیمری طبیعی شبه سلولزی با فرمول شیمیایی $(C_8H_{13}O_5N)_n$ ، وزن مولکولی 203.19 دالتون و ماده‌ای سخت و سفید تا سفید خامه‌ای رنگ، غیر الاستیک دارای واکنش‌پذیری ضعیف بوده و در آب و اسیدها نامحلول بوده و فقط قابل حل در اسیدهای قوی با ساختار تعریف شده N-استیل- β -D-گلوکز آمین می‌باشد. فراوانترین و پرکاربردترین مشتق طبیعی کیتین، کیتوزان است. کیتوزان (با نام علمی deoxy- α -2-amino- β -D-(1-4)-gulcan) پس از

آبی (*Portunus segnis*) که در آب‌های بندرعباس به صورت نمونه برداری ضمنی صید می‌گردید، انجام شد (Khakshur and Pazoki, 2013). در مطالعه‌ای که توسط صداقت و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، به منظور پروتئین‌زدایی و معدن‌زدایی ضایعات میگوی تحت تیمار باکتری‌ها، شرایط حرارت دهی به مدت شش روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه انجام پذیرفت (Sedaght et al., 2015).

با توجه به سابقه پژوهشی ذکر شده، مطالعات صورت گرفته در خصوص استخراج کیتوزان از پوسته میگو سفید هندی به کمک روش مایکروویو بسیار محدود بوده و لزوم انجام پژوهش‌های بیشتری در این زمینه وجود دارد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر ضمن استخراج کیتوزان به روش مایکروویو، استفاده از پراکسید هیدروژن برای اولین بار به منظور رنگبری و بررسی ویژگی‌های کیفی کیتوزان استخراج شده بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱.۲. استخراج کیتوزان از پوسته میگو

در این تحقیق کیتوزان از پوسته میگوی سفید هندی با استفاده از روش شیمیایی استخراج شد. برای این منظور ابتدا پوسته‌ها از بازار میگوی بهبهان جمع‌آوری شده، در مایکروویو با توان ۱۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه خشک شده و بعد با دستگاه آسیاب به پودر تبدیل گردیدند. سپس پودرها با استفاده از الک‌های به اندازه چشمه ۲۵۰ میکرومتر الک شده و در نهایت در بسته‌های نایلونی زیپ‌دار بسته‌بندی و به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردیده و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- نگهداری شدند. استخراج کیتین از پوسته‌ها طی مراحل زیر صورت گرفت.

۲.۱.۲.۱. شستشوی اولیه

تمامی پودرهای پوسته‌ی میگو در آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه در نسبت ۱:۲ (آب:پودر) شسته شده و با کاغذ صافی آب آن‌ها گرفته شده و در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا وزن ثابت خشک شدند (Kucukgulmez et al., 2011; Younes et al., 2012).

۲.۱.۲. پروتئین‌زدایی

کیفیت و سرعت بالا و زمان کوتاه تولید کرد (Khajeh Noori and Haghghi Asl, 2013).

در مطالعه‌ای که توسط گانگنه و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد، از آنزیم کیموتریپسین و پاپائین برای هیدرولیز پروتئین از ضایعات پوست میگو جهت استخراج کتین با استفاده از روش بهینه یابی سطح پاسخ (RSM) از فاکتورهای دما، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا در چهار سطح مختلف استفاده کردند (Gagné et al., 1993). در مطالعه‌ای که توسط مانی و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد از پروتئاز میکروبی *Bacillus cereus* برای استخراج کیتین از پوست میگو با نسبت آنزیم/سوبسترا ۲۰ درصد برای هیدرولیز پروتئین و هیدروکلریدیک اسید ۱/۲۵ مولار برای معدن‌زدایی به مدت ۶ ساعت و در دمای اتاق استفاده کردند (Manni et al., 2010). در مطالعه‌ای که توسط خانفوری و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد، ابتدا کیتین و کیتوزان به روش شیمیایی و میکروبی از ضایعات میگو *Penaeus semisulcatus* تحت شرایط بهینه استخراج شد. در روش شیمیایی از محلول سدیم هیدروکسید و اسیداستیک استفاده شد و بازده آن به ترتیب ۴۱۰ و ۵۱۰ میلی‌گرم/گرم بود. در روش میکروبی از اسیدلاکتیک تولید شده توسط باکتری *Lactobacillus plantarum* برای پروتئین‌زدایی و معدن‌زدایی استفاده شد. به منظور دستیابی به ترکیبات داستیله کیتوزان، محلول قلیایی ترکیبات استخراج شده در دوره زمانی ۱۵، ۲۰، ۴۵ دقیقه و ۱۰ ساعت در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و با اتانول آبگیری گردید. در مطالعه‌ای که توسط Valdez و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد از آنزیم‌های آلکالاز، تریپسین در pH = ۸/۰ زمان ۶ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای بازگشت پروتئین و برای املاح زدایی و در نهایت تولید کیتین با اسید استیک با استفاده از امواج مایکروویو در ۴۰۰ W در زمان ۳۰ دقیقه از ضایعات سر میگو استفاده کردند. در مطالعه‌ای که توسط محمد و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد از سدیم هیدروکسید، هیدروکلریدیک اسید برای معدن‌زدایی و پروتئین‌زدایی و از استون هم برای رنگبری از کتین استفاده کردند (Mohammed et al., 2013). در مطالعه‌ای دیگر توسط خاکشور و پازوکی (۲۰۱۳)، استخراج کیتین و کیتوزان از پوسته خرچنگ شناگر

همکاران (۲۰۱۴)، تیوب سانتریفوژ حاوی ۰/۵ گرم نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر آب یا روغن زیتون را وزن و روی یک مخلوط‌کن گردابی به مدت ۱ دقیقه مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. نمونه‌ها هر ۱۰ دقیقه به مدت ۵ ثانیه تکان داده شده و آن‌گاه در سرعت ۳۲۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و در نهایت مایع فوقانی خارج و تیوب دوباره وزن شد.

معادله‌ی (۱)

ظرفیت باندکردن آب = گرم آب باند شده تقسیم بر وزن نمونه بر حسب گرم $\times 100$
 ظرفیت باندکردن چرب = گرم چربی باند شده تقسیم بر وزن نمونه بر حسب گرم $\times 100$

۳.۲. آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تهیه عکس‌های میکروسکوپ الکترونی SEM با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی انجام گرفت. دستگاه دارای یک پایه جهت استقرار نمونه به شکل دایره‌ای شکل با قطر ۴-۲ سانتی‌متر می‌باشد. ابتدا روی پایه مقداری چسب کربنی سیاه رسانا قرار داده و نمونه مورد نظر روی آن قرار گرفت. روی نمونه هم یک روکش طلای ۱۰ نانومتری کشیده شد تا نمونه از تمامی جهات الکترون‌های زیادی را انتقال دهد. با توجه به بزرگنمایی دستگاه SEM این پوشش روی تصویر نمونه اثری نخواهد داشت. سپس تصویربرداری نمونه‌ها در شرایط خلاء با قدرت تفکیک ۳ نانومتر و در شتاب الکترون ۱۵ کیلو الکترون ولت در بزرگنمایی ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر انجام گرفت. در این تحقیق تاثیر اعمال جریان الکتریکی بر روی ساختار کیتوزان تهیه شده با استفاده از آنالیز SEM مورد بررسی قرار گرفت (Takeuchi *et al.*, 2001).

۴.۲. اندازه‌گیری رنگ کیتوزان:

برای اندازه‌گیری رنگ کیتوزان مقداری از پودر کیتوزان بر روی کاغذی تیره ریخته و سپس میزان رنگ با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج مدل IMG-Pardazesh Cam-System XI (شرکت ابزار کاران

۲۰ گرم از پودر پوسته‌ی میگو در محلول ۲ مولار هیدروکسید سدیم با نسبت ۱:۲۰ (قلیا : سوبسترا) با استفاده از توان ۱۸۰ و ۳۰۰ وات به ترتیب در زمان ۵ و ۳ دقیقه در مایکروویو قرار گرفتند و سپس سانتریفوژ (۱۵ دقیقه در دور $5000 \times g$) شدند. سپس بخش جامد ته‌نشین شده شسته و با آون (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۱ ساعت) خشک گردید (Rao *et al.*, 2000; Mousavi Nasab *et al.*, 2015).

۳.۱.۲. معدن‌زدایی

بخش جامد (املاح) به دست آمده از مرحله‌ی پروتئین زدایی شده با اسید هیدروکلریدریک ۲ مولار به نسبت ۱:۱۰ (اسید : سوبسترا) ترکیب شده و در مایکروویو با توان ۴۵۰ وات در زمان ۸ دقیقه قرار گرفت. کیتین تولید شده با قیف بوختر صاف و با آب مقطر شسته شده و در دمای ۹۰ درجه خشک گردید (Younes *et al.*, 2012).

۴.۱.۲. رنگبری از کیتین

کیتین کانی‌زدایی و پروتئین زدایی شده در ۲۰ حجم پراکسید هیدروژن ۳۳ درصد برای ۳۰ دقیقه نگه داشته شده و سپس با آب مقطر شستشو داده شده و به مدت ۶ ساعت در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید.

۵.۱.۲. استیل‌زدایی از کیتین

کیتین‌های به دست آمده از مرحله معدن‌زدایی با سطوح مختلف هیدروکسید سدیم (۱:۱۵، ۱:۲۰ و ۱:۲۵) در مایکروویو با توان‌ها و زمان‌های متفاوت قرار داده شده و سپس ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند تا بخش جامد ته‌نشین گردد. سپس رسوب داخل لوله‌ها جمع آوری شده تا رسیدن به pH خنثی با آب مقطر شسته شده و سپس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت در آون خشک گردیدند (Lertsutthiwong *et al.*, 2002).

۲.۲. ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان

جهت اندازه‌گیری ظرفیت اتصال کیتوزان با آب و ظرفیت اتصال با چربی مطابق روش موسوی نسب و

باعث افزایش سرعت بررسی نمونه می‌شود. در این پژوهش آنالیز ذرات کیتوزان و خصوصیات این پلیمر با استفاده از پرتو پراش ایکس (PANalytical، مدل X'Pert Pro) ولتاژ ۴۰ کیلو ولت، ۴۰ آمپر و تابشی با طول موج (آنگستروم) $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ و زاویه‌ی 2 θ از بین ۵ تا ۴۵ درجه اندازه‌گیری گردید.

۸.۲. طرح آماری آزمایش‌ها (تیمارها)

از آن‌جا که در بسیاری از روش‌های مرسوم و متداول فرآیند استخراج کیتوزان (به‌خصوص روش فاکتوریل) و بررسی اثر پارامترهای موثر بر این فرآیند (آزمایش‌های چند عاملی) یک فاکتور مورد کاربری و بقیه‌ی فاکتورها تحت شرایط خاص جهت تعیین نقطه-ی بهینه، ثابت نگه داشته می‌شوند و با توجه به وقت گیر بودن و صرف هزینه و انرژی، و همچنین چشم-پوشی از اثرات متقابل بین متغیرها بمنظور رسیدن به یک نقطه‌ی بهینه‌ی واقعی، از روش آماری سطح پاسخ استفاده شد (Fendri et al., 2013). سه پارامتر مهم جهت انجام این فرآیند نسبت سدیم‌هیدروکسید به پوسته میگو، توان مایکروویو و زمان انجام فرآیند بود (El Knidri et al., 2016).

روش سطح پاسخ به جهت یافتن حالت بهینه فاکتورها انتخاب شد که نشان‌دهنده‌ی تاثیر فاکتورها بر نتیجه‌ی آزمایش‌ها است. بر این اساس، تعداد کل آزمایشات برابر ۲۰ (۴ نقطه‌ی فاکتوریل، ۴ نقطه‌ی محوری یا ستاره‌ای و ۶ نقطه‌ی مرکزی) بوده و متغیر وابسته (پاسخ آزمایش) درجه‌ی داستیلاسیون و بازده استخراج کیتوزان می‌باشد. فاکتور α (فاصله‌ی بین نقطه‌ی مرکزی تا نقطه‌ی محوری) معادل ۱ (Alpha= ۱) در نظر گرفته شد (جدول ۱).

۹.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها خواص کیفی کیتوزان، آنالیز داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SPSS (Version 22) و با روش آنالیز آماری واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) بررسی شد، برای مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده شد.

فن پویای شمال ایران) اندازه‌گیری شد و فاکتورهای رنگ از قبیل روشنایی (L^*)، قرمزی-سبزی (a^*)، زردی-آبی (b^*) و سفیدی در هر نمونه اندازه‌گیری شد.

۵.۲. طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

در این آزمون برای تعیین ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی کیتوزان از روش FT-IR استفاده شد. مقدار ۱۵ mg از پودر نمونه با مقدار کافی از پودر KBr مخلوط و پرس گردیده و یک قرص به ضخامت ۲ میلی‌متر تهیه شد. سپس با استفاده از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز (اسپکترومتر BRUCKER، مدل EQUINOX55، ساخت کشور آلمان) مورد بررسی قرار گرفت (موسوی نصب و همکاران، ۲۰۱۰). معادله زیر برای تعیین درجه استیله بودن کیتوزان استفاده شد (Raberts et al., 1992).

معادله‌ی (۲)

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

۶.۲. تعیین اندازه ذرات کیتوزان و پتانسیل زتا (DLC)

اندازه ذرات و پتانسیل زتا کیتوزان، با استفاده از دستگاه پراکنندگی نور دینامیک (DLS) مدل Malvern zetasizer Nano Series ساخت شرکت Malvern تعیین گردید. بر این اساس مقدار یک گرم از پودر در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده و به‌منظور رقیق سازی فیلتراسیون و سانتریفیوژ شد تا سوسپانسیون شفاف از نمونه‌ی اصلی برای انجام مرحله‌ی رقیق سازی موجود باشد. مقداری از نمونه در کووت (cuvette) ریخته، کووت در دستگاه قرار داده شده و شدت پراکنندگی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، با ضریب شکست ۱/۳۳۵ اندازه‌گیری شد. سایز ذرات و پتانسیل زتا در طول موج ۶۳۳ نانومتر تعیین شد.

۷.۲. تعیین بلورینگی کیتوزان (XRD)

پرتو اشعه‌ی ایکس یک ابزار برای بررسی ساختار ریز نمونه است که از آن برای تعیین ساختار بلوری استفاده می‌شود. برای تعیین میزان بلورینگی ذرات کیتوزان از پودر کیتوزان استفاده می‌گردد که ذرات پودر باید کوچکتر از ۵۰ میکرومتر باشند زیرا این امر

جدول ۱- نمایش متغیرهای مستقل فرایند استخراج - کیتوزان و مقادیر آن‌ها به صورت کد شده و حقیقی.

متغیر مستقل	علامت	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
توان (W)	A	۳۰۰	۶۰۰	۹۰۰
زمان (t)	B	۷	۹	۱۱
نسبت ماده به سوپسترا (ml:gr)	C	۲۵	۲۰	۱۵

جدول ۲- مقایسه میانگین درجه داستیلاسیون کیتوزان.

کیتوزان	درجه داستیلاسیون*
کیتوزان بهینه	$80/59 \pm 0/01^a$
کیتوزان مرکزی	$80/28 \pm 0/01^b$
کیتوزان شاهد	$78/50 \pm 0/01^c$

* میانگین \pm انحراف معیار (حروف بالانویس انگلیسی متفاوت در هر سطوح بیانگر وجود اختلاف معنی‌داری آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد می باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان.

کیتوزان	WBC (ظرفیت باند کردن آب)	WFC (ظرفیت باند کردن چربی)
کیتوزان بهینه	$600/35 \pm 0/15^a$	$500/34 \pm 0/05^a$
کیتوزان مرکزی	$600/32 \pm 0/48^a$	$500/33 \pm 0/11^a$
کیتوزان شاهد	$516/63 \pm 7/58^b$	$462/45 \pm 10/64^b$

گروه‌های استامید OH، NH و CH حذف شده، پیک-های گروه آمید NH (نیتروژن) در نمونه‌های کیتوزان به‌خصوص کیتوزان بهینه افزایش یافت (شکل‌های ۳-۱).

۲.۳. ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان

مقایسه‌ی میانگین داده‌ها در ظرفیت باند کردن آب و چربی کیتوزان نشان داد که نمونه‌های کیتوزان بهینه با نمونه‌های کیتوزان مرکزی تفاوت معنی‌داری ندارند. این در حالی است نمونه کیتوزان‌های استخراجی بهینه و مرکزی دارای تفاوت معنی‌داری با نمونه کیتوزان شاهد (تجاری) بودند ($P < 0/05$).

۳.۳. مورفولوژی ذرات کیتوزان

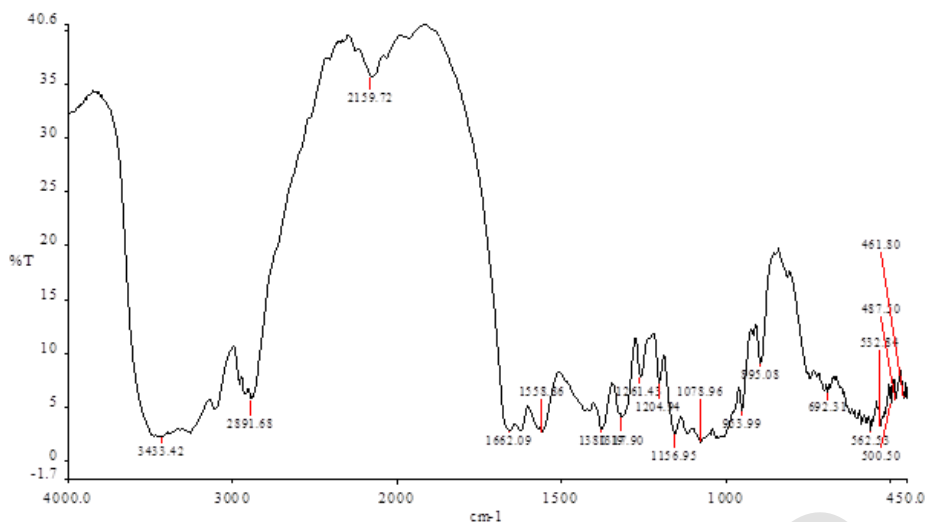
مورفولوژی کیتوزان استخراج شده توسط روش میکروویو، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و عکس‌هایی از SEM با بزرگنمایی‌های متفاوت و سطوح مختلفی از کیتوزان مشخص شد. تصویربرداری SEM برای هر دو کیتوزان تولیدی ساختاری ناهمگن، با شکل تقریباً کروی و صفحه‌ای، بدون خلل و فرج را نشان می‌دهد. با بزرگنمایی بیشتر مشاهده می‌گردد که کیتوزان تولیدی دارای ساختار نیمه کروی متراکم و لایه لایه است. همچنین به مقدار بسیار کمی

۳. نتایج

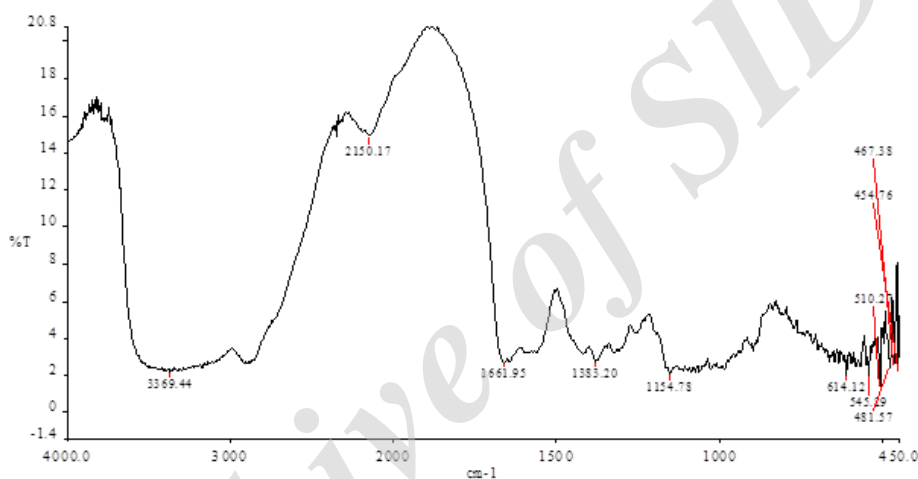
نتایج نشان داد که درجه داستیلاسیون در کیتوزان بهینه (کیتوزان استخراجی زمان ۷ دقیقه حرارت‌دهی) به‌صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان مرکزی (کیتوزان استخراجی زمان ۹ دقیقه حرارت‌دهی) است. همچنین درجه داستیلاسیون کیتوزان‌های استخراجی (بهینه و مرکزی) دارای اختلاف معنی‌داری با کیتوزان شاهد بودند (جدول ۲).

۱.۳. طیف سنجی (FT-IR)

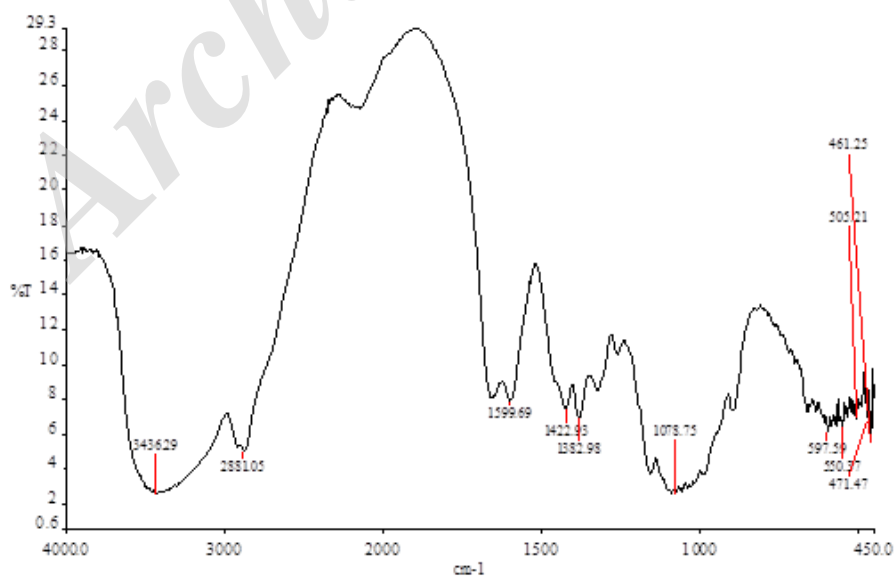
در مطالعه‌ی حاضر طیف‌های به‌دست آمده از نمونه کیتوزان‌های بهینه، مرکزی و تجاری طبق جدول ۳، گروه‌های عاملی درگیر در نمونه را مشخص می‌نماید به‌طوری‌که باندهای جذبی در ناحیه‌ی ۳۳۰۸-۳۴۸۰ و ۲۸۷۰-۲۹۶۰ مربوط به گروه‌های NH و CH در کیتوزان‌های تولیدی مشاهده شد. باندهای اطراف ۱۶۸۰-۱۶۱۰، ۱۵۶۰-۱۵۱۵ و ۱۳۸۵-۱۳۴۵ به امید I، II و III اختصاص یافتند. در حالی که باندهای کششی در حدود ۱۱۶۰-۱۱۵۰ (ساختار کششی نامتقارن C-O-C) مشاهده شد. ساختار کششی O-C در جذب ۱۰۸۵-۱۰۱۰ و گروه OH در جذب ۷۰۰ - ۶۷۰ ثبت گردید. همان‌طور که از جدول ۳ مشخص است در کیتوزان بهینه با درجه‌ی استیلاسیون بالاتر



شکل ۱ - طیف FT-IR کیتوزان بهینه (کیتوزان استخراجی با زمان ۷ دقیقه حرارت دهی).



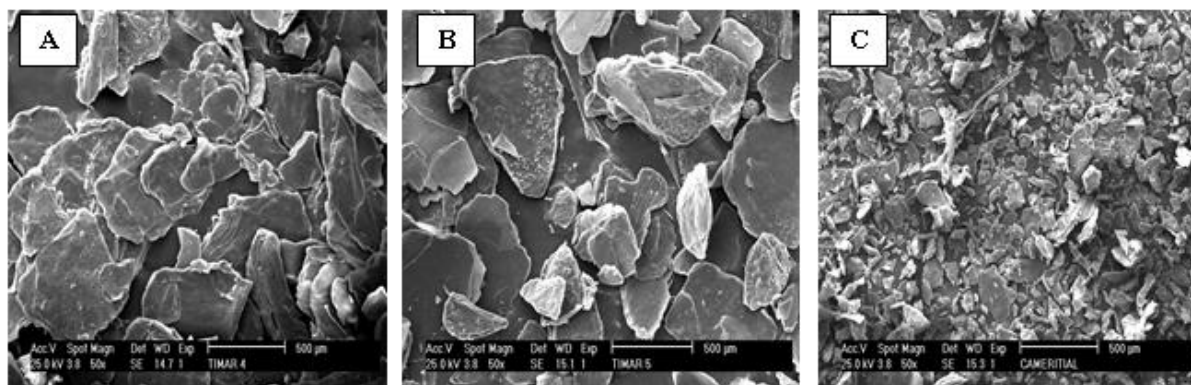
شکل ۲ - طیف FT-IR کیتوزان مرکزی (کیتوزان استخراجی با زمان ۹ دقیقه حرارت دهی).



شکل ۳ - طیف FT-IR کیتوزان شاهد (کیتوزان تجاری).

به‌وفور به مشاهده می‌گردد که به‌صورت لایه‌های نازک و به‌هم پیوسته در کنار هم قرار گرفته‌اند. این در حالی

ساختارهای رشته‌ای به‌هم پیوسته و پودری دیده می‌شود که این ساختارهای رشته‌ای در کیتوزان مرکزی



شکل ۴ - عکس‌های SEM با بزرگنمایی متفاوت از مورفولوژی کیتوزان: A تیمار بهینه (کیتوزان استخراجی زمان ۷ دقیقه حرارت-دهی): B کیتوزان مرکزی (کیتوزان استخراجی زمان ۹ دقیقه حرارت‌دهی) و C کیتوزان تجاری.

جدول ۴- مقایسه میانگین داده‌های رنگ پودر کیتوزان.

کیتوزان	L	a	b	WI
کیتوزان بهینه	$73/18 \pm 0/01$	$3/40 \pm 0/01$	$12/99 \pm 0/01$	$69/96 \pm 0/01$
کیتوزان مرکزی	$75/05 \pm 0/01$	$4/01 \pm 0/00^c$	$14/19 \pm 0/001$	$70/99 \pm 0/001$
کیتوزان تجاری	$73/93 \pm 0/01$	$-3/69 \pm 0/001^a$	$10/18 \pm 0/001$	$77/99 \pm 0/53$

جدول ۵- میانگین و توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا پودر کیتوزان تولید شده.

کیتوزان	پتانسیل زتا	اندازه ذرات	PDI
کیتوزان بهینه	$8/56 \pm 0/01$	$1839 \pm 1/0$	$0/467 \pm 0/001$
کیتوزان مرکزی	$4/48 \pm 0/01$	$3524 \pm 1/0$	$0/303 \pm 0/001$
کیتوزان تجاری	$11/60 \pm 0/435$	$1441 \pm 1/0$	$0/847 \pm 0/001$

و b^* در کیتوزان مرکزی به صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان بهینه بوده و در کیتوزان تجاری به صورت معنی‌داری کمتر از نمونه کیتوزان‌های استخراجی بود ($P < 0/05$) (جدول ۴).

است که ساختار کیتوزان تجاری نیز همانند کیتوزان تولیدی به صورت ناهمگن بوده و همچنین در این کیتوزان به مقدار بسیار کمی ساختارهای رشته‌ای بهم پیوسته، پودری و بدون خلل و فرج دیده می‌شود (شکل ۴).

۵.۳. ارزیابی اندازه و پتانسیل زتای کیتوزان

با توجه به جدول ۵، در این فرایند پتانسیل زتا و شاخص پراکنندگی PDI نانو ذرات کیتوزان تجاری به صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان تولیدی بهینه و مرکزی بوده و هم چنین این شاخص‌ها در کیتوزان تولیدی بهینه با زمان ۷ دقیقه حرارت دهی نسبت به مرکزی با زمان ۹ دقیقه حرارت دهی به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$). اندازه ذرات کیتوزان تجاری دارای اختلاف معنی‌داری با کیتوزان تولیدی بهینه و مرکزی بود ($P < 0/05$).

۶.۳. ارزیابی بلورینگی کیتوزان

شاخص بلورینگی در کیتوزان دارای دو پیک شاخص در مقادیر $2\theta = 20$ و $2\theta = 10$ بوده که پیک

۴.۳. ارزیابی رنگ پودر کیتوزان

از نظر رنگ ظاهری، کیتوزان تولید شده به صورت یک پودر سفید تا صورتی ملایم بود در حالی که کیتوزان تجاری پودری کرم رنگ بود. میزان فاکتور روشنایی (L) و اندیس سفیدی (WI) پودر کیتوزان استخراجی مرکزی به صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان بهینه بود. این در حالی است که اندیس سفیدی (WI) در کیتوزان تجاری به صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان‌های استخراجی بهینه و مرکزی بود. فاکتور روشنایی (L) کیتوزان تجاری به صورت معنی‌داری بالاتر از کیتوزان بهینه و کمتر از کیتوزان مرکزی بود ($P < 0/05$) که نشان دهنده‌ی رنگبری مطلوب در نمونه‌های کیتوزان تولیدی است. فاکتور a^*

جدول ۶- مقایسه میانگین بلورینگی پودر کیتوزان تولید شده.

بلورینگی	کیتوزان
$2/0.8 \pm 0/0.1$	کیتوزان بهینه
$57/60 \pm 0/0.1$	کیتوزان مرکزی
$44/92 \pm 0/0.1$	کیتوزان تجاری

و با تکنیک مایکروویو به ترتیب با درجه‌ی استیل‌زدایی ۸۱/۵۰ و ۸۲/۵۳ درصد از پوسته میگو استخراج شد. در این مطالعه، طیف‌های به‌دست آمده از گروه‌های عاملی در گیر در این دو نوع کیتوزان مشخص نمود که جذب‌های در ناحیه‌ی ۳۴۰۰-۳۳۸۰، ۳۲۹۰-۳۲۷۰ و ۲۹۶۰-۲۸۷۰ مربوط به گروه‌های OH، NH، و CH بود. باندهای اطراف ۱۶۴۰، ۱۵۶۰ و ۱۳۸۰ به آمید I، II و III اختصاص یافتند. در حالی که باندهای کششی در حدود ۱۱۵۳ مربوط به ساختار کششی نامتقارن C-O-C بوده و ساختار کششی C-O در جذب ۱۰۶۵-۱۰۱۰ و گروه OH در جذب ۶۷۰ مشاهده شد که داده‌های مطالعه‌ی حاضر با نتایج این گزارش هم‌خوانی دارد.

طبق تحقیقی که توسط Ana و همکاران (۲۰۱۲) بر روی خصوصیات و ویژگی‌های عملکردی کیتوزان و مشتقات آن با درجه‌ی استیل‌زدایی بالا انجام شد، جذب در محدوده‌ی ۳۴۸۰-۳۴۴۰، ۳۲۷۰-۳۲۶۰ و ۲۹۶۰-۲۸۷۸ مربوط به گروه‌های OH، NH، و CH در کیتوزان‌های تولید شده گزارش گردید. باندهای اطراف ۱۶۴۰، ۱۵۶۰ و ۱۳۸۰ cm^{-1} به آمید I، II و III اختصاص یافتند. در حالی که باندهای کششی در حدود ۱۱۵۵ (ساختار کششی نامتقارن C-O-C) ظاهر شدند. ساختار کششی C-O در جذب ۱۰۳۴ مشاهده شد که نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج این مطالعه نیز مطابقت دارد.

در مطالعه‌ای که توسط Kafshgari و همکاران (۲۰۱۲)، بر روی بهینه‌سازی و تعیین درجه داستیلاسیون کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل-سنجی و طیف‌سنجی زیر قرمز انجام شد درجه‌ی استیل‌زدایی کیتوزان با وزن ملکولی متوسط و بالا و بهینه‌سازی شده در محدوده‌ای از ۷۷-۹۳ درصد گزارش گردید. در طیف زیر قرمز پودرهای کیتوزان، پیک‌های در طول موج‌های $3700-3000 \text{ cm}^{-1}$ گزارش گردید که گروه‌های عاملی O-H، NH₂ را نشان می‌دهد. همچنین در طول موج 2876 cm^{-1}

$2\theta = 20$ تیزتر و دارای شدت بیشتر و در نهایت کریستالی‌تر از پیک $2\theta = 10$ است. در الگوی XRD هرچه پیک دارای شدت بیشتر و بلندتر (نوک تیزتر) باشد بلورینگی بیشتر دارد و اگر پیک پهن‌تر و شدت کمتری داشته باشد، بلورینگی کمتری دارد. در مطالعه‌ی حاضر طبق جدول ۶ کیتوزان بهینه دارای دو پیک شاخص در $2\theta = 10/20$ و $2\theta = 19/95$ درجه با شدت کمتر نسبت به کیتوزان مرکزی با دو پیک شاخص $2\theta = 9/95$ و $2\theta = 19/95$ درجه بود. پیک کیتوزان تجاری $2\theta = 10/15$ و $2\theta = 20/05$ درجه بوده که دارای شدت پیک کمتر از کیتوزان مرکزی و بیشتر از کیتوزان بهینه بود. بلورینگی در کیتوزان بهینه نسبت به کیتوزان مرکزی به صورت معنی‌داری پایین‌تر بوده ($P < 0/05$) و در کیتوزان تجاری دارای اختلاف معنی‌داری با کیتوزان استخراجی بهینه و مرکزی می‌باشد ($P < 0/05$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

۱.۴. طیف سنجی (FT-IR)

دستگاه FT-IR روشی برای شناسایی ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی آن‌ها می‌باشد که می‌توان پیوند-های کووالانسی لیگاند‌های مختلف را شناسایی کرد. فرایند استیل‌زدایی بیش‌ترین اثر را بر گروه‌های استامید (NH، CH، OH) دارد، به طوری که طی این فرایند با افزایش درجه داستیلاسیون، گروه‌های آمین (NH) افزایش می‌یابد و افزایش این گروه (NH) باعث افزایش خاصیت پلی‌کاتیونی بیوپلیمر کیتوزان شده و در نهایت ماهیت لخته‌کنندگی و کلاته‌کردن کیتوزان حاصل افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ی حاضر کیتوزان بهینه، مرکزی و تجاری به ترتیب با درجه‌ی استیل‌زدایی ۸۰/۵۹، ۸۰/۲۸ و ۷۸/۵۰ درصد از پوسته‌ی میگوی سفید هندی به‌دست آمد.

در پژوهشی که توسط El Knidri و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، کیتوزان با دو روش شیمیایی سنتی

هسته‌ای، طیف نور خطی، روش آنزیمی و طیف نور-سنجی سیرکولاردیکروویزم دارای دقت‌های متفاوتی هستند. در این مطالعه از طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده شد که دارای دقت مناسب و مطلوبی بود. از جمله عوامل موثر دیگر دمای بالا است که از تعداد گروه‌های استامید موجود روی زنجیره کاسته و بر تعداد گروه‌های آمین کیتوزان می‌افزاید. به طوری که در مطالعه‌ی حاضر دما (توان مایکروویو) دارای تاثیر مثبت و درجه‌ی دو بر درجه‌ی استیل‌زدایی داشته است. درجه داستیلاسیون تحت تاثیر زمان واکنش افزایش می‌یابد و در این مطالعه زمان دارای تاثیر خطی معنی-داری بر روی درجه داستیلاسیون بود. همچنین نوع ماده مورد استفاده برای انجام این فرآیند یعنی استفاده از آنزیم یا شرایط قلیایی از عوامل تاثیرگذار دیگر می-باشد، به طوری که هیدروکسید سدیم (NaOH) دارای تاثیر قوی‌تری نسبت به آنزیم بوده و باعث گردید که گروه‌های استیل با استفاده از هیدروکسید سدیم داغ آبکافت شده و پیوندهای گلیکوزیدی در زنجیره‌های کیتوزان از بین روند. به طوری که در این مطالعه هیدروکسید سدیم دارای اثری درجه دوم بر درجه داستیلاسیون بود. از عوامل تاثیرگذار دیگر شرایط مناسب برای انجام مرحله‌ی استیل‌زدایی کیتین به کیتوزان است. چرا که استیل‌زدایی کیتین به کیتوزان در این پژوهش در شرایط هوای آزاد انجام شد، اما برای استیل‌زدایی بالاتر (نزدیک به ۱۰۰ درصد)، در بسیاری از پژوهش‌ها برای تسهیل شکست گروه‌های زنجیر پلیمر از محیط با نیتروژن زیاد استفاده می‌شود. در نهایت با توجه به مطالعات انجام شده، کیتوزان تولیدی مطالعه‌ی حاضر از درجه‌ی داستیلاسیون مطلوب و بالای برخوردار بوده و می‌تواند برای استفاده در صنایع مختلف همچون فیلم‌های نگهدارنده مواد غذایی و پزشکی و غیره مورد استفاده قرار گیرند.

۲.۴. ظرفیت باند شدن آب و چربی کیتوزان

ظرفیت باندشدن آب و چربی یک ویژگی فیزیکی است که بر ویژگی‌های عملکردی کیتوزان تاثیر می-گذارد. جذب روغن بیشتر یک پدیده‌ی فیزیکی است، به طوری که ترکیبات و بیوپلیمرهای موجود در نمونه باعث محبوس شدن و به دام افتادن قطرات روغن در

گروه عاملی CH- و در 1656 cm^{-1} گروه آمیدی CONH- و در طول موج 1554 cm^{-1} گروه آمیدی NH- باند دوم و در طول موج 1322 cm^{-1} گروه آمیدی NH- باند سوم و همچنین در طول موج 1083 cm^{-1} گروه عاملی C-O مشاهده شد که نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج مطالعه فوق مطابقت داشت.

طبق مطالعه‌ی که توسط Gartner و همکاران (۲۰۱۰) بر روی استخراج کیتوزان از پوسته‌ی میگو با دو روش شیمیایی و آنزیمی انجام گردید، طیف مادون قرمز باندهای جذبی را در کیتوزان نشان می‌دهد که ارتعاشات کششی آمین NH باند I و OH بین $3000-3500 \text{ cm}^{-1}$ در جذب 1654 cm^{-1} مشاهده شد. اتصال گروه C-C حلقه‌های گلوکوپیرانوز در 1205 cm^{-1} اتفاق افتاد و بین باند جذبی $1157-1027$ باندهای زیادی از گروه کششی الکی C-O مشاهده شد. در این طیف که دارای ویژگی باندهای کیتین است تراکم پایین گروه کششی C=O در 1659 cm^{-1} با باند گروه NH هم‌پوشانی دارد. پیوند دوگانه آمین NH (II) در جذب 1560 cm^{-1} و گروه C-H با 1378 cm^{-1} در 1314 cm^{-1} هم‌چنین گروه C-H در 1261 cm^{-1} کشش دارد. طبق پژوهش Nouri و همکاران (۲۰۱۱)، کیتوزان با درجه‌ی داستیلاسیون $89/43$ درصد بازیابی شد. بر اساس گزارش این پژوهشگران، تبدیل موفقیت-آمیز کیتین به کیتوزان با تجزیه و تحلیل FT-IR تایید شد. ویژگی‌های اصلی محدوده‌ی جذب در 3300 ، 3152 ، 1701 و 1640 به ترتیب مربوط به کشش (C=O)، CH(CH₃)، NH(-NHCOCH₃)، NHCOCH₃ و CN(-NHCOCH₃) در نمونه‌های کیتوزان (B و C) باند ضعیف 1697 cm^{-1} و 1700 آمید I مشاهده شدند.

در مطالعه‌ی حاضر کیتوزان‌های تولیدی از درجه‌ی داستیلاسیون بالای ۸۰ درصد برخوردار بود. علت آن را می‌توان به نوع روش اندازه‌گیری درجه‌ی داستیلاسیون نسبت داد. روش‌های اندازه‌گیری درجه داستیلاسیون با توجه به نوع روش طیف‌سنجی مادون قرمز، طیف نورسنجی UV، تیتراسیون کلوئیدی، تیتراسیون پتانسیل سنجی، روزنانس مغناطیس

مطالعه‌ی حاضر نتایج این پژوهش مطابقت داشت. خصوصیات فیزیکوشیمیایی کیتوزان بر خواص عملکردی آن تاثیر می‌گذارد و بر اساس گونه‌ها و شرایط تولید متفاوت هستند. افزایش در ظرفیت باند شدن آب در کیتوزان زمانی دیده می‌شود که کانی-زدایی قبل از پروتئین‌زدایی صورت گیرد، هم‌چنین داستیلاسیون به‌خوبی صورت گیرد و کیتوزان مورد نظر از درجه‌ی داستیلاسیون بالای برخوردار باشد، از طرفی دیگر افزایش ظرفیت جذب آب کیتوزان به pH بستگی دارد. در pH کمتر از نقطه‌ی ایزوالکتریک گروه‌های آمین و استامید به‌دلیل پرتون‌دار شدن بار خالص مثبت پیدا می‌کنند و به‌صورت هیدروفیل درمی‌آیند و آب بیشتری جذب می‌کنند. به همین علت در مطالعه‌ی حاضر قبل از انجام آزمایش WBC و FBC کیتوزان مورد نظر در اسید رقیق حل شد تا جذب آب و چربی آن افزایش آن پیدا کند. کریستالی-بودن کیتوزان از عوامل دیگری است که در جذب آب تاثیرگذار است و هرچه کیتوزان از لحاظ ساختاری دارای کریستال کمتری باشد جذب آب توسط کیتوزان افزایش پیدا می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر نمونه‌ی مورد نظر دارای جذب آب و چربی بالایی بوده است.

۳.۴. مورفولوژی ذرات کیتوزان

برای تعیین اندازه و مورفولوژی ذرات سنتز شده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌شود. در این حالت شکل، اندازه و توزیع اندازه‌ی ذرات بررسی می‌شود. باید توجه داشت که در ویژگی‌های یک نمونه، نه تنها نوع فازها، بلکه شکل، اندازه و توزیع ذرات نیز موثر هستند. بنابراین مطالعه‌ی این ویژگی‌ها در ساختار میکروسکوپی و به منظور ارزیابی رفتار نمونه ضروری است (Kucukgulmez et al., 2011). فرایند استیل‌زدایی دارای تاثیر قابل توجهی بر وزن ملکولی، اندازه ذرات و در کل مورفولوژی و ساختار کیفی کیتوزان است (El Knidri et al., 2016). در مطالعه-ی حاضر، تصویر برداری SEM برای هر دو کیتوزان تجاری و تولیدی (بهینه و مرکزی) دارای ساختاری ناهمگن، با شکل تقریباً کروی و صفحه‌ای، بدون خلل و فرج را نشان می‌دهند هم‌چنین ساختارهای رشته‌ای بهم پیوسته (میکرو فیبر) و پودری نیز دیده می‌شود.

داخل خود می‌شوند (Singthong et al., 2009). طبق جدول ۳ ظرفیت اتصال آب (WBC) و ظرفیت اتصال چربی (FBC) نمونه‌های تیمار کیتوزان به‌ترتیب ۶۰۰/۳۵ و ۵۰۰/۳۴ درصد، کیتوزان مرکزی ۶۰۰/۳۲ و ۵۰۰/۳۳ درصد، و کیتوزان تجاری ۵۱۶/۶۳ و ۴۶۲/۴۵ درصد بود.

در مطالعه‌ی که توسط موسوی نسب و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان استخراجی از پوسته‌ی میگو با کیتوزان تجاری از پوسته‌ی خرچنگ انجام شد ظرفیت جذب آب و چربی به ترتیب برای کیتوزان تولیدی ۷۰۲/۵ و ۵۴۶/۵۷ و برای کیتوزان تجاری ۴۶۹/۲۴ و ۴۴۶/۳۱ درصد بود، که نتایج پارامتر جذب چربی مطالعه‌ی حاضر با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

طبق گزارش منگلی‌زاده و همکاران (۲۰۱۳) ظرفیت باندشدن آب و چربی برای کیتوزان تولید شده از پوسته‌ی میگو و با روش شیمیایی به‌ترتیب ۵۲۱ و ۳۲۷ درصد بود (Mangli-Zadeh et al., 2013). هم‌چنین Cho و همکاران (۱۹۹۸) ظرفیت باند کردن آب و چربی را برای پنج نوع کیتوزان تجاری تولید شده به‌ترتیب در دامنه‌ی ۸۰۵-۴۵۸ درصد و ۵۳۵-۳۱۴ درصد گزارش نمودند که نتایج مطالعه‌ی حاضر در خصوص این دو پارامتر در دامنه‌ی ذکر شده با این پژوهش همخوانی دارد.

در پژوهشی که توسط Kucukgulmez و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد کیتوزان را از پوسته‌ی میگوی دریای مدیترانه *Metapenaeus stebbingi* استخراج کردند و ظرفیت اتصال آب و چربی کیتوزان تولیدشده به ترتیب ۴۹۲/۶۷ و ۳۸۳/۰۴ درصد بود. طی تحقیقی که No و همکاران (۲۰۰۰) انجام دادند محدوده‌ی ظرفیت باند شدن آب و چربی را به ترتیب ۶۱۱-۳۵۵ درصد و ۴۷۷-۲۱۷ درصد گزارش نمودند. نتایج ظرفیت اتصال آب این پژوهش با مطالعه‌ی حاضر سازگار بود. در مطالعه‌ای که توسط Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد ظرفیت آب و چربی کیتوزان استخراجی با مایکروویو بیشتر از اتوکلاو بوده و اختلاف معنی‌داری بین میزان WBC (۵۹۵-۵۷۰ درصد) و FBC (۴۰۴-۳۸۰ درصد) تولیدی با مایکروویو و WBC (۵۱۰-۴۴۷ درصد) و FBC (۴۲۸-۳۸۰ درصد) تولیدی با اتوکلاو گزارش گردید و نتایج

با توجه به نتایج می‌توان این‌گونه بیان نمود که دلیل این شباهت‌ها با پژوهش‌های انجام‌شده می‌تواند به دلیل همسان بودن عوامل متعدد تاثیرگذار در استخراج کیتوزان، مانند دمای استخراج، غلظت سدیم هیدروکسید و زمان فرایند است که سبب استخراج کیتوزانی با ساختارهای متفاوت می‌شوند (در مطالعه‌ی حاضر اثر توان مایکروویو تاثیر درجه‌ی دو مثبت داشته و اثر زمان و سدیم‌هیدروکسید نیز به ترتیب خطی و درجه دوم و منفی بود). هم‌چنین مراحل استخراج کیتین به ویژه‌ی مرحله‌ی معدن‌زدایی و غلظت اسید مورد استفاده از جمله فاکتورهای مهمی در تعیین ساختار کیتین و در نهایت کیتوزان تولیدی می‌باشد با توجه به توانایی این فرایند در حذف مواد معدنی که هرچه در این مرحله املاح معدنی بیشتر حذف شده باشند تعداد منافذ و اندازه‌ی آن‌ها در ساختار کیتوزان حاصل بیشتر خواهند بود و بالعکس.

۴.۴. ارزیابی رنگ پودر کیتوزان

تصاویر دیجیتالی قادر به ثبت رنگ در هزارن نقطه بوده و بنابراین اطلاعات دقیق و جزئی را در خصوص نحوه‌ی پراکنش و رنگ و جلوه ظاهری یک محصول از ما می‌گذارند. رنگ و جلوه ظاهری یک محصول از مهمترین پارامترهایی مد نظر مشتریان به‌منظور برآورد کیفیت ماده و بنابراین به‌عنوان فاکتورهای حساس در خصوص رد یا قبول آن شناخته می‌شوند. رنگ یکی از پارامترهای ارزیابی کیفیت کیتوزان محسوب می‌شود به‌خصوص این‌که کیتوزان در صنایع مختلف به‌خصوص صنایع مواد غذایی به‌منظور پوشش فیلم‌ها کاربرد دارد. شفافیت فیلم‌ها نیز ویژگی مهمی است چون به‌طور مستقیم بر ظاهر محصول پوشش داده شده اثر می‌گذارد. به‌عبارت دیگر با شفافیت بیشتر این فیلم‌ها جذب بالاتر می‌رود و نوری کمتری را از خود عبور می‌دهند که این خود می‌تواند یک سد عالی برای جلوگیری از اکسایش چربی ناشی از القای نوری باشد (Chen et al., 2010).

با توجه به داده‌های گزارش حاضر از نظر رنگ ظاهری، میزان فاکتور روشنایی (L) مربوط به پودر کیتوزان تولیدی بهینه، مرکزی و تجاری به ترتیب ۷۳/۱۸، ۷۵/۰۵ و ۷۳/۹۳ بود. همچنین اندیس سفیدی

نتایج مطالعه‌ی حاضر با گزارش El Knidri و همکاران (۲۰۱۶) مشابه بود به طوری که در این گزارش کیتوزان به‌دست آمده به‌صورت لایه‌لایه با اندازه‌های متفاوت، متراکم و بهم فشرده و بدون خلل و فرج بود و هم‌چنین با گزارش Kucukgulmez و همکاران (۲۰۱۱) نیز مشابه بود که طبق این گزارش کیتوزان به‌دست آمده از پوسته‌های *Metapenaeus stebbingi* به‌صورت لایه لایه، و کمی خلل و فرج در بعضی از مناطق دیده شد، ضمن این‌که در برخی از بخش‌های کیتوزان ساختارهای فیبری به‌راحتی قابل تشخیص بود. اما نتایج مطالعه حاضر با گزارش Alishahi و همکاران (۲۰۱۱) که کیتوزان تولیدی را دارای ساختار هموزن و بلوری معرفی کردند متفاوت بود. براساس مطالعه‌ی Yen و همکاران (۲۰۰۹) کیتین استخراج‌شده ساختاری کریستالی و میکروفیبری را نشان داد، این درحالی است که کیتوزان‌های تولیدی پس از داستیلایسون ساختار میکروفیبری مشابهی را نشان دادند. با این حال کیتوزان تجاری و از خرچنگ چینی ساختار میکروفیبری را نشان ندادند، اما لایه‌هایی از پوسته‌های فرو ریخته را نشان دادند.

در پژوهش Asadpour و همکاران (۲۰۰۳) در ارتباط با ساختار کیتین و کیتوزان حاصل از روش شیمیایی و میکروبی از ضایعات میگو و حرارت‌دهی کیتوزان در زمان‌های مختلف (۱۵ دقیقه تا ۱۰ ساعت) در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که ارتباط معنی‌داری بین یون کلسیم در نمونه، تعداد و اندازه منافذ وجود دارد. آنالیز میکروسکوپ الکترونی برای کیتوزان نشان داد که در نمونه‌هایی که یون کلسیم دیده نمی‌شود افزایش تعداد و بزرگی اندازه منافذ دیده می‌شود و برعکس در گراف‌هایی که حضور یون کلسیم تایید شد منافذ کم یا بسته شده‌اند. طی تحقیقی که Paulino و همکاران (۲۰۰۵) انجام دادند، کیتین و کیتوزان از سفیره کرم ابریشم و با استفاده از روش شیمیایی سنتی جداسازی شد. کیتین جداسازی شده دارای ساختار چندین صفحه‌ای خوب و یکپارچه بوده و با نتایج کیتین‌های به‌دست آمده از سخت‌پوستان مشابه بود، ولی کیتوزان به‌دست آمده از سفیره کرم ابریشم بسیار متخلخل، و دارای ساختاری فیبر مانند بود.

رنگ اثر می گذارند می توان به نوع ماده‌ی مورد استفاده برای مرحله‌ی رنگ‌بری اشاره نمود که در مطالعه‌ی حاضر از پراکسید هیدروژن به جای استون، اتانول و پرمنگنات پتاسیم استفاده شد و باعث رنگ‌بری مطلوب از نمونه‌های کیتین تولیدی شد. هم‌چنین چگونگی مرحله‌ی پروتئین‌زدایی با توجه به این‌که بسیاری از کارتنو پروتئین‌ها در این مرحله جدا می‌شوند و شاخص‌های L و اندیس سفیدی افزایش و شاخص a کاهش می‌یابند به طوری که در این گزارش فاکتور a دارای نتایج مطلوبی بوده و حاکی از آن است که پروتئین‌زدایی به خوبی صورت گرفته است. در نهایت رنگ سفید و روشن این محصول از خواص کیفی بالای این محصول می‌باشد و می‌تواند برای کاربرد در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

۵.۴. تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی

ذرات:

پتانسیل زتا به بار سطحی ذرات موجود در یک سیال گفته می‌شود. اندازه‌گیری پتانسیل زتا یکی از عوامل مهم در پایداری مواد کلوئیدی است. این پتانسیل زتا می‌تواند شرایط نمونه را در حالت‌های مهم نشان دهد اگر همه‌ی ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار منفی یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند و تمایلی به هم انباشتگی از خود نشان نمی‌دهند. تمایل ذرات هم بار به دفع یکدیگر رابطه‌ی مستقیمی با پتانسیل زتا دارد. به‌طور کلی مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان بر حسب پتانسیل زتا تعیین نمود. ذراتی که پتانسیل زتا آن‌ها از ۳۰ میلی‌ولت بیشتر یا ۳۰- میلی‌ولت کمتر باشند پایداری دارند. روش‌های محدودی برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا وجود دارد. در این پژوهش حاضر، تئوری پتانسیل زتا و چگونگی اندازه‌گیری آن با دستگاه DLS مورد بررسی قرار گرفت (Maraddeh et al., 2016).

با توجه به نتایج گزارش شده، در این فرایند پتانسیل زتا ذرات کیتوزان بهینه ۸/۵۶، کیتوزان مرکزی ۴/۴۸ و نمونه کیتوزان تجاری ۱۱/۶۰ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی PDI برای کیتوزان بهینه، مرکزی و تجاری به ترتیب ۰/۴۶۷، ۰/۳۰۳ و ۰/۸۴۷ بود. اندازه‌ی ذرات در سه نمونه کیتوزان ذکر شده

فاکتور (WI) مربوط به کیتوزان تجاری و تولیدی (بهینه و مرکزی) به ترتیب ۷۰/۹۹، ۶۹/۹۶ و ۷۷/۹۹ بود. فاکتور a (قرمز-سبز) و b (زرد-آبی) در کیتوزان تولیدی بهینه ۳/۴۰ و ۱۲/۹۹، کیتوزان مرکزی ۴/۰۱ و ۱۴/۱۹ و کیتوزان تجاری ۳/۶۹- و ۱۰/۱۸ گزارش گردید.

طبق گزارش Mousavi Nasab و همکاران (۲۰۱۳) فاکتورهای L ، a ، b و WI کیتوزان تولیدی از پوسته‌ی میگو و با استفاده از روش شیمیایی به ترتیب ۸۲/۲۸، ۱۶، ۱۰ و ۷۷/۲۰ و برای نمونه تجاری سیگما به ترتیب ۶۸/۱۴، ۵/۵، ۲۲/۳۰ و ۶۴/۵۰ بود. نتایج رنگ کیتوزان تولیدی مطالعه حاضر با کیتوزان تولیدی این گزارش مطابقت داشته و با این تفاوت که مقدار فاکتور قرمزی در مطالعه‌ی حاضر پایین‌تر از این مطالعه بود. در مطالعه Alishahi و همکاران (۲۰۱۱)، فاکتورهای L ، a و b نوع کیتوزان تولیدی از پوسته‌ی میگو با استفاده از دو روش میکروویو و اتوکلاو استخراجی به ترتیب بین ۸۷/۹۵-۶۶/۸۴، ۳/۵ تا ۷/۴ و ۱۰/۱ تا ۱۳/۵۵ و ۸۳/۲۱-۶۶/۸۴، ۲/۵ تا ۷/۶۵ و ۱۰/۱ تا ۱۳/۶۵ بود. داده‌های مطالعه‌ی حاضر با این یافته‌ها مطابقت داشت.

بر اساس مطالعه‌ی Yen و همکاران (۲۰۰۸)، پارامترهای رنگ سه نوع کیتوزان استخراج شده از پوسته‌ی خرچنگ و دو نوع کیتوزان تجاری و چینی در دامنه‌ی از ۶۳/۴-۵۵/۴ L ، ۲/۲-۰/۳ a ، ۱۰/۱-۱۶/۸ b و WI ۴۳/۹-۶۲/۱ بود که شاخص WI و L کیتوزان چینی بالاتر از کیتوزان‌های تولیدی و تجاری بود، کیتوزان تولیدی بالاترین میزان زردی (شاخص b) و کیتوزان تجاری بالاترین میزان قرمزی (شاخص a) را داشتند.

در تحقیق Kucukgulmez و همکاران (۲۰۱۱)، از پوسته‌ی نوعی میگوی دریای مدیترانه و دریای اژه به نام *Metapenaeus stebbingi* کیتوزان استخراج کرده و خواص فیزیکوشیمیایی آن از جمله رنگ را اندازه‌گیری کردند که شاخص L ، a ، b و WI برای کیتوزان تجاری و تولیدی به ترتیب (۸۳/۱۴-۸۲/۷۴)، (۰/۱۲- و -۰/۲۳)، (۱۸/۴۹-۱۳/۵۸) و (۷۴/۶۹-۷۸/۳۵) بود.

با توجه به مطالعات فوق از فاکتورهای دیگری که در طول استخراج بر خواص کیفی کیتوزان از جمله

کیتوزان استفاده می‌شود. در پژوهش‌های فوق نیز از روش‌های ذکر شده برای تولید نانو ذرات کیتوزان استفاده شده و در واقع از کیتوزان با وزن ملکولی پایین استفاده گردیده که در نتیجه نانوذراتی با اندازه کوچکتر، پتانسیل زتای بالاتر و در نهایت پایداری کلوییدی بیشتر تولید می‌شود.

۵. نتیجه‌گیری نهایی

در این مطالعه جهت استحصال کیتین و کیتوزان با روش شیمیایی و با استفاده از تکنیک میکروویو اثر متغیرهای مستقل توان میکروویو، زمان و نسبت سوبسترا به سدیم هیدروکسید سدیم، توان میکروویو زمان حرارت‌دهی در قالب آزمون بهینه‌یابی سطح پاسخ انجام شد. نتایج نشان داد بهترین بازیابی درجه‌ی داستیلاسیون ۸۰/۵۹ مربوط بهترین شرایط تولید آن در توان میکروویو ۳۰۰ وات) زمان ۷ دقیقه و نسبت سوبسترا به سدیم‌هیدروکسید ۱:۲۵ به‌دست آمد. بررسی خواص کیفی نشان داد که این پودر از لحاظ ظرفیت جذب آب و چربی، رنگ، و بلورینگی مطلوب و مناسب بوده و دارای مورفولوژی نسبتاً مطلوبی است. ولی از لحاظ پتانسیل‌زتا و اندازه ذرات مناسب نبوده و این به‌علت نوع منبع مورد استفاده، مواد و روش متفاوت مورد استفاده برای تهیه‌ی نانوذرات و شرایط آزمایش می‌باشد.

References

- Asghari, S.M., Ebrahimi Samani, S.M., Seraj, S., Khwajah, K., Hassan Khani, S., 2012. Optimization of chitosan nanoparticles. *Biotechnology Tarbiat Modare University* 4(2), 29-21.
- Alishahi, A., Aider, M., 2012. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. *Food and Bioprocess Technology* 5(3), 817-830.
- Asadpour, Y., Shojaa al-Sadati, S.A., Kalbasi, M., Khosrow Shahi, A., 2003. Evaluation of the quality of chitin and chitosan extracted from the cysts of *Artemia urmiana* and their comparison with two other types of shrimp and crayfish. *Journal of Science and Technology Polymer* 2, 89-94.
- Bajaj, M., Winter, J., Gallert, C., 2011. Effect of deproteination and deacetylation conditions on viscosity of chitin and chitosan extracted from Crangon crangon shrimp waste. *Biochemical Engineering Journal* 56(1), 51-62.
- Chen, C.H., Kuo, W.S., Lai, L.S., 2010. Water barrier and physical properties of starch/decolorized hsian-tsoo leaf gum films: Impact of surfactant lamination. *Food Hydrocolloids* 24(2), 200-207.
- Cho, Y.I., No, H.K., Meyers, S.P., 1998. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9), 3839-3843.
- De Oliveira, S.P.D., Mahl, C.R.A., Simoes, M.R., Da Silva, C.F., 2012. Chitosan as flocculant agent for clarification of stevia extract. *Polimeros* 22(4), 410-406.
- El Knidri, H., El Khalfaouy, R., Laajeb, A., Addaou, A., Lahsini, A., 2016. Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation. *Process Safety and Environmental Protection* 104, 395-405.

یعنی بهینه، مرکزی و تجاری به‌ترتیب ۱۸۳۹، ۳۵۲۴ و ۱۴۴۱ نانومتر بود.

طی پژوهشی که توسط Bulmer و همکاران (۲۰۱۱) انجام گردید، نانو ذراتی با قطرهای مختلف ۱۰۰ - ۴۰۰ نانومتر، و پتانسیل زتا ۳۰ تا ۵۰ میلی‌ولت تولید شدند. در پژوهش Gan و همکاران (۲۰۰۵)، که بر روی تعدیل سطح بار، اندازه ذرات و ویژگی‌های مورفولوژیکی نانو ذرات کیتوزان - TPP (سدیم تری-پلی فسفات) برای انتقال ژن انجام دادند، اندازه‌ی ذرات در دامنه ۱۰۰۱۶/۲-۱۳۶/۲ نانومتر و پتانسیل زتای ۴۹/۲-۷/۶ گزارش گردید. طبق نتایج اصغری و همکاران (۲۰۱۳)، نانو ذرات کیتوزان با اندازه بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر، با بار سطحی بین ۱۰ تا ۳۰ میلی‌ولت تولید شدند. در مطالعه Lifeng و همکاران (۲۰۰۴)، نانو ذرات کیتوزان را با اندازه ۲۸ تا ۲۵۷ نانومتر، با بار سطحی بین ۳۰/۸ تا ۱۱۰/۰۵ میلی‌ولت گزارش گردیدند.

نتایج مطالعه‌ی حاضر با این مطالعات مغایرت داشت، که علت این مغایرت را می‌توان در یکی نبودن روش‌های تولید ذرات بیان کرد. نانسازی کیتوزان از طریق چهار روش gelation، Emulsification solvent، Iontropic، Microemulsion diffusion، Polyelectrolyte، complex انجام می‌شود که از بین این روش‌ها از ساده‌ترین روش ionic gelation برای تولید نانوذرات

- Fanimo, A.O., Oduguwa, O.O., Onifade, A.O., Olutunde, T.O., 2000. Protein quality of shrimp waste meal. *Bioresource Technology* 72(2), 185-188.
- Fendri, I., Khannous, L., Timoumi, A., Gharsallah, N., Gharsallah, N., Gdoura, R., 2013. Optimization of cogulation-flocculation process for printing ink industrial wastewater treatment uoy sing response surface methodology. *African Journal of Biotechnology* 12(30), 4819-4826.
- Ganzler, K., Salgó, A., Valkó, K., 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A* 371, 299-306.
- Gartner, C., Peláez, C.A., López, B.L. 2010. Characterization of chitin and chitosan extracted from shrimp shells by two methods. *e-Polymers* 10(1), 748-763.
- Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J., 1986. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Letters* 27(3), 279-282.
- Hasanzadehe kafshgari, H., Khoram, M., Mansoori, M., Samimi, E., 2012. Improvement and Determination of degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration and sub-red spectrometry. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering of Iran* 31(20), 2-13
- Khajeh Noori, M., Haghighi Asl, A.S., 1392. Investigation of extraction of natural compounds of plants using microwave and ultrasonic waves. *Modern Food Technologies* 1(3), 81-91.
- Khakshur, M.P., Pazoki, C., 2013. Extraction of Chitin and chitosan in the external skeleton of (portunus segnis Forskal 1775) in the Banjarabbas - Persian Gulf region. *Journal of Zoological Ecology* 1, 1.
- Gagné, N., 1993. Production of chitin and chitosan from crustacean waste and their use as a food processing aid. M.Sc. thesis, McGill University, Montreal, Candad.
- Khanafari, A., Marandi, R.E.Z.A., Sanatei, S., 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 5(1), 1-24.
- Khanafari, A., Sanati Koupaei S., 2009. Growth inhibition of Pseudomonas aeruginosa by degree of deacetylation values of chitosan. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 19 (71), 10-19.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H., Kadak, A.E. 2011. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry* 126(3), 1144-1148.
- Lertsutthiwong, P., How, N.C., Chandkrachang, S., Stevens, W.F., 2002. Effect of Chemical Treatment on the Characteristics of Shrimp Chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 12(1), 11-18.
- Mohammed, M.H., Williams, P.A., Tverezovskaya, O., 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids* 31(2), 166-171.
- Mangli-Zadeh, N., Jafarzadeh, N., Takdastan, A., Hermesynejad, M., 2012. Physico-chemical properties of chitosan extracted from shrimp shell. *Journal of Science and Technology Polymer* 27(6), 380-371.
- Mousavi Nasab, M., Mousavi Nasab, S., Mesbahi, G., Jamalian, J., 2013. Qualitative properties evaluation of the produced chitosan from shrimp shell and commercial chitosan of crab shell. *Food Science and Technology* 11(45), 163-174
- No, H.K., Lee, K.S., Meyers, S.P., 2000. Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. *Journal of Food Science* 65(7), 1134-1137.
- Nouri, M., Khodaiyan, F., Razavi, S. H., Mousavi, M., 2016. Improvement of chitosan production from Persian Gulf shrimp waste by response surface methodology. *Food Hydrocolloids* 59, 50-58.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Nasri, M., 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(2), 345-357.
- Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C., Nozaki, J., 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers* 64(1), 98-103.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34(7), 641-678.
- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339(16), 2693-2700.
- Raberts, G.A.F., 1992. Chitin chemistry. London: Macmillan Press. 1811 p.
- Rao, M.S., Munoz, J., Stevens, W.F., 2000. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6), 808-813.
- Sedaght, F., Yousefzadeh, M., Tuyserkani, H., Najafpour, S., 2015. Extracting chitosan from shrimp waste by microbial fermentation by cultivating glucose. *Tarbiat Modares University Biotechnology* 11(45), 163-171.
- Sachindra, N.M., Mahendrakar, N.S., 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology* 96(10), 1195-1200.
- Maraddeh, S., Qariloo, D. 2016. Zeta potential theory and how to use the dls device to determine the zeta potential. *Bioresource Technology* 3(1), 9.
- Singthong, J., Thongkaew, C., 2009. Using hydrocolloids to decrease oil absorption in banana chips. *LWT-Food Science and Technology* 42(7), 1199-1203.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Kawashima, Y., 2001. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug*

- Delivery Reviews* 47(1), 39-54.
- Valdez-Peña, A.U., Espinoza-Perez, J.D., Sandoval-Fabian, G.C., Balagurusamy, N., Hernandez-Rivera, A., De-la-Garza-Rodriguez, I.M., Contreras-Esquivel, J.C., 2010. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Science and Biotechnology* 19(2), 553-557.
- Yen, M.T., Yang, J.H., Mau, J.L., 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 75(1), 15-21.
- Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Nasri, R., Chaabouni, M., Rinaudo, M., Nasri, M., 2012. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry* 47(12), 2032-2039.

Archive of SID