

استخراج کیتین و تولید کیتوزان از پوست میگو با کمک پرتو الکترونی

احمد توکلی،

گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

مسلم توکل*⁺

گروه مهندسی شیمی و پلیمر، دانشگاه یزد، یزد، ایران

محبوبه محمودی

گروه مهندسی پزشکی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

فاطمه انوری

مجتمع پرتو فرآیند ایران مرکزی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، یزد، ایران

چکیده: در این مطالعه، تأثیر پرتو دهی الکترونی پوست میگو، زمان، غلظت اسید کلریدریک و غلظت هیدروکسید سدیم بر فرآیند استخراج کیتین و تولید کیتوزان بررسی شد. ویژگی‌های محصولات با آزمون‌های طیف‌سنجی فروسرخ، پراش پرتو ایکس، گرماسنجی وزنی، گرانشی‌سنجی، قدرت جذب آب و چربی و خواص ضد میکروبی ارزیابی شد. میزان و سرعت حذف مواد معدنی و پروتئین با افزایش غلظت اسید و باز تا حدی افزایش یافت و سپس ثابت شد. معدنی‌زدایی با اسید کلریدریک ۰/۵ مولار در زمان ۶ ساعت و پروتئین‌زدایی با سود ۱ مولار در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت به عنوان فرآیند مناسب استخراج کیتین، پیشنهاد شد. پرتو دهی موجب کاهش زمان مورد نیاز فرآیندهای معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی شد. کلسیم باقی‌مانده در پوست‌های پرتو دهی نشده و پرتو دهی شده با دز ۳۰ کیلوگری پس از ۶ ساعت تیمار با اسید کلریدریک ۰/۵ مولار، به ترتیب ۱۳/۷۵ و ۹/۷۵ میلی‌گرم بر گرم بود. افزایش دز پرتو دهی در بازه ۱۰-۱۰۰ کیلوگری، منجر به کاهش وزن مولکولی، افزایش درجه استیل‌زدایی و کاهش بلورینگی کیتوزان شد. بسته به دز پرتو دهی و شرایط استیل‌زدایی، کیتوزان با درجه استیل‌زدایی بین ۶۰-۹۵ درصد و وزن مولکولی $2/3 \times 10^4 - 2/1 \times 10^5$ تولید شد. قدرت جذب آب و چربی بسته به دز پرتو دهی به ترتیب در محدوده ۸۶۰-۶۵۰ و ۳۶۰-۵۴۰ بدست آمد. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی کیتوزان‌های تولیدی، علیه اشرشیا کولای به ترتیب در محدوده ۰/۶-۰/۸ و ۱/۴-۲/۵ و علیه استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب در محدوده ۰/۷-۰/۱۰ و ۰/۸-۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. قطر هاله عدم رشد، برای باکتری‌های یاد شده با افزایش دز پرتو دهی از صفر به ۹۹ کیلوگری به ترتیب از ۳/۷ به ۱۷/۲ و از ۵ به ۱۸/۸ میلی‌متر افزایش یافت. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد، پرتو دهی الکترونی روشی امیدوار کننده برای تولید کیتین و کیتوزان با خواص منحصر به فرد برای کاربردهای مختلف است.

کلمات کلیدی: پوست میگو، کیتین، کیتوزان، پرتو الکترونی

KEYWORDS: Shrimp shells, Chitin, Chitosan, Electron beam irradiation.

مقدمه

پوست سخت پوستان دریایی مانند میگو، به عنوان ضایعات محصولات دریایی، شامل سه بخش اصلی کیتین (۱۰-۳۰ درصد وزنی)، پروتئین (۳۰-۴۰ درصد وزنی) و مواد معدنی (۴۰-۶۰ درصد وزنی) است. با توجه به میزان قابل توجه مصرف محصولات دریایی، ایجاد راه کاری برای استحصال مواد با ارزش از ضایعات این محصولات، علاوه بر ایجاد ارزش افزوده اقتصادی، از تولید مقدار زیادی آلاینده محیط زیست جلوگیری می کند [۱-۳]. کیتین و مشتقات حاصل از آن دارای کاربرد گسترده در صنایع دارویی و آرایشی-بهداشتی، صنایع غذایی، صنایع بسته بندی، تصفیه آب و پساب و ... هستند. کیتوزان پلی ساکاریدی کاتیونی است که از حذف جزئی گروه های استیل از کیتین (حداقل ۵۰ درصد) و جایگزینی گروه آمین، معمولاً با هیدرولیز قلیایی در دمای بالا، تولید می شود. این ماده دارای کاربرد گسترده در صنایع مختلف است و در سال های اخیر پژوهش های زیادی در زمینه گسترش کاربرد آن در تصفیه آب و پساب، رهایش دارو و ژن، مهندسی بافت، التیام زخم، ریزپوشانی مواد مغذی، پوشش های خوراکی و ... انجام شده است [۴-۹]. کیتوزان بر خلاف کیتین در اکثر محلول های اسیدی ضعیف مانند محلول اسید استیک، محلول اسید فرمیک و اسیدهای لوئیس مانند محلول کلرید آلومینیوم حل می شود. کیتوزان، بسته به میزان خلوص و کیفیت می تواند در صنایع مختلف استفاده شود و قیمت آن نیز بر اساس خلوص و کارایی متغیر است [۲، ۱۰]. با انجام برخی اصلاحات و با کنترل خواصی مانند وزن مولکولی و درجه استیل زدایی، خواص این ماده مانند حلالیت، آبدوستی، گرانبوی، فعالیت ضد میکروبی و قدرت اتصال به چربی قابل تنظیم است [۱۱، ۱۲]. مطابق نتایج پژوهش ها، افزایش درجه استیل زدایی و کاهش وزن مولکولی موجب بهبود حلالیت، افزایش خاصیت ضد میکروبی و افزایش قدرت اتصال به چربی کیتوزان می گردد [۱، ۲، ۱۳، ۱۴].

به صورت کلی برای استخراج مواد مؤثره از منابع مختلف، با توجه به ماهیت ترکیبات، از قدیم روش های سنتی مانند خیساندن، تراوش، جوشاندن، استخراج با بخار آب و استخراج سوکسله انجام می شده است [۱۵، ۱۶]. با توجه به مشکلاتی مانند زمان بر و هزینه بر بودن و بازدهی پایین این روش ها، امروزه با کمک میدان های الکتریکی، امواج فراصوت، ریزموج، حلال های بحرانی، مایعات یونی، آنزیم ها و ... روش های نوین استخراج با بازدهی، سرعت و صرفه اقتصادی بالاتر توسعه داده شده اند [۱۶-۲۰]. برای مثال پژوهش گران استخراج روغن های ضروری گیاهی با کمک حلال فوق بحرانی را با روش های سنتی مقایسه کردند و برای بررسی اثر عوامل مؤثر بر فرآیند، ارائه رابطه ریاضی مناسب بین

متغیرهای مستقل و وابسته و بهینه سازی فرآیند از طراحی آزمایش سطح پاسخ استفاده کردند. آن ها به این نتیجه رسیدند که استفاده از حلال بحرانی موجب افزایش بازدهی استخراج نسبت به روش سنتی تقطیر با بخار آب شده است [۱۷].

برای استخراج کیتین از پوست میگو، لازم است چربی، رنگدانه، مواد معدنی و پروتئین ها از پوست میگو جدا شوند. در روش رایج استخراج کیتین، تماس پوست میگو با محلول اسیدهای مانند کلریدریک اسید، استیک اسید، لاکتیک اسید یا ... برای حذف ترکیبات معدنی و با محلول بازهایی مانند هیدروکسید سدیم یا هیدروکسید پتاسیم برای حذف ترکیبات پروتئینی و چربی احتمالی باقیمانده انجام می شود تا در نهایت کیتین از پوست میگو استخراج شود. ممکن است پس یا پیش از این مراحل، شستشو با الکل ها برای حذف رنگ و چربی باقیمانده انجام شود. کارایی شستشوی اسیدی و بازی به عواملی مانند نوع و غلظت اسید یا باز و دما و زمان فرآیند بستگی دارد [۳، ۲۱]. پس از تولید کیتین، استیل زدایی معمولاً توسط واکنش با سود بسیار غلیظ در دمای بالا انجام می شود تا کیتین به کیتوزان تبدیل شود. با توجه به مصرف مقدار زیادی از اسید و قلیا و ایجاد حجم بالایی از پساب در فرآیند شیمیایی استخراج کیتین از پوست و تولید کیتوزان از کیتین، استفاده از آنزیم ها [۲۲]، ریزاندامگان ها [۱۰]، کاتالیست ها [۲۳]، مایعات یونی [۲۴]، حلال های یوتکتیک عمیق [۲۵]، امواج مایکروویو [۲۶]، فراصوت [۲۷] و دیگر پرتوها [۱] برای کمک به پیشبرد هر یک از این فرآیندها پیشنهاد شده اند. همچنین از حلال های فوق بحرانی برای استخراج رنگدانه ها و چربی ها از پوست میگو و ضایعات دریایی در کنار استخراج کیتین کمک گرفته شده است [۲۸]. در روش آنزیمی، فرآیندهای استخراج و یا استیل زدایی با استفاده از آنزیم ها انجام شده و در روش تخمیر، با استفاده از ریزاندامگان ها، اسید و آنزیم های مورد نیاز فرآیند تولید می گردد. یک مشکل روش آنزیمی، قیمت بالای آنزیم های مورد نیاز است [۲۹، ۳۰]. در دهه اخیر، پژوهش هایی با موضوع بررسی اثر پرتودهی با اشعه گاما بر شرایط استخراج کیتین یا تولید کیتوزان به روش شیمیایی و یا بررسی کاربرد محصولات تولید شده با این روش منتشر شده است [۱، ۱۴]. استفاده از پرتو گاما عموماً منجر به کاهش مدت زمان فرآیند استخراج، افزایش درجه استیل زدایی و کاهش وزن مولکولی پلیمر استخراج شده است [۱، ۱۴، ۳۱]. پرتو الکترونی مانند پرتو گاما در دسته پرتوهای یونیزه کننده قرار می گیرد. اختلاف عمده پرتو گاما و الکترون در قدرت نفوذ آنها در ماده و سرعت پرتودهی می باشد. پرتو گاما دارای قدرت نفوذ بیشتری است ولی پرتودهی مواد با شتاب دهنده های الکترون، سریع تر از اشعه گاما انجام می شود [۳۲، ۳۳].

معین (۰/۲۵، ۰/۵۰، ۱ و ۲ مولار) قرار گرفت و محیط واکنش در مدت زمان معین (۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت) در دمای اتاق هم زده شد. سپس، نمونه املاح زدایی شده با توری ریز فیلتر و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شستشو شد. سپس، نمونه در دمای ۶۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت خشک و ماده باقیمانده وزن شد (w_2). برای تعیین میزان املاح معدنی زوده شده، وزن محصول خشک شده بر وزن اولیه پوست میگو تقسیم شد (رابطه ۱). همچنین برای ارزیابی میزان کلسیم باقیمانده در نمونه از آنالیز جذب اتمی استفاده شد [۱].

$$(1) \quad \text{درصد کاهش وزن (املاح زدایی)} = \frac{w_1 - w_2}{w_2} \times 100$$

برای استخراج اجزای پروتئینی، شستشوی پوسته‌های خشک با هیدروکسید سدیم انجام شد. در این فرایند، ۳۰ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم با غلظت معین (۰/۵۰، ۱ و ۲ مولار) به ۱ گرم (w_2) پودر خشک باقیمانده از مرحله املاح زدایی اضافه و محیط تحت رفلکس به مدت معین (۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) در دمای ۶۵ °C هم زده شد. سپس ماده باقی مانده بر روی توری ریز جمع‌آوری و تا رسیدن به pH خنثی با آب مقطر شستشو داده شد. در نهایت، محصول در دمای ۶۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت خشک و وزن شد (w_3). برای تعیین میزان پروتئین حذف شده، وزن محصول بدست آمده بر وزن اولیه پودر تقسیم شد (رابطه ۲) [۱، ۳۱].

$$(2) \quad \text{درصد کاهش وزن (پروتئین زدایی)} = \frac{w_2 - w_3}{w_2} \times 100$$

هچنین، بازدهی استخراج کیتین از رابطه ۳ محاسبه شد.

$$(3) \quad \text{بازدهی استخراج کیتین} = \frac{w_3}{w_2} \times 100$$

برای بررسی اثر پرتو بر فرآیند استخراج کیتین، ابتدا پودر پوست میگو توسط دستگاه شتابدهنده الکترون با دزهای معین (۱۰-۱۰۰ کیلوگری) پرتو دهی شد. سپس، فرآیند املاح زدایی و پروتئین زدایی مطابق مراحل توضیح داده شده بالا انجام شد. برای پرتو دهی، نمونه‌های پوست میگوی خشک با وزن ثابت در کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفته و پس از خارج کردن هوای موجود، کیسه‌ها دوخت شدند. در ادامه نمونه‌ها در دمای محیط تحت پرتو دهی الکترونی با استفاده از دستگاه شتاب دهنده الکترون رودوترون TT200 با انرژی ثابت ۱۰ مگا الکترون‌ولت ساخت شرکت IBA بلژیک قرار گرفتند.

تولید کیتوزان از کیتین

برای تولید کیتوزان از کیتین، فرآیند استیل زدایی کیتین با سود غلیظ مطابق روش پیشنهادی در مراجع [۱۴، ۲۹] انجام شد. مقدار ۰/۳ گرم از کیتین به ۲۵ میلی‌لیتر سود ۵۰ درصد وزنی-حجمی

بنابراین برخی پژوهشگران گزارش داده‌اند که عملکرد این دو پرتو در اصلاح پلیمرها مانند تخریب و شبکه‌ای کردن آن‌ها، ساخت نانوذرات و ... می‌تواند تا حدودی متفاوت باشد [۳۳-۳۵].

هر چند تاکنون مطالعاتی در زمینه استفاده از پرتو گاما در فرآیند استخراج کیتین و تولید کیتوزان انجام شده ولی به نظر می‌رسد نیاز به مطالعات تکمیلی وجود دارد. برای مثال در این پژوهش‌ها گزارش کاملی در مورد تأثیر پرتو بر هر یک از فرآیندهای املاح زدایی و پروتئین زدایی وجود ندارد و علاوه بر این در حد جستجوهای انجام شده گزارشی در مورد تأثیر پرتو الکترونی بر فرآیند استخراج کیتین و تولید کیتوزان مشاهده نشد. در پژوهش حاضر، ابتدا اثر غلظت اسید کلریدریک و سود و زمان تماس بر فرآیند استخراج کیتین از پوست میگو بررسی شده است. سپس، برای اولین بار، اثر استفاده از پرتو الکترونی در فرآیند استخراج کیتین و تولید کیتوزان از پوست میگو مورد بررسی قرار گرفته است. در نهایت ویژگی‌های کیتوزان تولیدی مانند ساختار شیمیایی، خواص حرارتی، بلورینگی، گرانشی، وزن مولکولی، قدرت جذب آب و خواص ضد میکروبی ارزیابی شده است.

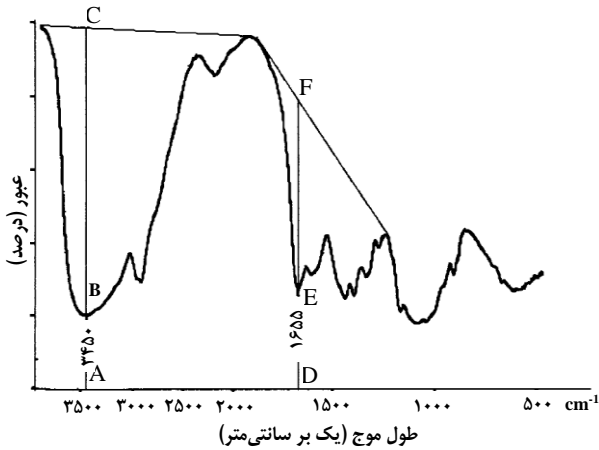
بخش تجربی

مواد

صایعات و پوست میگو از مغازه‌های فروش محصولات دریایی سطح شهر یزد در ابتدای فصل پاییز جمع‌آوری شد. پس از حذف فیزیکی پروتئین و چربی باقیمانده، پوست‌ها با آب داغ و مواد شوینده شسته شد تا باقیمانده چربی و پروتئین حذف شود و سپس تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد. اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم و سدیم استات از شرکت مرک و اسید استیک، اتانول و استون از شرکت دکتر مجللی خریدار شد. باقی مواد و حلال‌های مورد استفاده همگی از درجه آزمایشگاهی خریداری و بدون خالص‌سازی استفاده شدند. باکتری‌های *اشرشیا کولای* (ATCC: 25922) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC: 25923) از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه شدند.

استخراج کیتین از پوست میگو

فرآیند استخراج استفاده شده شامل دو مرحله اسیدشویی برای حذف املاح معدنی و بازشویی برای حذف ترکیبات پروتئینی بود. برای استخراج املاح معدنی و حذف آن‌ها از پوست میگو، ابتدا پوست میگو به مدت ۲۴ ساعت در دمای آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. سپس مقدار ۱ گرم (w_1) از پوست میگوی آماده شده، در ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک با غلظت‌های



شکل ۱- مثال نوعی از طیف کیتوزان برای تعیین درصد استیل‌زدایی با روش طیف سنجی فروسرخ (برگرفته از مرجع [۳۶]).

تنظیم شد. سپس محلول با سود ۰/۰۵ مولار تیترو میزبان سود مصرفی برای رسیدن به pHهای مختلف یادداشت شد. با رسم منحنی تغییر pH محلول تیترو شونده، نمودار تیتراسیون با دو نقطه خمش بدست آمد. نقطه خمش اول و دوم به ترتیب مربوط به نقطه هم ارزی اسید استیک اضافی و تیتراسیون کیتوزان پروتونه شده است. تفاوت این دو نقطه، اسید مورد نیاز برای پروتون‌دار شدن گروه‌های آمینی کیتوزان را مشخص می‌کند. بنابراین درجه استیل‌زدایی کیتوزان با استفاده از رابطه ۵ محاسبه شد [۴۰].

$$\text{درجه استیل‌زدایی (درصد)} = \frac{2.3nV}{m+4.2nV} \quad (5)$$

در رابطه بالا، v اختلاف حجم سود مصرفی بین دو نقطه خمش به لیتر، n غلظت محلول سود، m وزن کیتوزان خشک به گرم و ۲۰۳ و ۴۲ به ترتیب وزن مولکولی واحدهای ساختمانی استیل‌گلوکز آمین تکرار شونده کیتین و وزن مولکولی گروه استیل است.

ریخت‌شناسی

سطح پوست میگوی پرتو ندیده و پوست میگوی پرتو خورده، در خلأ توسط طلا پوشش داده شد و ریخت‌شناسی آن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد.

آزمون پراش پرتو ایکس

شناسایی ساختار و فازهای موجود در نمونه‌های مواد اولیه و محصولات تولیدی، توسط طیف نگاری پرتو ایکس انجام شد. این آزمایش توسط پراش پرتو با طول موج ۱/۷۹۱ نانومتر با ولتاژ ۳۰ کیلو ولت و شدت جریان ۲۰ میلی آمپر و در بازه زاویه‌ای 2θ (۵ تا ۷۰ درجه) انجام شد. گام پراش سنج ۰/۰۲ درجه و زمان هر گام ۰/۴ ثانیه انتخاب شد.

اضافه شد و مخلوط درون بالن مجهز به مبرد به مدت معین (۳-۶ ساعت) در حالت جوش به هم زده شد. در نهایت محصول واکنش با توری ریز فیلتر شده و با آب مقطر تا رسیدن به حالت خنثی شستشو داده شد. محصول واکنش به مدت ۲۴ ساعت در آون خلاء در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد. برای دستیابی به درجه استیل‌زدایی بالاتر، این فرآیند تکرار شد. در برخی موارد برای بررسی اثر پیش تیمار سرد بر استیل‌زدایی، ابتدا مقدار ۰/۳ گرم از کیتین به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در مجاورت ۱۵ میلی لیتر سود ۵۰ درصد وزنی-حجمی قرار گرفت، سپس، ۱۰ میلی لیتر از محلول سود اضافه شد و واکنش استیل‌زدایی مطابق قبل انجام شد. برای حذف رنگدانه‌ها، در مرحله انتهایی، محصول یک مرتبه با استون شستشو داده شد.

بررسی خصوصیات

بررسی ساختار شیمیایی

برای بررسی ساختار شیمیایی کیتین و کیتوزان استخراج شده و همچنین تعیین درصد استیل‌زدایی از روش طیف سنجی فروسرخ^۱ استفاده شد. ابتدا مقدار معین ماده خشک به صورت پودری با نمک برماید پتاسیم مخلوط و از نمونه‌ها قرص تهیه شد و نمونه‌ها با دستگاه طیف سنجی فروسرخ در محدوده بسامد $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ارزیابی شدند.

تعیین درجه استیل‌زدایی

درجه استیل‌زدایی نمونه‌ها با استفاده از آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه و همچنین تیتراسیون پتانسیل‌سنجی انجام شد. محاسبه درجه استیل‌زدایی با کمک طیف تبدیل فوریه با استفاده از رابطه ۴ مطابق روش شرح داده شده در مراجع [۳۶، ۳۷] انجام شد. فاکتور ۱/۳۳ نسبت A_{1655}/A_{3450} برای کیتین استیل‌زدایی نشده در نظر گرفته شده است. مقدار این نسبت برای کیتوزان کاملاً استیل‌زدایی شده صفر است.

$$\text{Deacetylation Degree (DD)} = 100 - [(A_{1655} \times 100 / A_{3450}) / 1.33] \quad (4)$$

در رابطه بالا، A_{1655} شاخص پیک جذبی آمید نوع اول در 1655 cm^{-1} به عنوان گروه‌های استیل با رابطه $\text{Log}_{10}(DF/DE) = A_{1655}$ و A_{3450} شاخص پیک جذبی گروه هیدروکسیل در 3450 cm^{-1} به عنوان استاندارد داخلی برای تصحیح اختلاف در میزان پودر کیتوزان در نمونه‌های مختلف با رابطه $\text{Log}_{10}(AC/AB) = A_{3450}$ محاسبه شده است. مقادیر DE، DF، AC و AB در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

تعیین درجه استیل‌زدایی با روش تیتراسیون پتانسیل‌سنجی مطابق روش پیشنهادی در مراجع [۳۸، ۳۹] انجام شد. ابتدا، کیتوزان در مقدار مشخصی از استیک اسید حل و pH محلول روی عدد ۱/۵

(۱) Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

آزمون رفتار حرارتی

ارزیابی خواص حرارتی با آنالیز حرارتی همزمان^۱ (وزن سنجی گرمایی و گرماسنجی روبشی تفاضلی) مطابق روش پیشنهادی در مراجع [۴۱] انجام شد. آزمون بر مبنای حرارت دادن نمونه و مقایسه آن با نمونه مرجع (پودر آلومینا) تحت اتمسفر آرگون انجام گرفت. نمونه‌ها به صورت پودر خشک با وزن ۵ میلی‌گرم، با سرعت گرم شدن ۵ درجه سلسیوس بر دقیقه در گستره دمایی ۲۵ تا ۶۰۰ درجه سلسیوس بررسی شدند.

برای بررسی قدرت جذب چربی، آزمون مشابه قدرت جذب آب انجام شد با این تفاوت که به جای آب از روغن سویا استفاده شد. به این ترتیب، قدرت جذب چربی توسط رابطه ۸ محاسبه شد [۴۳].

$$FBS(\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (۸)$$

در رابطه بالا W_2 وزن کیتوزان پس از قرار گرفتن یک ساعت قرار گرفتن در تماس با روغن و W_1 وزن خشک اولیه کیتوزان است.

خواص ضد میکروبی

برای بررسی اثر ضد میکروبی کیتوزان از آزمون کدورت سنجی و همچنین آزمون نفوذ در چاهک آگار^۳ استفاده شد. در روش کدورت سنجی در کشت معلق، پس از کشت باکتری *اشرشیا کولای* بر روی آگار به مدت ۲۴ ساعت، محیط کشت حاوی نیم مک فارلند باکتری ساخته شد و مقدار معین از آن به محیط کشت حاوی ۲/۱ گرم بر لیتر از کیتوزان‌های مختلف تولیدی اضافه شد. سپس در زمان‌های معین از محیط گرماگذاری شده نمونه برداری و میزان جذب در طول موج ۶۵۰ نانومتر به عنوان معیاری از رشد و تکثیر باکتری اندازه‌گیری شد [۴۴]. در آزمون نفوذ در چاهک، پس از کشت باکتری‌های گرم مثبت *استرپتوکوکوس اورئوس* و یا باکتری گرم منفی *اشرشیا کولای* بر روی محیط کشت آگار، چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر بر روی آگار ایجاد و نمونه محلول کیتوزان با غلظت ۱ درصد وزنی-حجمی و pH تنظیم شده بر روی عد ۵، به چاهک‌ها منتقل و گرمخانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد. سپس محیط‌ها از نظر وجود یا عدم وجود منطقه بازدارنده رشد (هاله) و قطر هاله بررسی شدند [۴۵، ۴۶].

آمار و طراحی آزمایش

در این پژوهش، آزمایش‌ها با حداقل ۲ تکرار انجام و میانگین داده‌های بدست آمده گزارش شدند. بررسی اثر غلظت اسید و یا باز و زمان تماس و در ادامه اثر دز پرتودهی و غلظت اسید و یا باز در فرآیندهای معدنی‌زدایی و یا پروتئین‌زدایی با روش طراحی آزمایش عاملی کامل انجام شد. همچنین برای بررسی عوامل مؤثر بر درجه استیل‌زدایی کیتوزان شامل زمان و تعداد مراحل واکنش استیل‌زدایی، پیش تیمار قلیایی و دز پرتودهی از طراحی آزمایش یک عامل در زمان و در ادامه طرح آزمایش عاملی کامل استفاده شد. برای مقایسه داده‌ها، از آنالیز واریانس استفاده شد و حد معنی‌داری $p\text{-value} < 0.05$ مد نظر قرار گرفت. تحلیل آماری نتایج آزمایش‌ها با نرم‌افزار مینی‌تب ۲۱ انجام شد.

بررسی گرانروی محلول و تعیین وزن مولکولی

برای تعیین گرانروی محلول کیتوزان و در ادامه محاسبه وزن مولکولی کیتوزان از روش محاسبه گرانروی با استفاده از ویسکومتر آبلهود استفاده شد. برای این کار ابتدا کیتوزان با غلظت‌های (۰/۴، ۰/۸ و ۱/۴) گرم بر لیتر در محلول سدیم استات ۰/۲ مولار و استیک اسید ۰/۱ مولار حل شد. آزمون با مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول انجام و دمای آزمون روی ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. پس از اندازه‌گیری زمان رسیدن سطح حلال به علامت پایینی لوله موئین، تعیین گرانروی ذاتی پلیمر انجام و در ادامه برای محاسبه وزن مولکولی متوسط پلیمر کیتوزان با استفاده از داده‌های گرانروی، از معادله مارک-هاوینک^۲ (رابطه ۶) استفاده شد [۳۷، ۴۲].

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (۶)$$

در رابطه بالا، $[\eta]$ گرانروی ذاتی پلیمر و M متوسط حجمی وزن مولکولی پلیمر هستند. همچنین، α و K ثوابت مربوط به حلال استفاده شده در این پژوهش (۰/۱ مولار و سدیم استات ۰/۲ مولار) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ترتیب برابر ۰/۷۶ و 0.078 g/cm^3 در نظر گرفته شد [۳۷].

قدرت جذب آب و قدرت جذب چربی

برای ارزیابی قدرت جذب آب کیتوزان تولیدی، مقدار معین کیتوزان وزن و در فالدکون ریخته شد (W_1). سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و نمونه به مدت یک ساعت توسط شیکر با شدت ۱۵۰ دور بر دقیقه به هم خورد. در انتها نمونه به مدت ۲۵ دقیقه با شدت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از خارج کردن محیط رویی و آب سطحی وزن شد (W_2). قدرت جذب آب در پلیمر توسط رابطه ۷ محاسبه شد [۳۱].

$$WBS(\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (۷)$$

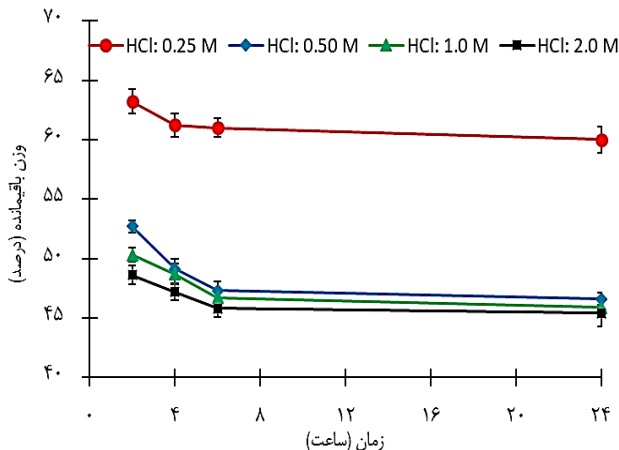
(۱) Simultaneous thermal analysis (STA)

(۳) Agar well diffusion method

(۲) Mark-Houwink equation

نتایج و بحث

حذف املاح معدنی



شکل ۲- اثر غلظت و زمان فرآیند اسیدشویی بر کاهش وزن پوست میگو به دلیل حذف مواد معدنی

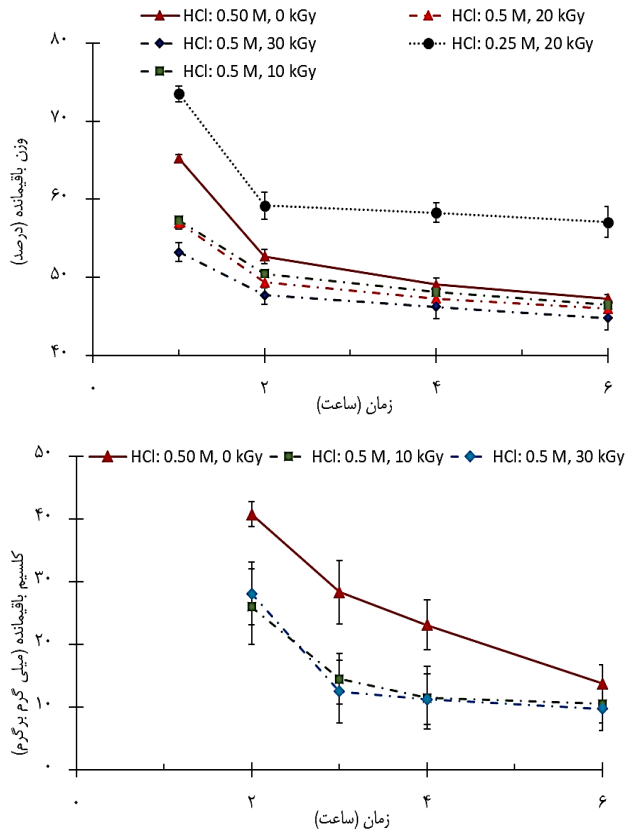
به این معنی که احتمالاً حداکثر میزان معدنی‌زدایی ممکن انجام شده است. از طرف دیگر در زمان ۶ ساعت، افزایش غلظت اسید از ۰/۵ مولار به بالا تأثیر معنی‌داری بر میزان املاح حذف شده (کاهش وزن) نداشت. با توجه به نتایج بدست آمده میزان املاح معدنی قابل شستشو با اسید از پوست میگو جمع‌آوری شده در این پژوهش در محدوده ۵۱-۵۴ درصد وزن خشک پوسته میگو بود.

با توجه به اینکه با داده‌های کاهش وزن نمی‌توان در مورد میزان باقی ماندن املاح معدنی در پوسته اظهار نظر کرد، از آنالیز جذب اتمی برای برآورد میزان باقی ماندن املاح در پوسته استفاده شد. نتایج آنالیز جذب اتمی نشان داد که میزان کلسیم باقی مانده در پوست میگو شستشو داده شده با اسیدکلریدریک با غلظت بزرگ‌تر یا مساوی ۰/۵ مولار و زمان ۶ ساعت، در حدود ۱۳ میلی‌گرم بر گرم پوسته معدنی‌زدایی شده بود. این مقدار معادل حضور حدود ۰/۰۴ میلی‌گرم فسفات کلسیم یا کربنات کلسیم در یک گرم پوسته میگوی معدنی‌زدایی شده است (۰/۰۴ درصد وزنی) که نشان دهنده انجام مناسب فرآیند حذف املاح معدنی است. حداقل میزان کلسیم باقی مانده در پوست میگو طی فرآیند املاح‌زدایی با اسیدکلریدریک، در کار پژوهشی انجام شده توسط مهلوس^۱ و همکاران [۱]، حدود ۲۰ میلی‌گرم بر گرم گزارش شده است. با توجه به نتایج بدست آمده، به نظر می‌رسد، انتخاب غلظت اسید ۰/۵ مولار و زمان ۶ ساعت به عنوان شرایط مناسب برای مرحله املاح‌زدایی منطقی باشد. در کار پژوهشی انجام شده توسط غیاث‌الدین و همکاران [۴۹]، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک با غلظت ۲ مولار و زمان ۸ ساعت به عنوان شرایط بهینه املاح‌زدایی گزارش شده است. مهلوس و همکاران [۱]،

در حدود ۳۰-۶۰ درصد از وزن خشک پوست میگو را ترکیبات معدنی شامل کربنات کلسیم، فسفات کلسیم و ... تشکیل می‌دهد که این مقدار می‌تواند بسته به گونه، شرایط آب و هوایی و ... تغییر کند [۴۷]. در این پژوهش برای حذف این ترکیبات، از محلول اسید کلریدریک با غلظت ۰/۵-۲/۰ مولار استفاده شد. در این فرآیند، واکنش اسید کلریدریک با نمک‌های نامحلول کربنات کلسیم و فسفات کلسیم موجود در پوست میگو، به ترتیب منجر به تولید کلرید کلسیم به همراه دی‌اکسید کربن و فسفریک اسید به همراه آب می‌شود. مطابق استوکیومتری به ازای هر مول کربنات کلسیم و فسفات کلسیم به ترتیب ۲ مول و ۶ مول اسید کلریدریک برای انجام واکنش‌های بالا نیاز است [۴۸]. اما به صورت معمول، میزان اسید استفاده شده در پژوهش‌ها بیشتر از مقدار استوکیومتری است. کنترل شرایط مناسب برای استخراج حداکثر ماده معدنی ممکن با کمترین میزان اسید مصرفی، از لحاظ اقتصادی و محیط زیستی و همچنین از منظر میزان مصرف آب برای خارج کردن اسید باقیمانده و خنثی‌سازی پوست بسیار اهمیت دارد. تاکنون مطالعات زیادی در زمینه استخراج کیتین از پوست میگو انجام شده و با توجه به تفاوت‌های ساختاری پوست بدست آمده از گونه‌های مختلف در زمان و جغرافیای مختلف، اعداد مختلفی برای زمان و میزان اسید مصرفی گزارش شده است. نتایج بررسی اثر غلظت اسید کلریدریک و زمان فرآیند املاح‌زدایی، بر وزن املاح معدنی خارج شده از پوست میگو در شکل ۲ نشان داده شده است.

همانطور که ملاحظه می‌شود، زمان مورد نیاز برای فرآیند با افزایش غلظت اسید کاهش یافت. میزان کاهش وزن در نمونه تیمار شده با اسید کلریدریک ۰/۲۵ مولار به طور قابل توجهی نسبت به غلظت‌های دیگر کمتر است. مشخص است که میزان اسید استفاده شده در این حالت از لحاظ استوکیومتری کمتر از میزان اسید مورد نیاز برای تبدیل تمام نمک‌های کلسیم نامحلول موجود به حالت محلول است. شایان ذکر است که عدد محاسبه شده با در نظر گرفتن محاسبات استوکیومتری و با فرض اینکه ۵۵ درصد وزن پوسته شامل املاح معدنی کربنات کلسیم یا فسفات کلسیم باشد، ۰/۰۱۱ مول اسید کلریدریک به ازای یک گرم پوست خشک میگو است در حالی که در ۳۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲۵ مولار فقط ۰/۰۰۷۵ مول اسید کلریدریک وجود دارد. از طرف دیگر، در تمامی غلظت‌های بیش‌تر از ۰/۵ مولار پس از ۴ تا ۶ ساعت، شیب نمودار کاهش وزن به صفر نزدیک شد

(۱) Mahlous



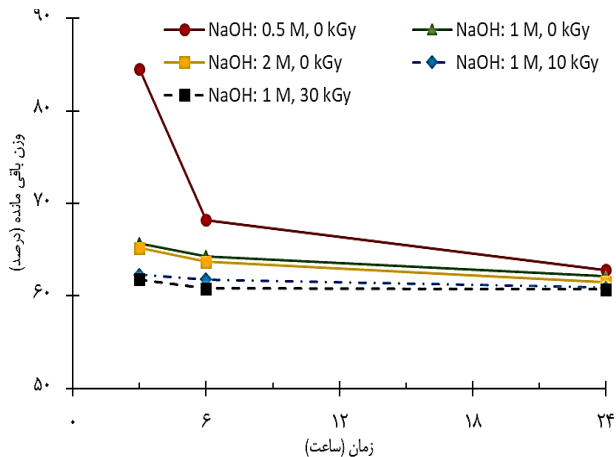
شکل ۳- اثر پرتو بر کاهش وزن و میزان کلسیم باقیمانده در فرآیند شستشوی اسیدی

استفاده از روش وزن سنجی برای ارزیابی میزان املاح زدایی در مورد نمونه‌های پرتو خورده همراه کننده خواهد بود. در ادامه اثر پرتو دهی بر میزان کاهش وزن و همچنین میزان کلسیم باقی مانده در پوست میگو پس از فرآیند املاح زدایی در شکل ۳ نشان شده است. با مقایسه داده‌های مربوط به نمونه‌های پرتو دهی شده و پرتو دهی نشده، مشخص است که پرتو دهی موجب کاهش زمان مورد نیاز برای حذف املاح معدنی شده است. برای مثال، در مورد نمونه‌های تماس داده شده با اسید کلریدریک ۰/۵ مولار، میانگین وزن باقی مانده برای نمونه‌های پرتو دهی نشده و نمونه‌های پرتو دهی شده با دز ۳۰ کیلوگری پس از ۲ ساعت حضور در محیط اسیدی به ترتیب ۵۳/۷ و ۴۷/۱ درصد بدست آمد. از طرف دیگر پرتو دهی موجب ایجاد تغییر در میزان کلسیم باقی مانده در نمونه‌ها پس از املاح زدایی شد به صورتی که برای نمونه‌های شرح داده شده بالا، میزان کلسیم باقی مانده با افزایش دز پرتو دهی از صفر به ۳۰ کیلوگری از متوسط ۴۰ میلی گرم بر گرم به متوسط ۲۸ میلی گرم بر گرم کاهش یافت. با در نظر گرفتن این که حدود ۴۰ درصد وزنی

با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار، پس از ۸ ساعت به نتایج معدنی زدایی مشابه کار پژوهشی حاضر دست یافتند.

در ادامه، اثر پرتو دهی بر فرآیند املاح زدایی بررسی شد. پرتوهای یونیزه کننده با تولید یون و رادیکال‌های آزاد در محل پرتو دیده، می‌توانند باعث ایجاد تغییرات شیمیایی و فیزیکی در مواد شوند. مهم‌ترین تغییرات ایجاد شده شامل واکنش شکست (تخریب) ساختار یا شبکه‌ای شدن است. در حقیقت با پرتو دهی مواد، هر دو واکنش اتفاق می‌افتد ولی بسته به شرایطی مانند نوع ماده، فاز پرتو دهی، شدت پرتو دهی و حضور مواد شیمیایی و آب، ممکن است یکی از واکنش‌ها بر دیگری غلبه کند. در مورد پرتو دهی پلیمرهای طبیعی مانند پلی ساکاریدها در حالت خشک، عموماً واکنش غالب، تخریب و شکست زنجیره پلیمری است [۵۰]. همه جایگاه‌های CH در حلقه پیرانوزی، همچنین گروه CH_2OH و همچنین گروه آمیدی، مستعد ایجاد رادیکال آزاد در مواجهه با پرتو الکترونی هستند. همچنین در صورت وجود رطوبت در نمونه، در اثر مواجهه مولکول‌های آب با پرتو الکترونی، رادیکال‌های هیدروکسیل تولید می‌شود که می‌تواند با حمله به زنجیره پلیمری، موجب تشکیل ماکرورادیکال‌ها شود. تفاوت معنی داری بین انتخاب پذیری گروه‌های کربنی در مقابل رادیکال‌های آزاد واکنش پذیر مانند رادیکال هیدروکسیل وجود ندارد ولی گروه آمیدی و آمینی پتانسیل کمتری برای یونیزه شدن دارند. در نهایت رادیکال‌های ایجاد شده موجب واکنش شکست بتا^۱ و تخریب زنجیره پلیمری می‌شود [۵۱]. تخریب زنجیره و پیوندهای شیمیایی و کاهش وزن مولکولی می‌تواند موجب تغییر گسترده در خواص فیزیکی و شیمیایی مواد پرتو دیده شود. با توجه به حضور پلیمرهای طبیعی کیتین و پروتئین‌ها در ساختار پوست میگو و همچنین وجود گزارش‌هایی در مورد وجود پیوندهای کووالانسی بین برخی پروتئین‌های موجود در ساختار با زنجیره کیتینی از جایگاه واحدهای هیستیدین و آسپارتین، پرتو دهی پوسته می‌تواند موجب شکست مولکول‌های پلیمری بزرگ و همچنین اتصالات کووالانسی بین پروتئین‌ها و کیتین شود [۱]. از طرف دیگر امکان تاثیر پرتو الکترونی بر املاح معدنی مانند کربنات کلسیم به دلیل خواص جاذب رادیکالی آن‌ها وجود دارد. کربنات‌های معدنی می‌توانند پس از پرتو دهی تا مدت زمان زیادی رادیکال آزاد را در ساختار خود نگهدارند. پرتو دهی کربنات کلسیم در دزهای بالاتر منجر به تولید یون‌های CO_2^- ، CO_3^- ، CO_3^{2-} و ... می‌شود [۵۲]. تولید یون‌های یاد شده ممکن است بر فرآیند املاح زدایی تاثیرگذار باشد. از آنجایی که پرتو دهی می‌تواند موجب تخریب زنجیره‌های پلیمری و در نتیجه تولید برخی پلیمرها و الیگومرهای قابل حل در آب/اسید شود،

(۱) β -scission reaction



شکل ۴- نمودار کاهش وزن ناشی از پروتئین زدایی بر حسب غلظت سدیم هیدروکسید و زمان پروتئین زدایی

برای همه نمونه‌های تیمار قلیایی شده با غلظت‌های ۰/۵ تا ۲/۰ میلی‌مولار، میانگین میزان وزن باقیمانده پس از ۲۴ ساعت تماس با محلول سود ۶۰-۶۲ درصد بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشت. این مسئله در حالی است که سرعت کاهش وزن با افزایش غلظت سود در بازه مطالعه شده افزایش یافت به صورتی که برای نمونه تیمار شده با غلظت ۱ و ۲ مولار، تغییر وزن بین ۶ ساعت و ۲۴ ساعت معنی‌دار نبود. همچنین اختلاف میزان کاهش وزن برای نمونه تیمار شده با سود ۰/۵ مولار به مدت ۲۴ ساعت و نمونه تیمار شده با سود ۱ مولار به مدت ۶ ساعت، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین با توجه ملاحظات اقتصادی و زیست‌محیطی می‌تواند یکی از گزینه‌های فرآوری با سود ۰/۵ مولار به مدت ۲۴ ساعت یا فرآوری با سود ۱ مولار به مدت ۶ ساعت برای مرحله پروتئین زدایی انتخاب گردد. در این پژوهش، استفاده از سود ۱ مولار در دمای ۶۵ درجه سلسیوس و زمان ۶ ساعت برای تولید کیتین مورد استفاده در مراحل بعدی مد نظر قرار گرفت. پیشتر دهمانه^۱ و همکاران، فرآوری با هیدروکسید سدیم ۱ مولار در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت را برای مرحله پروتئین زدایی پیشنهاد داده‌اند [۵۴]. مقایسه نتایج فرآیند پروتئین زدایی نمونه‌های پرتوده‌ای نشده و پرتوده‌ای شده، نشان داد در شرایط تیمار قلیایی یکسان، افزایش دز پرتوده‌ای منجر به کاهش زمان فرآیند و همچنین کاهش اندکی در وزن باقی مانده در فرآیند پروتئین زدایی شده است. این مسئله می‌تواند به تخریب پیوندهای بین زنجیرهای پلیمری و همچنین تخریب ساختار پلیمری و ایجاد الیگومرها یا پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پایین به واسطه پرتوده‌ای نسبت داده شود. پیشتر مهلوس و همکاران گزارش دادند که پرتوده‌ای پودر موجب کاهش معنادار زمان فرآیند

املاح معدنی کلسیم کربنات (۴۰ گرم در ۱۰۱ گرم) و همچنین کلسیم فسفات (۱۲۰ گرم در ۳۰۸ گرم) را کلسیم تشکیل می‌دهد، برای نمونه پرتوده‌ای نشده و پرتوده‌ای شده با دز ۳۰ کیلوگری، میزان مواد معدنی باقیمانده در نمونه شستشوی اسیدی شده به مدت ۲ ساعت به ترتیب ۱۰ و ۷ درصد بدست آمد. این مسئله نشان می‌دهد که پس از پرتوده‌ای، مقداری مواد غیر معدنی که احتمالاً کیتین یا پروتئین هستند به دلیل کاهش وزن مولکولی یا شکسته شدن پیوندهای شیمیایی، توسط محلول اسیدی یا آب شستشو می‌شوند. با افزایش زمان تماس ۳ تا ۶ ساعت، میزان کلسیم باقی مانده در نمونه پرتوده‌ای شده با دز ۳۰ کیلوگری به میانگین ۱۱ میلی‌گرم بر گرم کاهش یافت، در حالی که در نمونه پرتوده‌ای نشده، پس از ۶ ساعت شستشوی اسیدی میزان کلسیم به میانگین ۱۴ میلی‌گرم بر گرم رسید. این مسئله نشان دهنده نقش پرتو الکترونی در افزایش سرعت فرآیند معدنی زدایی است. پرتو الکترونی موجب تخریب و کاهش وزن مولکولی پلیمرها یا شکسته شدن پیوندهای شیمیایی بین آن‌ها می‌شود که در نهایت موجب حذف قسمت اندکی از پلی‌ساکارید یا پروتئین موجود در ساختار در مرحله اسیدشویی یا شستشوی با آب می‌شود. همچنین، با مقایسه تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح نمونه پوست میگوی پرتوده‌ای نشده و پرتوده‌ای شده به وضوح ایجاد آسیب، ترک و شکاف در سطح پوست میگو در نتیجه پرتوده‌ای قابل تشخیص است. بنابراین، پرتوده‌ای موجب تغییر در ریخت‌شناسی و توپولوژی سطح پوست میگو نیز می‌شود. این تغییرات می‌تواند موجب افزایش سرعت انتقال جرم و رهایش نمک‌های کلسیم شود.

پروتئین زدایی

اجزاء پروتئینی در ساختار پوست میگو به صورت جداگانه یا در ترکیب شیمیایی با پلی‌ساکارید یا چربی وجود دارد و در حدود ۳۰-۴۰٪ وزن خشک پوست میگو را تشکیل می‌دهد. مهم‌ترین آمینواسیدهای موجود در پروتئین‌های یاد شده هیستیدین، آسپارتیک اسید، سرین و سیستئین هستند. در اکثر کارهای پژوهشی مبتنی بر روش‌های شیمیایی از شستشو با محلول هیدروکسید سدیم برای حذف ترکیبات پروتئینی از پوست میگو استفاده شده است. عیب عمده این روش، دشواری یا عدم امکان بازیافت پروتئین استخراجی است [۳۰، ۵۳]. در این پژوهش، با توجه به نتایج مطالعات پیشین، اثر غلظت و زمان واکنش بر میزان کاهش وزن پوسته به عنوان معیاری از حذف پروتئین مد نظر قرار گرفت. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است.

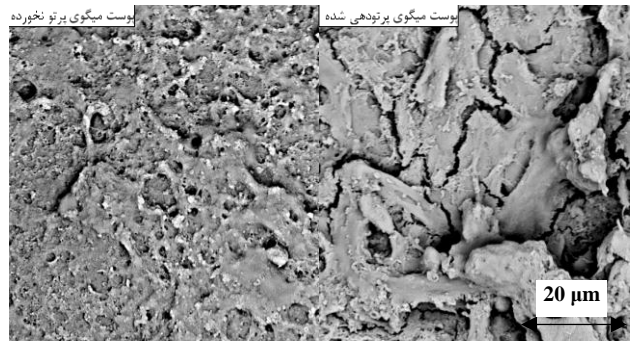
(۱) Dehmane

پیوندهای کربن-اکسیژن ($C=O$) امید نوع اول، قله موجود در 1560 cm^{-1} مربوط به امید نوع دو و قله موجود در منطقه 1420 cm^{-1} به پیوندهای CH_3 و CH نسبت داده شده است [۵۷].

شایان ذکر است که طیف‌های زیر قرمز نمونه‌های کیتین تولید شده از منابع مختلف نسبت به هم تفاوت‌های اندکی دارند که به تفاوت ساختارهای پلیمر طبیعی بدست آمده از منابع مختلف و برهمکنش‌های فیزیکی درون مولکول و بین زنجیرهای کیتین بر می‌گردد [۵۸]. برای مثال حضور هم‌زمان قله در 1620 cm^{-1} و 1650 cm^{-1} به عنوان نشانه‌ای از حضور کیتین نوع آلفا قلمداد شده است [۵۹]. کاهش ارتفاع یا ناپدید شدن قله موجود در ناحیه 1560 cm^{-1} و یا به عبارتی افزایش نسبت ارتفاع قله شاخص در ناحیه 1650 cm^{-1} به قله موجود در ناحیه 1560 cm^{-1} به عنوان نشانه‌ای از انجام واکنش استیل‌زدایی در نظر گرفته شده است [۵۹]. این مسئله به دلیل افزایش درجه استیل‌زدایی در نمونه‌های پرتو دیده به خوبی قابل مشاهده است.

درجه استیل‌زدایی

استیل‌زدایی می‌تواند با تماس کیتین با محلول قلیایی قوی مانند محلول غلیظ سدیم هیدروکساید در دمای بالا انجام شود. عواملی مانند غلظت محلول سود، پیش تیمار قلیایی، دمای واکنش، زمان واکنش و حضور اکسیژن می‌تواند بر ویژگی‌های کیتوزان تولیدی مانند درجه استیل‌زدایی و وزن مولکولی تأثیرگذار باشد [۳۰، ۴۱]. هر چند طراحی آزمایش یک فاکتور در زمان برای شناخت و خصوصیت‌سنجی یک فرآیند جدید مفید است اما قادر به بررسی هم‌زمان تأثیرگذاری عوامل مؤثر بر فرآیند و همچنین بررسی اثرهای تداخلی بین عوامل مؤثر بر فرآیند نیست. برای بررسی هم زمان اثر عوامل مؤثر بر فرآیند و اثر تداخلی بین آن‌ها و ارائه مدل ریاضی مناسب، لازم است از روش‌های طراحی آزمایشی مانند طرح آزمایش عاملی کامل و طرح آزمایش سطح پاسخ با شیوه طرح مرکب مرکزی^۱ و یا باکس-بنکن^۲ استفاده کرد. این روش‌های طراحی آزمایش در مطالعات متعددی مرتبط با استخراج ترکیبات مؤثره با هدف بررسی عوامل مؤثر بر فرآیند، ارائه مدل ریاضی بین عوامل مؤثر و پاسخ و بهینه‌سازی استفاده شده‌اند [۶۰-۶۲]. در این مطالعه، برای بررسی هم زمان اثر عامل‌های تیمار قلیایی، تعداد مراحل استیل‌زدایی و دز پرتو دهی بر درجه استیل‌زدایی کیتوزان تولیدی، طرح آزمایش عاملی کامل با ۲ سطح تیمار قلیایی (انجام ندادن یا انجام تیمار قلیایی)، ۲ سطح تعداد مراحل استیل‌زدایی (۱ مرتبه و ۲ مرتبه) و ۴ سطح دز پرتو دهی (صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۹ کیلوگری) با ۲ تکرار برای هر آزمایش استفاده شد. نتایج آزمون‌ها در جدول ۱ آورده شده است.



شکل ۵- تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی از پوست میگوی پرتو ندیده و پرتو دهی شده با دز ۳۰ کیلوگری

پروتئین زدایی می‌شود ولی بر میزان سود مورد نیاز اثری ندارد [۱]. در شکل ۵ تصویر گرفته شده از پوست میگوی پرتو دهی نشده و پرتو دهی شده با دز ۳۰ کیلوگری نشان داده شده است. با مقایسه سطح پوست میگوی پرتو دهی شده (سمت راست) و پرتو دهی نشده (سمت چپ) به وضوح ایجاد آسیب و ترک و شکاف در سطح در نتیجه پرتو دهی مشخص است. بنابراین افزایش سرعت فرآیندهای معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی می‌تواند علاوه بر تأثیر شیمیایی و کاهش وزن مولکولی، به تغییرات ریخت‌شناسی و توپولوژی سطح در نتیجه پرتو دهی نسبت داده شود.

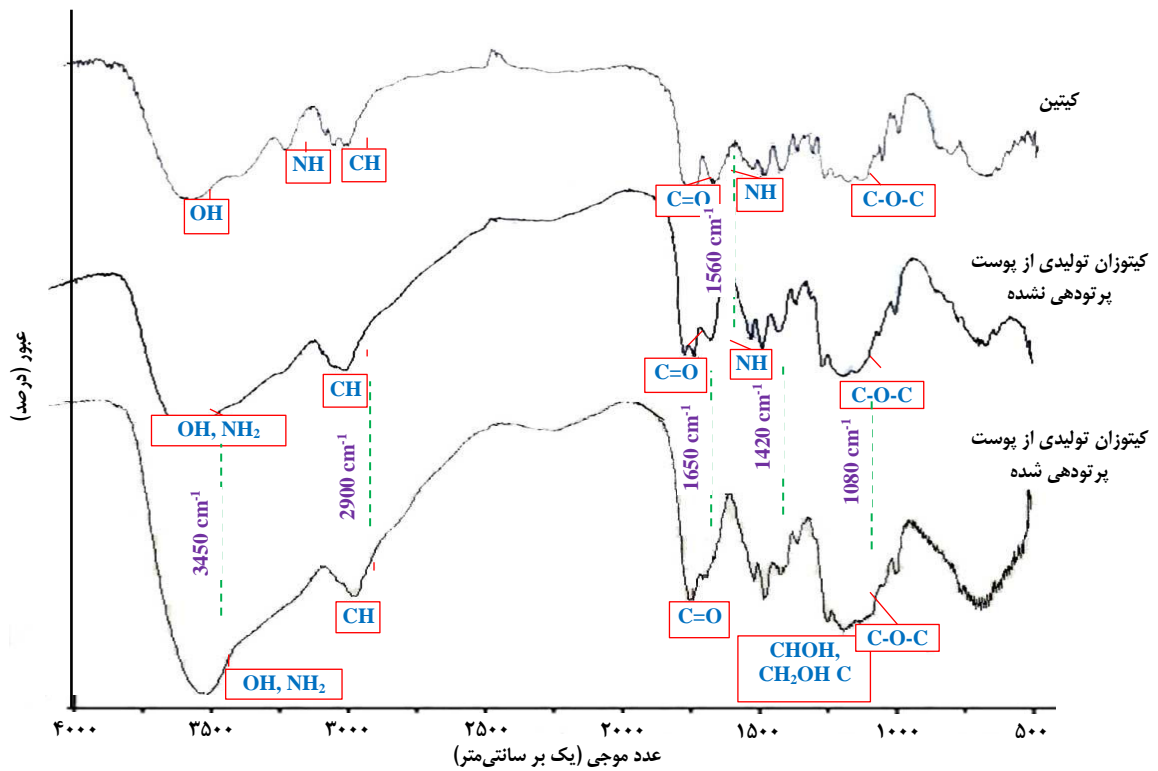
تولید کیتوزان و بررسی ساختار شیمیایی

واحدهای تکرار شونده مونوساکاریدی موجود در ساختار کیتین دارای گروه استامید هستند که موجب عدم حلالیت کیتین در محیط آبی می‌شوند. یک راه حل برای افزایش حلالیت، تبدیل شیمیایی گروه‌های استامید روی زنجیره به گروه آمینی است که موجب تولید پلیمری با خصوصیات جدید به نام کیتوزان می‌شود. به طور معمول به مولکول کیتینی که در بیش از ۵۰ درصد واحدهای تکرار شونده مونوساکاریدی آن، گروه آمین جایگزین گروه استامید شده باشد، کیتوزان می‌گویند [۵۵، ۵۶]. استیل‌زدایی می‌تواند طی تماس کیتین با محلول قلیایی قوی مانند محلول غلیظ سدیم هیدروکساید در دمای بالا انجام شود. در شکل ۶ تصاویر طیف‌سنجی فروسرخ نمونه‌های کیتین و کیتوزان حاصل از پوست‌های پرتو ندیده و کیتوزان حاصل از پوست‌های پرتو داده شده آورده شده است.

قله مشاهده شده در ناحیه 3450 cm^{-1} در طیف‌های مربوطه به کشش ارتعاشی پیوندهای اکسیژن-هیدروژن (O-H)، نیتروژن-هیدروژن (N-H) و پیوندهای هیدروژنی داخل مولکولی و قله موجود در ناحیه $2900-3000 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی کربن-هیدروژن (C-H) است [۳۱، ۳۷]. قله‌های شاخص موجود در منطقه 1650 cm^{-1} در ساختار کیتین به حضور

(۱) Central composite design (CCD)

(۲) Box-Behnken design (BBD)



شکل ۶- طیف تبدیل فوریه کیتین، کیتوزان تولید شده از پوست پرتو ندیده و کیتوزان تولید شده از پوست پرتودهی شده با دز ۳۰ کیلوگری

جدول ۱- درجه استیل زدایی کیتوزان های تولید شده در شرایط مختلف

شماره	دز پرتودهی (کیلوگری)	غلظت سود (درصد)	تعداد مراحل پیش تیمار قلیایی	زمان واکنش (ساعت)	دمای واکنش (ساعت)	تعداد مراحل استیل زدایی	درجه استیل زدایی (درصد) محاسبه شده با روش:	
							تیتراسیون پتانسیل سنجی	طیف سنجی تبدیل فوریه
A ₁	صفر	۵۰	صفر	۳	۱۳۵	۱	۳۶	...
A ₂	صفر	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۱	۸۴	۹۲
A ₃	صفر	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۶۰	۷۱
A ₄	۱۰	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۶۹	۸۰
A ₅	۲۰	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۷۳	...
A ₆	۳۰	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۷۸	...
A ₇	۶۶	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۸۵	...
A ₈	۹۹	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۱	۹۰	...
A ₉	صفر	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۱	۸۴	...
A ₁₀	۳۰	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۱	۸۶	...
A ₁₁	۶۶	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۱	۸۹	...
A ₁₂	۹۹	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۱	۹۱	...
A ₁₃	صفر	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۲	۹۳	۹۵
A ₁₄	۳۰	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۲	۹۳	۹۴
A ₁₅	۶۶	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۲	۹۵	...
A ₁₆	۹۹	۵۰	۱	۵	۱۳۵	۲	۹۶	...
A ₁₇	صفر	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۲	۷۵	...
A ₁₈	۳۰	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۲	۸۰	...
A ₁₉	۶۶	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۲	۸۵	...
A ₂₀	۹۹	۵۰	صفر	۵	۱۳۵	۲	۸۸	...

جدول ۲- نتیجه آزمون تحلیل واریانس اثر پیش تیمار قلیایی، تعداد مراحل استیل زدایی و دز پرتو دهی بر درجه استیل زدایی کیتوزان

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات تعدیل شده	میانگین مجموع مربعات تعدیل شده	ارزش F (F-Value)	مقدار احتمال (P-Value)
مدل کلی	۱۵	۲۴۹۵/۸۸	۱۶۶/۳۹	۵۰/۲۳	۰/۰۰۰
مدل خطی	۵	۱۹۸۱/۶۳	۳۹۶/۳۳	۱۱۹/۶۵	۰/۰۰۰
دز پرتو دهی	۳	۸۰۴/۳۸	۲۶۸/۱۳	۸۰/۹۴	۰/۰۰۰
پیش تیمار قلیایی	۱	۹۴۶/۱۲	۹۴۶/۱۲	۲۸۵/۶۲	۰/۰۰۰
تعداد مراحل استیل زدایی	۱	۲۳۱/۱۲	۲۳۱/۱۲	۶۹/۷۷	۰/۰۰۰
برهمکنش های دوتایی	۷	۴۶۰/۸۷	۶۵/۸۴	۱۹/۸۸	۰/۰۰۰
دز پرتو دهی * پیش تیمار قلیایی	۳	۳۱۶/۳۸	۱۰۵/۴۶	۳۱/۸۴	۰/۰۰۰
دز پرتو دهی * تعداد مراحل استیل زدایی	۳	۱۲۹/۳۷	۴۳/۱۳	۱۳/۰۲	۰/۰۰۰
پیش تیمار قلیایی * تعداد مراحل استیل زدایی	۱	۱۵/۱۳	۱۴/۱۳	۴/۲۷	۰/۰۵۷
برهمکنش های سه تایی	۳	۵۳/۳۷	۱۷/۸۰	۵/۳۷	۰/۰۰۹
دز پرتو دهی * پیش تیمار قلیایی * تعداد مراحل استیل زدایی	۳	۵۳/۳۷	۱۷/۸۰	۵/۳۷	۰/۰۰۹
خطا	۱۶	۵۳/۰۰	۳/۳۱		
مجموع	۳۱	۲۴۵۸/۸۸			

بدست آمده (محاسبه شده با روش طیفسنجی) برای نمونه پرتو دهی شده با دز ۲۰ کیلوگری و استیل زدایی شده با سود ۴۰ درصد وزنی-حجمی، توسط النصر^۲ و همکاران [۵۷] ۸۸ درصد، برای نمونه پرتو دهی شده با دز ۲۰ کیلوگری و استیل زدایی شده با سود ۶۰ درصد وزنی-حجمی توسط تاهاآت^۳ و همکاران [۱۴] ۹۰ درصد و توسط مهلوس و همکاران [۱] ۹۳ درصد و برای نمونه پرتو دهی شده با دز ۲۰ کیلوگری و استیل زدایی شده با سود ۵۰ درصد وزنی-حجمی توسط رشید^۴ و همکاران [۳۱] ۸۵ درصد گزارش شده است. نتیجه آزمون تحلیل واریانس برای طراحی آزمایش عاملی کامل در جدول ۲ و نمودار اثرهای اصلی و تداخلی نیز در شکل ۶ آورده شده است. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود، در محدوده مطالعه شده، اثر عامل های پیش تیمار قلیایی، تعداد مراحل استیل زدایی، دز پرتو دهی و همچنین اثرهای تداخلی دز پرتو دهی × پیش تیمار و دز پرتو دهی × تعداد مراحل استیل زدایی بر درجه استیل زدایی کیتوزان تولیدی معنی دار است ($P < 0.05$). همچنین، مطابق شکل ۷، تأثیر گذاری پیش تیمار قلیایی و دز پرتو دهی، نسبت به تعداد مراحل استیل زدایی بیشتر است و هر سه عامل دارای تأثیر مثبت بر درجه استیل زدایی هستند. گفتنی است که تاکنون مطالعات زیادی در مورد تعیین روش مناسب برای محاسبه درجه استیل زدایی کیتین انجام شده است. تعدادی از پژوهشگران گزارش داده اند که عدد بدست آمده از روش تیتراسیون معمولاً ۵-۱۰ واحد بالاتر از عدد بدست آمده از روش طیفسنجی فروسرخ است [۶۴] که با نتایج بدست آمده در این گزارش مطابقت دارد.

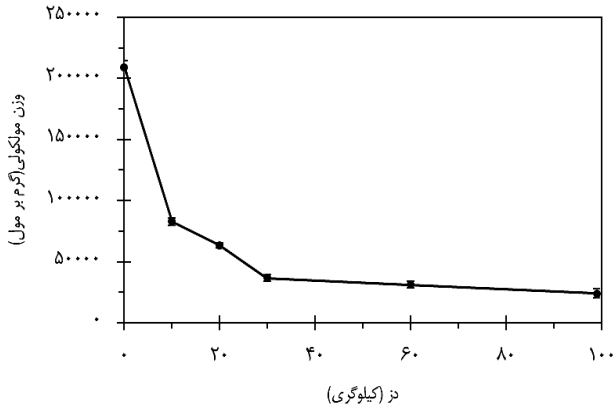
همانطور که مشاهده می شود برای نمونه های پرتو ندیده، افزایش زمان و تعداد مراحل تیمار قلیایی و همچنین پیش تیمار با محلول سود موجب افزایش درجه استیل زدایی شد ($p\text{-value} < 0.05$). برای مثال، برای نمونه تماس داده شده با محلول سود ۵۰ درصد وزنی-حجمی، درجه استیل زدایی بدست آمده با روش طیفسنجی تبدیل فوریه در مرحله اول استیل زدایی در زمان ۵ ساعت ۶۰ درصد بدست آمد. این مقادیر با انجام پیش تیمار قلیایی به ۸۴ درصد و با انجام پیش تیمار و مرحله دوم استیل زدایی به ۹۳ درصد افزایش یافت. تحلیل آماری نتایج با روش آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در شرایط یکسان استیل زدایی، درجه استیل زدایی کیتوزان با افزایش دز پرتو تابیده شده، افزایش می یابد ($p\text{-value} < 0.05$). در حالی که مقادیر بدست آمده مربوط به مرحله اول استیل زدایی برای نمونه پرتو ندیده ۶۰ درصد بدست آمد، این مقادیر برای نمونه پرتو دیده با افزایش دز پرتو دهی از ۱۰ به ۳۰ و ۶۶ کیلوگری، به ۶۹ و ۷۸ و ۸۵ درصد افزایش یافت. تاباندن پرتو یونیزه کننده، موجب کاهش وزن مولکولی و خصوصیت بلوری کیتین می شود که امکان استیل زدایی کیتین تحت شرایط واکنشی متعادل تر را فراهم می کند [۱، ۱۴، ۳۱]. پیش تر رحمان^۱ و همکاران [۶۳] با استیل زدایی کیتین پرتو ندیده با محلول ۴۰ درصد وزنی-حجمی سود، کیتوزان با درجه استیل زدایی ۷۲ درصد بدست آوردند در حالی که با استفاده از کیتین پرتو دهی شده با دز ۵۰ کیلوگری و سود ۲۰ درصد وزنی-حجمی، کیتوزان با درجه استیل زدایی ۸۱/۵ درصد تولید شد. بیشینه میزان درجه استیل زدایی

(۱) Rahman

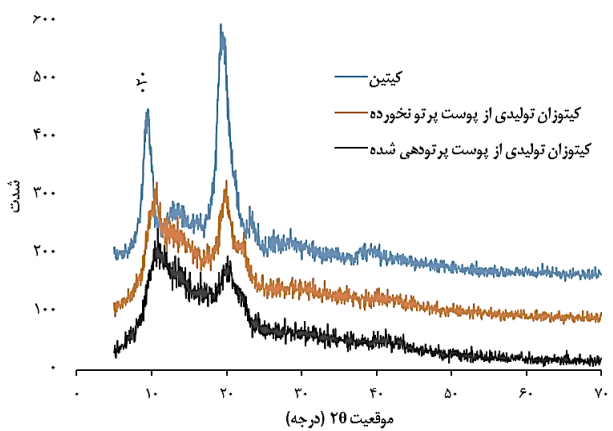
(۳) Tahtat

(۲) El-Nesr

(۴) Rashid



شکل ۸- نمودار تغییرات وزن مولکولی بر اثر پرتو دهی



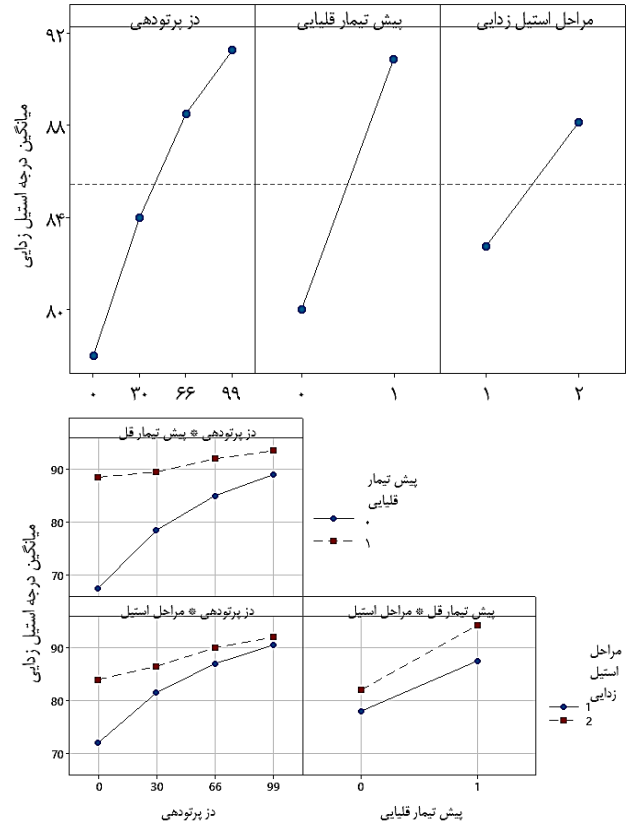
شکل ۹- طیف پراش پرتو ایکس مربوط به کیتین، کیتوزان تولیدی از پوست میگوی پرتو ندیده، کیتوزان تولیدی از پوست میگوی پرتو دهی شده

بسیار شدید بوده و پس از آن شیب خط کاهش وزن مولکولی به تدریج کم شده به صورتی که وزن مولکولی پلیمر از حدود $1/85 \times 10^5$ در حالت پرتو ندیده به $9/7 \times 10^4$ در حالت پرتو دیده با دز ۲۰ کیلوگری و به $6/5 \times 10^4$ در حالت پرتو دیده با دز ۱۰۰ کیلوگری، کاهش یافته است. همچنین تاهات و همکاران [۱۴]، کاهش وزن مولکولی از $1/3 \times 10^5$ به $7/1 \times 10^4$ را برای کیتین پرتو دیده با دز ۰ و ۲۰ کیلوگری گزارش کردند.

پراش پرتو ایکس

در شکل ۹ طیف پراش پرتو ایکس مربوطه به نمونه‌های کیتین، کیتوزان تولید شده از پوست پرتو ندیده و کیتوزان حاصل از پوست پرتو دهی شده با دز ۳۰ کیلوگری نشان داده شده است.

در طیف کیتین، قله‌های شاخص در زاویه (۲θ) برابر $9/5$ ، $13/7$ ، $19/2$ ، 28 و $39/7$ درجه قابل مشاهده است. وجود قله بلند و تیز در زاویه (۲θ) محدوده ۲۰ درجه به عنوان مشخصه بلورینگی کیتین گزارش شده است. در طیف کیتوزان تولیدی از پوست میگوی

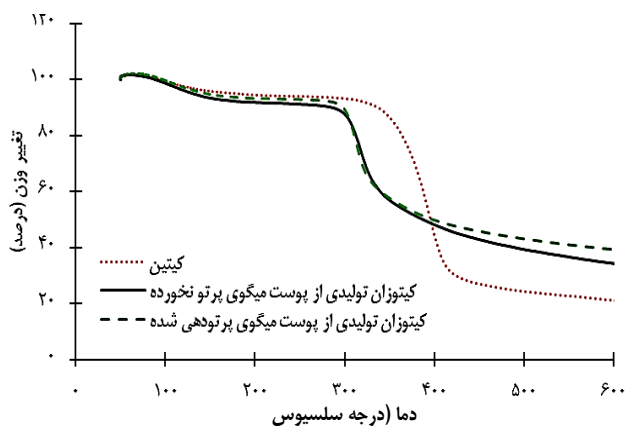


شکل ۷- نمودار اثرهای اصلی و تداخلی مربوط به مطالعه عوامل مؤثر بر درجه استیل زدایی کیتوزان

گرانروی و وزن مولکولی

نتایج پژوهش‌های زیادی تاکنون نشان داده است که مواجهه پلی‌ساکاریدها در فاز جامد با پرتوهای یونیزه کننده در حالت معمول، با شکسته شدن پیوند گلیکوزیدی بین مونومرهای زنجیره باعث کاهش وزن مولکولی پلیمر می‌شود [۵۰، ۵۱، ۶۵]. پژوهشگران گزارش داده‌اند که پرتو دهی پودر کیتین منجر به کاهش وزن مولکولی و گرانروی محلول کیتوزان تولیدی می‌گردد [۳۱، ۵۷]. اثر پرتو دهی با پرتو الکترونی بر گرانروی و کاهش وزن مولکولی کیتوزان تولیدی در شکل ۸ نشان داده شده است.

مطابق نتایج پژوهش حاضر، افزایش دز پرتو دهی در بازه ۱۰ تا ۱۰۰ کیلوگری منجر به کاهش گرانروی ذاتی و همچنین وزن مولکولی متوسط حجمی پلیمر کیتوزان شد به صورتی که وزن مولکولی به دست آمده برای نمونه پرتو دهی شده با دز صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ کیلوگری به ترتیب $2/1 \times 10^5$ ، $8/3 \times 10^4$ ، $6/2 \times 10^4$ و $3/7 \times 10^4$ گرم بر مول بود. در دزهای بالاتر روند کاهشی وزن مولکولی شدت کمتری پیدا کرد که با نتایج گزارش شده در مراجع همخوانی دارد. مطابق نتایج پژوهش انجام شده توسط رشید و همکاران [۳۱]، شدت کاهش وزن مولکولی در ۲۰ کیلوگری اولیه



شکل ۱- نمودار گرمایوزن سنجی کیتین، کیتوزان و کیتوزان تولید شده از پوسته پرتو خورده با دز ۳۰ کیلوگری

در آن مشاهده نشد. به نظر می‌رسد، این منطقه مرتبط به تغییر حالت ماده از حالت الاستیک به شیشه‌ای باشد. در مورد دمای انتقال شیشه‌ای کیتوزان گزارش‌های متناقضی وجود دارد ولی برخی پژوهشگران این دما را بین ۲۰۰-۳۰۰ درجه سلسیوس بسته به وزن مولکولی، درجه استیل زدایی، محتوای رطوبت و ... گزارش کرده‌اند و برخی نیز گزارش نموده‌اند که کیتوزان در محدوده دمایی قبل از تخریب دمای انتقال شیشه‌ای ندارد.

مرحله سوم از دمای ۲۸۰ درجه سلسیوس شروع می‌شود و دارای پیک دمایی گرمازا مربوط به تخریب حرارتی کیتوزان (شکستن پیوندهای گلوکوزیدی و همچنین انجام استیل زدایی) است. در این منطقه، در حدود ۵۳ درصد کاهش وزن رخ داد. تخریب حرارتی کیتوزان به شکسته شدن پیوندهای گلوکوزیدی بین مونوساکاریدها، استیل زدایی حرارتی و در ادامه اکسیداسیون حرارتی نسبت داده شده است [۶۵]. بالاتر بودن دمای شروع تخریب و به عبارتی پایداری حرارتی بالاتر کیتین نسبت به کیتوزان و همچنین کاهش وزن بیشتر کیتین نسبت به کیتوزان در محدوده تخریب حرارتی در مقالات مشابه گزارش شده و به حضور تعداد بیشتر گروه‌های استیل در کیتین نسبت به کیتوزان نسبت داده شده است [۶۶]. نمودارهای کیتوزان و کیتوزان حاصل از پوست میگوی پرتو خورده با هم مشابه هستند با این تفاوت که تخریب حرارتی کیتوزان حاصل از پودر پرتو خورده، اندکی زودتر شروع می‌شود و همچنین میزان کاهش وزن در مرحله اول و دوم کمتر از نمونه پرتو ندیده است. این مسئله می‌تواند به کاهش وزن مولکولی در اثر پرتو نسبت داده شود که منجر به کاهش قدرت جذب آب در کیتوزان می‌گردد و با داده‌های قدرت جذب آب همبستگی دارد. تأثیر بسیار محدود یا عدم تأثیر پرتو یونیزه کننده بر خصوصیات حرارتی کیتوزان در مقالات مشابه نیز تأیید شده است [۵۷، ۶۵].

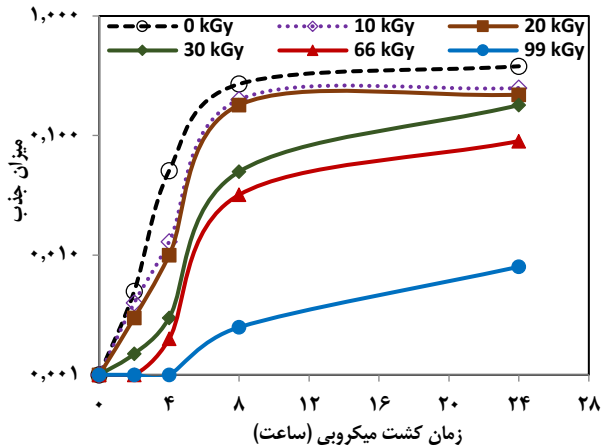
پرتو دهی نشده، قله‌های شاخص در زاویه (۲θ) برابر ۱۰/۷، ۱۹/۹ و ۴۲/۴ قابل مشاهده است که با استاندارد JCPDS به شماره ۰۳۹-۰۰-۱۸۹۴ مطابقت خوبی دارد. همچنین در طیف کیتوزان تولیدی از پوست میگوی پرتو دهی شده، قله‌های شاخص در زاویه (۲θ) برابر ۱۰/۳، ۲۰/۴ و ۴۲/۲ درجه مشاهده شد که با طیف کیتوزان پرتو دهی نشده مطابقت بالایی دارد. قله مشاهده در زاویه (۲θ) برابر ۱۰/۷ درجه به پیوستگی مولکول‌های آب پیوندی (پیوند هیدروژنی درون و بین مولکولی) در شبکه بلوری جزئی کیتوزان و قله مشاهده شده در ۱۹/۹ درجه به واحدهای کیتین استیل زدایی نشده در کیتوزان نسبت داده شده است [۵۷]. با مقایسه شدت قله موجود در زاویه (۲θ) محدوده ۲۰ درجه، مشاهده می‌شود که ارتفاع قله در نمونه کیتین از نمونه‌های کیتوزان بالاتر است و همچنین پس از پرتو دهی ارتفاع پیک در این منطقه کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش بلورینگی با پرتو دهی است [۴۱، ۵۷]. همچنین با مقایسه شدت و پهنای کامل در نیم ماکزیمم (FWHM) قله شاخص در (۲θ) محدوده ۲۰ درجه، کاهش شدت و افزایش FWHM برای نمونه پرتو دهی شده اتفاق افتاده است. این مسئله می‌تواند به کاهش بلورینگی در نتیجه پرتو دهی نسبت داده شود [۴۱].

گرماسنجی وزنی

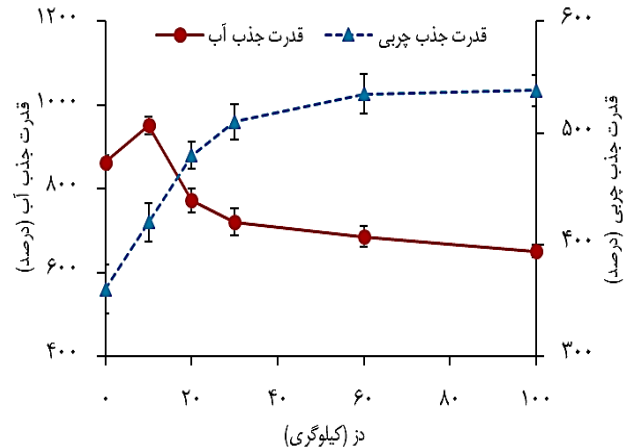
نمودارهای آنالیز گرما وزن سنجی مربوط به کیتین، کیتوزان و کیتوزان تولید شده از پودر پرتو خورده در شکل ۱۰ آورده شده است. در نمودار DTA و TGA کیتوزان چند مرحله دمایی مشاهده می‌شود. مرحله اول، در محدوده دمایی ۷۰-۲۰۰ درجه سلسیوس است که در این محدوده بخش گرماگیر آغاز می‌شود. این منطقه مرتبط به گرم شدن اولیه و تبخیر رطوبت و آب موجود در نمونه کیتین است. در این منطقه، ۵ درصد کاهش وزن در کیتین به دلیل تبخیر آب و رطوبت موجود در نمونه مشاهده شد. مرحله دوم در نمودار DTA در محدوده دمایی ۳۰۰-۲۴۰ درجه سلسیوس دارای پیک گرماگیر بوده و کاهش وزنی در آن مشاهده نشد. به نظر می‌رسد، این منطقه مرتبط به تغییر حالت ماده از حالت الاستیک به شیشه‌ای باشد. مرحله سوم، از دمای ۳۳۰ درجه سلسیوس شروع می‌شود و دارای پیک دمایی گرمازا مربوط به تخریب حرارتی کیتین است. در این منطقه، در حدود ۷۲ درصد کاهش وزن رخ داد.

در نمودار DTA و TGA کیتوزان چند مرحله دمایی مشاهده شد. مرحله اول در محدوده دمایی ۵۰-۱۵۰ سلسیوس بود که در این محدوده بخش گرماگیر آغاز می‌شود. این منطقه مرتبط به گرم شدن اولیه و تبخیر رطوبت و آب موجود در نمونه کیتوزان است و در آن حدود ۷٪ کاهش وزن مشاهده شد. مرحله دوم در محدوده دمایی ۲۹۰-۲۷۰ درجه سلسیوس، دارای پیک گرماگیر بود و هیچ گونه کاهش وزنی

(۱) Full width at half maximum (FWHM)



شکل ۱۲- نمودار آزمون ضد میکروبی کیتوزان در کشت معلق باکتری *اشرشیا کولای*



شکل ۱۱- نمودار افزایش قدرت جذب ناشی از پرتودهی شده

قدرت جذب آب و قدرت جذب چربی

پیشتر برخی پژوهشگران گزارش کرده‌اند که قدرت جذب آب در کیتوزان با وزن مولکولی، درجه استیل‌زدایی و درجه بلورینگی کیتوزان ارتباط دارد. به صورتی که با کاهش وزن مولکولی، افزایش درجه استیل‌زدایی و کاهش بلورینگی، قدرت جذب این پلیمر زیستی افزایش پیدا می‌کند. در شکل ۱۱ نتایج آزمون جذب آب توسط کیتوزان تولید شده در شرایط مختلف نشان داده شده است.

با افزایش دز پرتودهی به ۱۰ کیلوگری قدرت جذب آب کیتوزان افزایش و پس از آن با افزایش دز پرتودهی، قدرت جذب آب کاهش یافت. پیشتر رشید و همکاران [۳۱] گزارش دادند در نتیجه پرتودهی پوست میگو، کاهش وزن مولکولی، افزایش درجه استیل‌زدایی و کاهش درجه بلورینگی کیتوزان اتفاق می‌افتد و همچنین سطح ویژه در اثر تخریب پلیمر افزایش می‌یابد. در نتیجه فضا برای اتصال گروه‌های هیدروکسیل و آمین و گروه‌های انتهایی زنجیره افزایش می‌یابد و بنابراین، قدرت جذب آب توسط کیتوزان در اثر پرتودهی در دامنه ۲-۱۰۰ کیلوگری افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، پژوهشگران با پرتودهی پودر کیتوزان و صمغ پارسی نشان دادند کاهش وزن مولکولی ایجاد شده در اثر پرتودهی این پلیمرها با دز بالای ۱۰ کیلوگری موجب کاهش قدرت جذب آب در پلیمرهای یاد شده می‌شود [۶۷]. به نظر می‌رسد در دزهای پرتودهی پایین، اثر افزایش درجه استیل‌زدایی بر کاهش درجه بلورینگی بر اثر کاهش وزن مولکولی غلبه کرده و موجب افزایش قدرت جذب آب کیتوزان می‌شود، در حالی که در دزهای بالاتر، اثر کاهش وزن مولکولی غلبه کرده و موجب کاهش قدرت جذب آب می‌گردد. همچنین کاهش قدرت جذب آب کیتوزان پس از پرتودهی گاما به دلیل کاهش وزن مولکولی، پیشتر توسط بانو و همکاران تایید شده است [۶۸]. افزایش قدرت جذب چربی کیتوزان با افزایش دز

پرتودهی که در پژوهش حاضر نتیجه شده است، با نتیجه گزارش شده در پژوهش‌های مشابه همخوانی دارد [۱۳، ۳۱].

اثر پرتو در خواص ضد میکروبی کیتوزان

یکی از روش‌های استفاده شده برای ارزیابی خواص ضد میکروبی نمونه‌های کیتوزان تولید شده تحت شرایط مختلف پرتودهی، قرائت میزان کدورت کشت معلق باکتری *اشرشیا کولای* به عنوان معیاری از میزان رشد باکتری‌ها بود. نتایج این آزمون در شکل ۱۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، در نمونه‌های پرتو دیده زمان فاز تأخیر به صورت قابل توجهی افزایش یافته و پس از آن میزان رشد باکتری‌ها کمتر بوده است. به نظر می‌رسد اثر دز پرتودهی در دزهای بالای ۳۰ کیلوگری نسبت به دزهای پایین‌تر به صورت مشهودتری قابل تشخیص است.

نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)^۱ و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)^۲ محلول‌های کیتوزان تولیدی در دزهای مختلف پرتودهی در شکل ۱۳ نشان شده است.

میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی برای کیتوزان تولید شده از پوست میگوی پرتودهی نشده و پوست میگوی پرتودهی شده با دز صفر، ۳۰ و ۹۹ کیلوگری در مورد باکتری *اشرشیا کولای* به ترتیب ۰/۸، ۰/۶۵ و ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۷، ۰/۵ و ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین میانگین حداقل غلظت باکتری کشی برای کیتوزان تولید شده از پوست میگوی پرتودهی نشده و پوست میگوی پرتودهی شده با دز صفر، ۳۰ و ۹۹ کیلوگری در مورد باکتری *اشرشیا کولای* به ترتیب ۲/۵، ۱/۵ و ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مورد باکتری

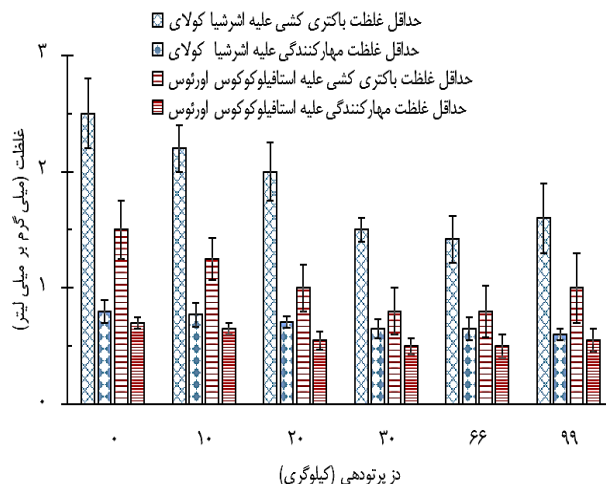
(۱) Minimum inhibitory concentration (MIC)

(۲) Minimum bactericidal concentration (MBC)

جدول ۳- نتیجه آزمون خواص ضدباکتری محلول کیتوزان تولید شده از پوست میگوی پرتو خورده

دز پرتو دهی	صفر	۱۰	۲۰	۳۰	۶۶	۹۹
قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (میلی متر)	۵/۰±۰/۴	۸/۳±۰/۶	۹/۸±۰/۵	۱۲/۰±۰/۷	۱۶/۵±۰/۷	۱۸/۸±۰/۶
قطر هاله عدم رشد برای باکتری اشرشیا کولای (میلی متر)	۳/۷±۰/۵	۷/۱±۰/۷	۹/۴±۰/۹	۱۱/۴±۰/۳	۱۵/۱±۰/۸	۱۷/۲±۰/۷

استافیلوکوکوس اورئوس در بازه ۰/۱ تا ۱ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است. همچنین مقدار حداقل غلظت باکتری کشی کیتوزان و الیگومرهای آن برای اشرشیا کولای در بازه ۰/۱۲۵ تا ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای استافیلوکوکوس اورئوس در بازه ۰/۱۲۵ تا ۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است [۶۹-۷۲]. نتایج آزمون ضد میکروبی نفوذ آگار در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود، محلول کیتوزان در دزهای مختلف پرتو دهی بر روی هر دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی مطالعه شده اثر ضد میکروبی نشان داد و قطر هاله عدم رشد با افزایش دز پرتو دهی افزایش یافت. این مسئله می تواند به کاهش وزن مولکولی و افزایش درجه استیل زدایی کیتوزان و همچنین ارتباط وزن مولکولی کیتوزان با نفوذپذیری آن در آگار نسبت داده شود و با نتایج مطالعات پژوهشگران دیگر مطابقت بالایی دارد [۴۴]. مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری ها، نشان داد که کیتوزان تولید شده در برخی دزهای پرتو دهی اثر ضد میکروبی کمتری بر باکتری گرم منفی اشرشیا کولای نسبت به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشته (p-value < 0.05) و در برخی دزهای دیگر اختلاف معنی داری بین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده وجود نداشته است. تفاوت فعالیت ضد باکتری مشاهده شده می تواند به ساختار متفاوت دیواره سلولی در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نسبت داده شود. نتایج متفاوتی در این زمینه گزارش شده به صورتی که در برخی مطالعات پیشین گزارش شده که اثر ضد میکروبی کیتوزان و الیگومرهای کیتوزانی بر باکتری های گرم منفی بیشتر از باکتری های گرم مثبت است [۶۸] و در برخی دیگر گزارش شده که اثر ضد میکروبی کیتوزان و الیگومرهای آن بر باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی است [۷۳]. مطابق جدول ۳، قطر هاله عدم رشد میکروبی با استفاده از محلول ۱ درصد وزنی-حجمی کیتوزان، در مورد باکتری اشرشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس با افزایش دز پرتو دهی از صفر به ۳۰ کیلوگری به ترتیب از ۳/۷ به ۱۲ و از ۵ به ۱۱/۴ میلی متر افزایش یافت. در یک مطالعه پیشین، با پرتو دهی کیتوزان با دز ۳۰ کیلوگری، قطر هاله عدم رشد میکروبی حاصل از محلول ۱ درصد وزنی-حجمی کیتوزان برای باکتری های یاد شده به ترتیب از ۶/۸ به ۱۰ و از ۶/۷ به ۱۱/۸ افزایش یافته است [۷۴].



شکل ۱۳- نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی محلول کیتوزان های تولیدی در دزهای مختلف پرتو دهی

استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱/۵، ۰/۸ و ۱/۰ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. به صورت یک روند کلی، مقادیر محاسبه شده حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی برای هر دو باکتری با افزایش دز پرتو دهی تا دز ۳۰ کیلوگری به صورت معنی داری کاهش یافت و در دزهای بالاتر غالباً افزایش یا کاهش معنی دار در آن ها مشاهده نشد. این مسئله می تواند به روند کاهش وزن مولکولی کیتوزان با افزایش دز پرتو دهی که در بخش های قبل بحث شده است، نسبت داده شود. در مطالعه حاضر، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی محلول کیتوزان های تولید شده از پوست های پرتو خورده با دزهای مختلف، برای باکتری اشرشیا کولای به ترتیب در محدوده ۰/۸-۱/۵ و ۰/۶-۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب در محدوده ۰/۷-۰/۴۵ و ۰/۸-۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. در مراجع مختلف اعداد متفاوتی برای حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی کیتوزان گزارش شده است که علاوه بر نوع ریزاندامگان^۱ به وزن مولکولی، درجه دی استیلاسیون و منبع تهیه کیتوزان و همچنین نوع حلال و اسید استفاده شده، pH محلول و ... بستگی دارد. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی کیتوزان و الیگومرهای آن برای باکتری اشرشیا کولای در بازه ۰/۱ تا ۲ میلی گرم بر میلی لیتر و برای باکتری

(۱) Microorganism

نتیجه‌گیری

در این پژوهش در یک مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی، ضمن بررسی اثر غلظت اسید و باز و زمان بر فرآیند معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی از پوست میگو برای استخراج کیتین، اثر پرتودهی پوست میگو بر فرآیند استخراج کیتین و تولید کیتوزان بررسی شد. نتایج نشان داد در شرایط و محدوده غلظت و زمان مطالعه، غلظت محلول‌های اسید کلریدریک یا سود و زمان تماس در میزان حذف املاح معدنی و پروتئین تأثیر گذار است. علاوه بر این، نتایج نشان داد که پرتودهی الکترونی ماده اولیه موجب کاهش زمان مورد نیاز در هر دو فرآیند معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی می‌شود. پرتودهی موجب کاهش بلورینگی و دمای تخریب کیتوزان تولیدی شد و با افزایش دز پرتودهی، وزن مولکولی کیتوزان تولیدی کاهش و درجه استیل‌زدایی آن افزایش یافت. بسته به دز پرتودهی و نحوه انجام واکنش، کیتوزان با درجه استیل‌زدایی بین ۶۰-۹۵ درصد تولید شد. قدرت جذب آب و چربی بسته به دز پرتودهی به ترتیب در محدوده ۶۵۰-۸۶۰ و ۵۴۰-۳۶۰ تغییر کرد. کیتوزان تولید شده از پودر پرتودهی شده، دارای فعالیت ضد میکروبی مناسبی بر هر دو باکتری اشرشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس بودند و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها با افزایش دز پرتودهی افزایش یافت. بسته به دز پرتودهی، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری‌کشی علیه باکتری‌های اشرشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس برای کیتوزان‌های تولیدی به ترتیب در محدوده ۰/۵-۰/۸ و ۰/۸-۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

ترکیبات پلیمری به واسطه اثر فشار اسمزی و ایجاد اختلال در فعالیت‌های تبدیلی ریزاندامگان می‌توانند موجب مرگ یا جلوگیری از رشد ریزاندامگان شوند. کیتوزان با تشکیل یک لایه نفوذ ناپذیر روی سطح غشا باکتری‌ها در فرآیند تبادل مواد غذایی مورد نیاز و مواد دفعی سلول، اختلال ایجاد کرده و موجب مرگ سلولی می‌شود. تشکیل کمپلکس الکتروولت بین گروه‌های کاتیونی کیتوزان و گروه‌های دارای بار منفی سطح سلول، نقش مهمی در تشکیل لایه یاد شده دارد [۶۸]. همچنین خاصیت شلاته‌کنندگی کیتوزان در نقش ضد باکتری آن موثر شناخته شده است. با کاهش وزن مولکولی کیتوزان و همچنین افزایش درجه استیل‌زدایی، ایجاد پوشش یاد شده تسهیل شده و بنابراین فعالیت ضد باکتری کیتوزان تقویت می‌شود [۴۴، ۷۵]. همچنین، کیتوزان دارای وزن مولکولی بسیار پایین با نفوذ به داخل سلول می‌تواند موجب ایجاد تداخل در فعالیت متابولیکی باکتری شود. باید توجه داشت، کیتوزان دارای وزن مولکولی کم دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی است و برخی پژوهشگران ادعا نموده‌اند که می‌تواند برای بدن انسان مضر باشد [۶۸]. با توجه به نتایج پژوهش‌ها، کیتوزان دارای وزن مولکولی بزرگتر از ۵۰۰ دالتون نمی‌تواند از غشای سلولی عبور کرده و دارای سمیت برای سلول‌های انسانی نیست [۷۵، ۷۶]. در یک کار پژوهشی، کیتوزان دارای وزن مولکولی ۵۰-۱۴۰ کیلو دالتون به عنوان گزینه دارای فعالیت ضد میکروبی مناسب گزارش شده است [۷۶]. در کار پژوهشی دیگری ادعا شده است که فعالیت ضد میکروبی کیتوزان با کاهش وزن مولکولی ابتدا افزایش می‌یابد ولی پس از آن با کاهش وزن مولکولی و تولید لیگومرهای کیتوزانی دارای وزن مولکولی خیلی کم، روند فعالیت ضد باکتری کاهش می‌شود که البته به نوع باکتری و گرم مثبت و منفی بودن آن نیز بستگی دارد [۷۳].

مراجع

- [1] Mahlous M., Tahtat D., Benamer S., Nacer Khodja A., [Gamma Irradiation-Aided Chitin/Chitosan Extraction from Prawn Shells](#). *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.*, **265**: 414-417 (2007).
- [2] Tang W., Wang J., Hou H., Li Y., Wang J., Fu J., Lu L., Gao D., Liu Z., Zhao F., Gao X., Ling P., Wang F., Sun F., Tan H., Review: [Application of Chitosan and Its Derivatives in Medical Materials](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **240**: 124398 (2023).
- [3] Darzi Arbabi H., Motamedzadegan A., Pirdashti M., Shahrokhi B., Arzideh S.M., [Extraction and Physicochemical Characterization of Chitosan from Litopenaeus Vannamei Shells](#). *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **41(10)**: 3441-3450 (2022).

- [4] Shahbazi N., Rajaei A., Tabatabaei M., Mohsenifar A., Bodaghi H., [Impact of Chitosan-Capric Acid Nanogels Incorporating Thyme Essential Oil on Stability of Pomegranate Seed Oil-in-Water Pickering Emulsion](#). *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **40(6)**: 1737-1748 (2021).
- [۵] کریمی م.ح، عبدوس م، کلایی م.ر، مرادی ا، نانو حامل های پایه کیتوسان برای رهایش داروی ضد سرطان کورکومین: مطالعه مروری. *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۴۲(۴)**: ۱۷-۱ (۱۴۰۲).
- [۶] سعیدیان ح، شیرمحمدی بهادران ش، محمدپور دونیقی ن، رهایش کنترل شده زهر عقرب کمپسوبوتوس از نانوذره های کیتوزان به عنوان سامانه انتقال آنتی ژن. *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۹(۲)**: ۱۰-۱ (۱۴۰۰).
- [7] Rezaei Jamalabadi S., Oroujzadeh N., [Utilizing Response Surface Method for Optimization of the Removing Cu\(II\) Ions from Aqueous Solutions Using New Magnetic Chitosan-Based Nanocomposites Containing N-Nicotinyl Phosphoric Triamides](#). *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, **42(10)**: 3278-3292 (2023).
- [8] Sharikova N.A., Antipova K.G., Lukanina K.I., Stolyarova D.Y., Vdovichenko A.Y., Malakhov S.N., Krashennnikov S.V., Kulikova O.R., Khramtsova E.A., Chvalun S.N., Grigoriev T.E., [Chitosan-Based Porous Composites for Bone Tissue Engineering](#). *Macromol. Symposia*, **404**: 2100398 (2022).
- [9] Wang X., Song R., Johnson M., A S., Shen P., Zhang N., Lara-Sález I., Xu Q., Wang W., [Chitosan-Based Hydrogels for Infected Wound Treatment](#). *Macromol. Biosci.*, 2300094 (2023).
- [10] Sixto-Berrocal A.M., Vázquez-Aldana M., Miranda-Castro S.P., Martínez-Trujillo M.A., Cruz-Díaz M.R., [Chitin/Chitosan Extraction from Shrimp Shell Waste by a Completely Biotechnological Process](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **230**: 1123204 (2023).
- [11] Yu J., Hu N., Hou L., Hang F., Li K., Xie C., [Effect of Deacetylation of Chitosan on the Physicochemical, Antioxidant and Antibacterial Properties Activities of Chitosan-Mannose Derivatives](#). *J. Sci. Food Agricul.* **Article InPress** (2023).
- [12] Zheng T., Tang P., Li G., [Effects of Chitosan Molecular Weight and Deacetylation Degree on the Properties of Collagen-Chitosan Composite Films for Food Packaging](#). *J. Appl. Polym. Sci.*, **139**: 52995 (2022).
- [13] Rashid T.U., Shamsuddin S.M., Khan M.A., Rahman M.M., [Evaluation of Fat Binding Capacity of Gamma Irradiated Chitosan Extracted from Prawn Shell](#). *Soft Mater.*, **12**: 262-267 (2014).
- [14] Tahtat D., Uzun C., Mahlous M., Güven O., [Beneficial Effect of Gamma Irradiation on the N-Deacetylation of Chitin to Form Chitosan](#). *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.*, **265**: 425-428 (2007).
- [۱۵] قره‌خانی م، قربانی م، رسول‌نژاد ن، جبرائیلی ش، روش‌های نوین استخراج ترکیبات مؤثره از گیاهان دارویی: استخراج به کمک فراصوت و ریزموج و استخراج با حلال فشرده. *نشریه مهندسی شیمی ایران*، **۱۰**: ۲۴-۳۶ (۲۰۱۲).

- [16] Dzah C.S., Duan Y., Zhang H., Serwah Boateng N.A., Ma H., [Latest Developments in Polyphenol Recovery and Purification from Plant by-Products: A Review](#). *Trends Food Sci. Technol.*, **99**: 375-388 (2020).
- [17] Sodeifian G., Sajadian S.A., Saadati Ardestani N., [Optimization of Essential Oil Extraction from *Launaea Acanthodes* Boiss: Utilization of Supercritical Carbon Dioxide and Cosolvent](#). *J. Supercrit. Fluids*, **11**: 646-656 (2016).
- [18] Sodeifian G., Ardestani N.S., Sajadian S.A., Moghadamian K., [Properties of *Portulaca Oleracea* Seed Oil Via Supercritical Fluid Extraction: Experimental and Optimization](#). *J. Supercrit. Fluids*, **13**: 534-544 (2018).
- [19] Sodeifian G., Sajadian S.A., Saadati Ardestani N., [Supercritical Fluid Extraction of Omega-3 from *Dracocephalum Kotschy* Seed Oil: Process Optimization and Oil Properties](#). *J. Supercrit. Fluids*, **119**: 139-149 (2017).
- [20] Sodeifian G., Saadati Ardestani N., Sajadian S.A., [Extraction of Seed Oil from *Diospyros Lotus* Optimized Using Response Surface Methodology](#). *J. For. Res.*, **30**: 709-719 (2019).
- [21] Pachapur V.L., Guemiza K., Rouissi T., Sarma S.J., Brar S.K., [Novel Biological and Chemical Methods of Chitin Extraction from Crustacean Waste Using Saline Water](#). *J. Chem. Tech. Biotech.*, **9**: 2331-2339 (2016).
- [22] Younes I., Hajji S., Frachet V., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M., [Chitin Extraction from Shrimp Shell Using Enzymatic Treatment. Antitumor, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Chitosan](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **69**: 489-498 (2014).
- [23] Sarhan A.A., Ayad D.M., Badawy D.S., Monier M., [Phase Transfer Catalyzed Heterogeneous N-Deacetylation of Chitin in Alkaline Solution](#). *React. Funct. Polym.*, **69**: 358-363 (2009).
- [24] Dong Q., Qiu W., Li L., Tao N., Liang Wang A., Deng S., Jin Y., [Extraction of Chitin from White Shrimp \(*Penaeus Vannamei*\) Shells Using Binary Ionic Liquid Mixtures](#). *J. Indust. Eng. Chem.*, **120**: 529-541 (2023).
- [25] Sulthan R., Reghunadhan A., Sambhudevan S., [A New Era of Chitin Synthesis and Dissolution Using Deep Eutectic Solvents- Comparison with Ionic Liquids](#). *J. Molecular Liq.*, **380**: 121794 (2023).
- [26] Li Z., Li M.-C., Liu C., Liu X., Lu Y., Zhou G., Liu C., Mei C., [Microwave-Assisted Deep Eutectic Solvent Extraction of Chitin from Crayfish Shell Wastes for 3d Printable Inks](#). *Ind. Crops Prod.*, **194**: 116325 (2023).
- [27] Delezuk J.A.d.M., Cardoso M.B., Domard A., Campana-Filho S.P., [Ultrasound-Assisted Deacetylation of Beta-Chitin: Influence of Processing Parameters](#). *Polym. Int.*, **60**: 903-909 (2011).
- [28] Ahmadkelayeh S., Hawboldt K., [Extraction of Lipids and Astaxanthin from Crustacean by-Products: A Review on Supercritical CO₂ Extraction](#). *Trend. Food Sci. Technol.*, 10394-108 (2020).
- [29] Arbia W., Arbia L., Adour L., Amrane A., [Chitin Extraction from Crustacean Shells Using Biological Methods - a Review](#). *Food Technol. Biotechnol.* **51**: 12-25 (2012).

- [30] Mohan K., Ganesan A.R., Ezhilarasi P.N., Kondamareddy K.K., Rajan D.K., Sathishkumar P., Rajarajeswaran J., Conterno L., [Green and Eco-Friendly Approaches for the Extraction of Chitin and Chitosan: A Review](#). *Carbohydr. Polym.*, **287**: 119349 (2022).
- [31] Rashid T.U., Rahman M.M., Kabir S., Shamsuddin S.M., Khan M.A., [A New Approach for the Preparation of Chitosan from \$\Gamma\$ -Irradiation of Prawn Shell: Effects of Radiation on the Characteristics of Chitosan](#). *Polym. Int.*, **61**: 1302-1308 (2012).
- [32] Dehghan-Niri M., Vasheghani-Farahani E., Baghaban Eslaminejad M., Tavakol M., Bagheri F., [Physicomechanical, Rheological and in Vitro Cytocompatibility Properties of the Electron Beam Irradiated Blend Hydrogels of Tyramine Conjugated Gum Tragacanth and Poly \(Vinyl Alcohol\)](#). *Mater. Sci. Engi. C*, **114**: 111073 (2020).
- [33] Vo K.D.N., Kowandy C., Dupont L., Coqueret X., Hien N.Q., [Radiation Synthesis of Chitosan Stabilized Gold Nanoparticles Comparison between E-Beam and Gamma Irradiation](#). *Rad. Phys. Chem.*, **94**: 84-87 (2014).
- [34] Choi J.-i., Kim J.-H., Lee K.-W., Song B.-S., Yoon Y., Byun M.-W., Lee J.-W., [Comparison of Gamma Ray and Electron Beam Irradiations on the Degradation of Carboxymethylcellulose](#). *Korean J. Chem. Eng.*, **26**: 1825-1828 (2009).
- [35] Fifield L.S., Pharr M., Staack D., Pillai S.D., Nichols L., McCoy J., Faucette T., Bisel T.T., Huang M., Hasan M.K., Perkins L., Cooley S.K., Murphy M.K., [Direct Comparison of Gamma, Electron Beam and X-Ray Irradiation Doses on Characteristics of Low-Density Polyethylene.](#) *Rad. Phys. Chem.*, **186**: 109505 (2021).
- [36] Sabnis S., Block L.H., [Improved Infrared Spectroscopic Method for the Analysis of Degree of N-Deacetylation of Chitosan](#). *Polym. Bull.*, **39**: 67-71 (1997).
- [37] Mengelizadeh N., Jafarzadeh Haghhighifard N., Takdastan A., Hormozinejad M., [Physicochemical Characterization of Biopolymer Chitosan Extracted from Shrimp Shells](#). *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **27**: 380-371 (2015).
- [38] dos Santos Z.M., Caroni A.L.P.F., Pereira M.R., da Silva D.R., Fonseca J.L.C., [Determination of Deacetylation Degree of Chitosan: A Comparison between Conductometric Titration and CHN Elemental Analysis](#). *Carbohydr. Res.*, **344**: 2591-2595 (2009).
- [39] Jiang X., Chen L., Zhong W., [A New Linear Potentiometric Titration Method for the Determination of Deacetylation Degree of Chitosan](#). *Carbohydr. Polym.*, **54**: 457-463 (2003).
- [40] Czechowska-Biskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ulański P., Rosiak J., [Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods](#). *Prog. Chem. Appl. Chitin .Deriv.*, **20**: 15-20 (2012).
- [41] Tahtat D., Boutrig H.H., Khodja A.N., Benamer S., Hammache Y., Mahlous M., [The Synergistic Effect of Gamma Irradiation and Alkaline Soaking at Low Temperature on the Pre-Deacetylation of A-Chitin: Optimization by Design of Experiment](#). *Carbohydr. Polym.*, **215**: 39-46 (2019).

- [42] Kasaaı M.R., Arul J., Charlet G., [Intrinsic Viscosity–Molecular Weight Relationship for Chitosan](#). *J. Polym. Sci. . Polym. Phys.*, **38**: 2591-2598 (2000).
- [43] Kucukgulmez A., Celik M., Yanar Y., Sen D., Polat H., Kadak A.E., [Physicochemical Characterization of Chitosan Extracted from Metapenaeus Stebbingi Shells](#). *Food Chem.*, **126**: 1144-1148 (2011).
- [44] Naimian F., Khoylou F., Beteshobabrud R., [The Role of Solvent on Radiation Degradation and Antibacterial Activity of Chitosan against Pectobacterium Carotovorum](#). *Iran. J. Polym. Sci. Technol.*, **23**: 305-310 (2010).
- [45] Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., [Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method](#). *Am J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496 (1966).
- [46] Hafezi Moghaddam R., Dadfarnia S., Shabani A.M.H., Moghaddam Z.H., Tavakol M., [Electron Beam Irradiation Synthesis of Porous and Non-Porous Pectin Based Hydrogels for a Tetracycline Drug Delivery System](#). *Mater. Sci. Eng. C*, **102**: 391-404 (2019).
- [47] Ali Said Al Hoqani H., Hamed Khalifa Al Shaqsi N., Amzad Hossin M., Abdullah Al Sibani M., [Structural Characterization of Polymeric Chitosan and Mineral from Omani Shrimp Shells](#). *Water-Energy Nexus*, **4**: 199-207 (2021).
- [48] Al Shaqsi N.H.K., Al Hoqani H.A.S., Hossain M.A., Al Sibani M.A., [Optimization of the Demineralization Process for the Extraction of Chitin from Omani Portunidae Segnis](#). *Biochem. Biophys. Rep.*, **23**: 100779 (2020).
- [۴۹] غیاث الدین ع.، شجاع الساداتی ع.، واشقانی فراهانی ا.، اصلاح و بهینه سازی فرآیند استخراج کیتین از وست میگو، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۰**(۱): ۹-۱ (۱۳۹۰).
- [50] Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Mohammadifar m.a., Dehghan-Niri M., [Effect of Gamma Irradiation on the Physicochemical and Rheological Properties of Enzyme-Catalyzed Tragacanth-Based Injectable Hydrogels](#). *J. Polym. Eng.*, **39**: 442-449 (2019).
- [51] Gryczka U., Dondi D., Chmielewski A.G., Migdal W., Buttafava A., Faucitano A., [The Mechanism of Chitosan Degradation by Gamma and E-Beam Irradiation](#). *Rad. Phys. Chem.* **78**: 543-548 (2009).
- [52] Negron-Mendoza A., Uribe R.M., Ramos-Bernal S., Camargo-Raya C., Gomez-Vidales V., Kobayashi K., [Calcium Carbonate as a Possible Dosimeter for High Irradiation Doses](#). *Appl. Rad. Isotopes*, **100**: 55-59 (2015).
- [53] Hu X., Tian Z., Li X., Wang S., Pei H., Sun H., Zhang Z., [Green, Simple, and Effective Process for the Comprehensive Utilization of Shrimp Shell Waste](#). *ACS Omega*, **5**: 19227-19235, (2020).
- [54] Dahmane E.M., Taourirte M., Eladlani N., Rhazi M., [Preparation and Characterization of alpha-Chitin Whiskers, Chitosan Nanoparticles and Chitosan Nanoscaffold from Parapenaeus Longirostris](#). *Mater. Today: Proc.*, **3**: 2590-2598 (2016).

- [55] Vicente F.A., Huš M., Likozar B., Novak U., [Chitin Deacetylation Using Deep Eutectic Solvents: Ab Initio-Supported Process Optimization](#). *ACS Sust. Chem. Eng.*, **9**: 3874-3886 (2021).
- [56] Kozma M., Acharya B., Bissessur R., [Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications](#). *Polymers*, **14**: 3989 (2022).
- [57] El-Nesr E.M., Raafat A., Nasef S., Soliman E.-S., Hegazy E.-S., [Chitin and Chitosan Extracted from Irradiated and Non-Irradiated Shrimp Wastes \(Comparative Analysis Study\)](#). *Arab. J. Nucl. Sci. App.*, **46**: 53-66 (2013).
- [58] Dahmane E.m., Taourirte M., Eladlani N., Rhazi M., [Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from Parapenaeus Longirostris from Moroccan Local Sources](#). *Int. J. Polym. Anal. Charac.*, **19**: 342-351 (2014).
- [59] Hisham F., Maziati Akmal M.H., Ahmad F.B., Ahmad K., [Facile Extraction of Chitin and Chitosan from Shrimp Shell](#). *Mater. Today: Proc.*, **42**: 2369-2373 (2021).
- [60] Sodeifian G., Sajadian S.A., Saadati Ardestani N., [Evaluation of the Response Surface and Hybrid Artificial Neural Network-Genetic Algorithm Methodologies to Determine Extraction Yield of *Ferulago Angulata* through Supercritical Fluid](#). *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **60**: 165-173 (2016).
- [61] Sodeifian G., Azizi J., Ghoreishi S.M., [Response Surface Optimization of *Smyrnium Cordifolium Boiss \(Scb\)* Oil Extraction Via Supercritical Carbon Dioxide](#). *J. Supercrit Fluids*, **95**: 1-7 (2014).
- [62] Sodeifian G., Ansari K., [Optimization of *Ferulago Angulata* Oil Extraction with Supercritical Carbon Dioxide](#). *J. Supercrit. Fluids*, **57**: 38-43 (2011).
- [63] Rahman M.M., Kabir S., Rashid T.U., Nesa B., Nasrin R., Haque P., Khan M.A., [Effect of Gamma-Irradiation on the Thermomechanical and Morphological Properties of Chitosan Obtained from Prawn Shell: Evaluation of Potential for Irradiated Chitosan as Plant Growth Stimulator](#). *Rad. Phys. Chem.*, **82**: 112-118 (2013).
- [۶۴] حسن زاده کفشگری م، خرم م، منصوری م، صمیمی ع، بهسازی و تعیین درجه استیل زدایی کیتوزان با روش تیتراسیون پتانسیل سنجی و طیف نمایی زیر قرمز، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، **۳۱(۲): ۱۳-۲۰** (۱۳۹۱).
- [65] García M.A., de la Paz N., Castro C., Rodríguez J.L., Rapado M., Zuluaga R., Gañán P., Casariego A., [Effect of Molecular Weight Reduction by Gamma Irradiation on the Antioxidant Capacity of Chitosan from Lobster Shells](#). *J. Rad. Res. Appl. Sci.*, **8**: 190-200 (2015).
- [66] Moussout H., Ahlafi H., Aazza M., Bourakhouadar M., [Kinetics and Mechanism of the Thermal Degradation of Biopolymers Chitin and Chitosan Using Thermogravimetric Analysis](#). *Polym. Degrad. Stab.*, **130**: 1-9 (2016).
- [67] Teimouri S., Abbasi S., Sheikh N., [Effects of Gamma Irradiation on Some Physicochemical and Rheological Properties of Persian Gum and Gum Tragacanth](#). *Food Hydrocol.*, **59**: 9-16 (2015).

- [68] Bano I., Ghauri M.A., Yasin T., Huang Q., Palaparthi A.D.S., [Characterization and Potential Applications of Gamma Irradiated Chitosan and Its Blends with Poly\(Vinyl Alcohol\)](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **65**: 81-88 (2014).
- [69] Shanmugam A., Kathiresan K., Nayak L., Preparation, [Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan and Phosphorylated Chitosan from Cuttlebone of Sepia Kobiensis](#). *Biotech. Reports*, **92**: 5-30 (2016).
- [70] Kravanja G., Primožič M., Knez Ž., Leitgeb M., [Chitosan-Based \(Nano\)Materials for Novel Biomedical Applications](#). *Molecules*, **24**: 19-60 (2019).
- [71] Bahrapour Z., Peighambaroust S.H., Amini A.M., Soltanzadeh M., [Application of Low-, and Medium-Molecular Weight Chitosan for Preparation of Spray-Dried Microparticles Loaded with Ferulago Angulata Essential Oil: Physicochemical, Antioxidant, Antibacterial and in-Vitro Release Properties](#). *Int. J. Biol. Macromol.* **254**: 126554 (2023).
- [72] Mohammadi P., Taghavi E., Foong S.Y., Rajaei A., Amiri H., de Tender C., Peng W., Lam S.S., Aghbashlo M., Rastegari H., Tabatabaei M., [Comparison of Shrimp Waste-Derived Chitosan Produced through Conventional and Microwave-Assisted Extraction Processes: Physicochemical Properties and Antibacterial Activity Assessment](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **242**: 124841 (2023).
- [73] No H.K., Young Park N., Ho Lee S., Meyers S.P., [Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights](#). *Int. J. Food Microbiol.*, **74**: 65-72 (2002).
- [74] Aktar J., Hasan Z., Afroz T., Rashid H.O., Pramani K., [Application of Gamma Radiation and Physicochemical Treatment to Improve the Bioactive Properties of Chitosan Extracted from Shrimp Shell](#). *Nukleonika*, **62**: 245-251 (2017).
- [75] Lan J., Chen J., Zhu R., Lin C., Ma X., Cao S., [Antibacterial and Antiviral Chitosan Oligosaccharide Modified Cellulosic Fibers with Durability against Washing and Long-Acting Activity](#). *Int. J. Biol. Macromol.*, **231**: 123587 (2023).
- [76] Qian J., Wang X., Chen Y., Mo C., Liang C., Guo H., [The Correlation of Molecule Weight of Chitosan Oligomers with the Corresponding Viscosity and Antibacterial Activity](#). *Carbohydr. Res.*, **530**: 108860 (2023).