



نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیست و نهم، شماره دوم، ۱۳۹۸
۹۱-۱۰۴

<http://jwfst.gau.ac.ir>
DOI: 10.22069/jwfst.2019.16911.1823

استخراج کایتوزان با خلوص و درجه استیل‌زدایی بالا از پوسته میگو

هادی کنعانی^۱، مهدی جنوبی^۲، پیام مرادپور^۳ و غلامرضا رفیعی^۴

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران،

^۲ دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران،

^۳ استادیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران،

^۴ استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۶

چکیده

سابقه و هدف: کیتین و کایتوزان به‌عنوان فراوان‌ترین آمینوپلی‌ساکاریدها در طبیعت، دارای خصوصیتی از جمله زیست‌سازگاری، میزان سمیت پایین، زیست‌تخریب‌پذیری هستند. این خصوصیات منحصر به فرد، موجب شد تا کیتین و کایتوزان توجه زیادی را به‌دلیل پتانسیل بالا، جهت تولید محصولات با ارزش، به‌سمت خود جلب کند. کایتوزان، دارای کاربردهای زیادی در صنعت کشاورزی و حفاظت چوب مانند آفت‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها دارد و همین‌طور در زیست‌پزشکی دارای کاربرد متعددی از جمله استفاده در صنعت داروسازی به‌عنوان رهایش‌دارویی می‌باشد، همچنین می‌تواند به‌شکل حامل‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مقاله استخراج کایتوزان بسیار خالص با درجه استیل‌زدایی بالا از پوسته میگو است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، استخراج و بررسی ویژگی‌های کایتوزان از پوسته میگو پرورشی (*Litopenaeus vannamei*) بررسی شد. بدین‌منظور کایتوزان با استفاده از روش شیمیایی شامل معدنی‌زدایی (با غلظت HCl ۴ درصد)، پروتئین‌زدایی (با غلظت NaOH ۴ درصد) و استیل‌زدایی (با غلظت NaOH ۶۰ درصد) استخراج شد. همچنین، نانو کیتوزان با روش ژلاتین یونی تهیه شد. یکسری پارامترها مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل درجه استیل‌زدایی، وزن مولکولی، pH و حلالیت بودند. همچنین آزمون طیف‌سنجی FTIR، میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)، پتانسیل زتا، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) و پراش پرتو ایکس (XRD) استفاده شدند.

یافته‌ها: نتایج آزمون FTIR روی کیتین و کایتوزان استخراج شده از پوسته میگو نشان داد، حذف مواد پروتئینی، معدنی با به‌کارگیری هیپدروکلریک‌اسید، سدیم‌هیدروکسید مناسب بوده است. درجه بالای استیل‌زدایی کایتوزان در این مطالعه (۸۷ درصد) تأثیر معنی‌داری بر حلالیت مناسب و ویسکوزیته پایین کایتوزان داشت. حلالیت کایتوزان در اسیداستیک ۸۶ درصد به‌دست آمد. وزن مولکولی کایتوزان استخراج شده ۱۱۰ کیلو دالتون می‌باشد. کایتوزان با این وزن مولکولی می‌تواند در صنعت داروسازی کاربرد مطلوبی داشته باشد. با توجه به الگوهای XRD کایتوزان در مطالعات قبلی، پیک‌های به‌دست آمده در الگوهای XRD در این پژوهش ساختار نیمه‌کریستالی کایتوزان را تأیید می‌کند. با توجه به تغییر سطح کایتوزان که در تصاویر FESEM مشاهده شده بود می‌تواند به‌دلیل خالص‌سازی کایتوزان باشد. آزمون FESEM نشان داد قطر نانوکایتوزان ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانومتر است.

*مسئول مکاتبه: mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

نتیجه‌گیری: از نتایج این پژوهش می‌توان دریافت که با استفاده از روش استخراج کایتوزان در این پژوهش، کایتوزان با خلوص بالا و با درجه استیل‌زدایی بالا می‌تواند به‌دست آید. با افزایش درجه استیل‌زدایی، حلالیت کایتوزان افزایش یافته و همچنین این درجه استیل‌زدایی در بهبود وزن مولکولی (وزن مولکولی کم) تأثیر زیادی داشته است. در نتیجه بررسی نقش انحلال‌پذیری کایتوزان در مجاورت استیک‌اسید، این مسأله روشن می‌شود که انحلال‌پذیری کایتوزان و همچنین اندازه ذرات نانو کایتوزان به pH محلول بستگی دارد. کایتوزان تولید شده را می‌توان به‌طور گسترده‌ای در صنایع دارویی مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: پوسته میگو، درجه استیل‌زدایی، کایتوزان، نانوکایتوزان

مقدمه

هر ساله میزان قابل‌توجهی از کل صید جهانی به‌عنوان پسماند و ضایعات فرآوری دور ریخته می‌شوند. از مجموع شیلات جهانی، میزان ضایعات چیزی افزون بر ۲۰ میلیون تن بوده که برابر با ۲۵ درصد کل تولیدات صیادی دریایی می‌باشد (۲۳). این امر، وجود یک پتانسیل عظیم و گسترده را در حوزه فرآورده‌های زیستی دریایی مطرح می‌سازد که قادر است بسیاری از این دورریزها را به تولیداتی ارزشمند تبدیل نماید؛ زیرا این پسماندها و ضایعات، در حالت معمول قابلیت فروش نداشته، اما پس از طی تیمارهایی مجدداً قابلیت کاربری یافته و ارزشمند می‌گردند (۷ و ۲۳). استفاده از مواد تجدیدپذیر جهت تولید ترکیبات زیستی و با ارزش و کاهش ترکیبات دور ریز به یک چالش در تحقیقات اخیر تبدیل شده است (۱). این ضایعات غذایی و شیلاتی ۵۰-۷۰ درصد از وزن ماده خام را تشکیل می‌دهند و دارای ترکیبات با ارزشی هم‌چون کیتین و پروتئین هستند (۳). حدود ۲۰-۳۰ درصد اسکلت خارجی این سخت پوستان کیتین است (۲). بیش از ۴۵ درصد از فرایندهای فرآوری میگو، شامل ضایعاتی هستند که از اسکلت خارجی تشکیل شده و جزء مشکلات مهم محیط زیست به‌شمار می‌آیند. در ایران با توجه به منابع فراوان میگو و خرچنگ در آب‌های جنوبی کشور، صنعت پرورش میگو و فرآوری آن و صنایع

غذایی تولیدکننده غذاهای دریایی، انبوهی از ضایعات به‌صورت سر و پوسته تولید می‌شوند (۱۰).

کیتین به‌عنوان یک پلی‌ساکارید طبیعی از فراوان‌ترین پلیمرهای زیستی بعد از سلولز می‌باشد. که مقدار زیادی در پوسته سخت‌پوستانی مثل خرچنگ و میگو و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود (۱۹). کیتین با فرمول شیمیایی ($C_8H_{13}NO_5$) پلیمر بلندی از n- استیل گلوکزآمین، مشتقی از گلوکز است (۹). امروزه کیتین و شکل استیل‌زدایی آن (کایتوزان) جهت استفاده در داروسازی، کشاورزی، تحقیقات زیست‌پزشکی و تهیه و نگهداری مواد غذایی به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. کیتین کاربرد زیادی را به خصوص در زمینه صنایع پزشکی و دارویی دارد. از مهم‌ترین ویژگی‌هایی که آن را مناسب این کاربردها کرده است می‌توان به سازگاری زیستی بالا، زیست‌تخریب‌پذیری و غیرسمی بودن آنها اشاره کرد (۲۰).

کایتوزان مشتقی از کیتین با فرمول شیمیایی ($C_6H_{11}NO_4$) که از تجزیه جزئی کیتین به‌دست می‌آید. کایتوزان تجاری از اسکلت خارجی بندپایانی مانند میگو استخراج می‌شود. پلیمر طبیعی تشکیل شده از اتصال بتا (۴-۱)- دی گلوکزآمین می‌باشد. تعداد گروه‌های استیل موجود روی زنجیر پلیمر، تفاوت بین این دو پلیمر را مشخص می‌کند (۲۰).

در سامانه‌های دارورسانی کاربرد گسترده‌ای دارند. از آن جمله می‌توان به انتقال داروهای دارای وزن مولکولی کم مانند داروهای ضدسرطان یا انتقال واکسن‌ها و درشت مولکول‌های پروتئینی و DNA اشاره کرد. استفاده از سامانه‌های دارورسانی بر پایه میکروذرات به دلیل امکان پذیر بودن کنترل ساختار فرمول‌بندی و در نتیجه رهایش دارو از آن، بسیار مورد توجه است (۱۸). میکروذرات کایتوزان با ویژگی‌های مناسبی چون بار مثبت سطحی، تهیه آسان، زیست چسبندگی، افزایش زمان اقامت دارو در محل جذب و افزایش نفوذپذیری دارو، کاربرد گسترده‌ای به عنوان حامل دارو در سامانه‌های دارورسانی دارند (۴ و ۱۲).

در سال‌های اخیر برخی از نانوذرات به‌منظور بارگذاری انواع آفت‌کش‌ها مانند: حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها تولید شده‌اند. کایتوزان به دلیل خاصیت ضد قارچی و زیست‌تخریب‌پذیری و همچنین خوراکی بودن آن و با توجه به اهمیت آن برای مقابله با انواع تنش‌ها، می‌تواند در محصولات کشاورزی و همچنین در حفاظت چوب به‌منظور کنترل آفت‌ها و قارچ‌ها کاربردهای وسیعی داشته باشد (۱۵). کاربرد کایتوزان در کشاورزی به‌صورت نانو می‌تواند موثر و کارا باشد. به همین منظور تولید نانو امولسیون‌ها برای کپسول‌دار کردن و کنترل رهایش ترکیبات سودمند داروها بیش‌تر توسعه یافته است. در واقع ساختارهای نانو امولسیونی امکان نانو کپسوله کردن ترکیبات پلیمری را فراهم کرده است.

کایتوزان در صنعت کاغذسازی به‌عنوان پوشش رو کاغذ استفاده می‌شود، که در این حالت سبب افزایش مقاومت کاغذ در برابر رطوبت و پارگی و همچنین کاغذ منعطف‌تر می‌شود. کایتوزان با توجه به خاصیت ضد میکروبی و همچنین افزایش مقاومت کاغذ می‌تواند در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد (۱۳).

کایتوزان بیولوژیک، غیرسمی و زیست‌سازگار و خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی دارد. کایتوزان کاربردهای زیادی در صنایع مختلف مانند کاغذسازی و بسته‌بندی، نساجی، کشاورزی، مهندسی پزشکی و زیست‌پزشکی و داروسازی دارد. یکی از کاربردهای مهم کایتوزان در سیستم دارورسانی به‌صورت نانوذرات، هیدروژل، میکروذره، فیلم و قرص است (۲۳).

اصلی‌ترین پارامترهایی که تأثیر مستقیم بر خواص کیتین و کایتوزان دارند عبارتند از وزن مولکولی، درجه استیل‌زدایی و میزان بلورینگی. برای کاربردهای انسانی از جمله صنایع غذایی، بسته‌بندی و پزشکی علاوه بر موارد بالا، درصد خلوص (محتوای خاکستر تولیدشده)، میزان رطوبت، فلزات سنگین و پروتئین آن از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۴ و ۲۶).

کایتوزان اخیراً در صنعت داروسازی به عنوان یک ماده زمینه برای آزادسازی مورد استفاده قرار گرفته است (۸). همچنین این ماده می‌تواند در سموم کشاورزی و حفاظت چوب به صورت کپسوله شده (حامل سموم آفت‌کش‌ها) مورد استفاده قرار گیرد. کایتوزان‌های پالایش‌شده برای اهداف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند و حتی به‌منظور ایجاد بهترین خواص کایتوزان که خواص ضدسرطانی مفید داشته باشد، کایتوزان باید اصلاح شود (۲۱). کایتوزان به عنوان مواد نگهدارنده ایمنی توسط صنایع دارویی در فرمول‌بندی داروها مورد استفاده قرار گرفته است (۲۴). تاکنون صدها نمونه از کاربردهای کایتوزان در سامانه‌های دارورسانی گزارش شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نانوذرات (۲۲ و ۲۵)، میکروذرات (۲۲)، هیدروژل‌ها (۱۱)، اشاره کرد. نانوذرات کایتوزان با ویژگی‌های مناسبی مانند بار مثبت سطحی، قابلیت انحلال در محیط‌های آبی، زیست چسبندگی، افزایش زمان اقامت دارو در محل جذب و افزایش نفوذپذیری دارو به عنوان حامل دارو

خشکانده شدند. پوسته‌های میگوی خشک شده تا اندازه ۰/۵ تا ۰/۵ میلی‌متر خرد شدند.

معدنی‌زدایی: پوسته میگو با غلظت ۴ درصد HCL در دمای محیط (۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد) با نسبت جامد به حلال ۱ به ۵ (w/v) به مدت ۱۶ ساعت انجام شد و باقی‌مانده توسط آب شهری شسته شد تا pH خنثی شود.

پروتئین‌زدایی: پوسته میگو با ۴ درصد NaOH در دمای محیط (۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد) با نسبت جامد به حلال ۱ به ۵ (w/v) به مدت ۲۰ ساعت انجام شد تا کیتین حاصل گردد. باقی‌مانده NaOH کیتین در آب شیرین شسته شد تا pH خنثی شود.

استیل‌زدایی: کیتین با غلظت ۶۰ درصد NaOH در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با نسبت جامد به حلال ۱ به ۱۰ (w/v) به مدت ۲۰ ساعت انجام شد تا کایتوزان تولید گردد. باقی‌مانده NaOH کایتوزان برای اینکه pH خنثی شود با آب شهری شسته شد. سپس کایتوزان به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک و آماده‌سازی شد.

رنگ‌بری: کایتوزان با هیپوکلریت سدیم (۱۰ گرم) و اسیداستیک (۱۰ گرم) اسید در ۴۰۰ سی‌سی آب مقطر در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم (بن‌ماری) به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد.

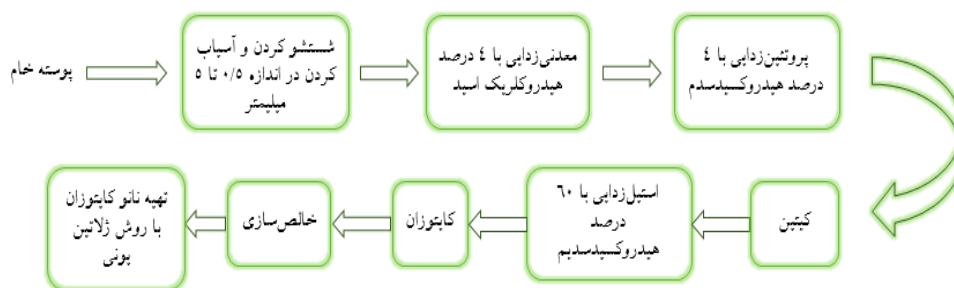
با توجه به موارد فوق الذکر می‌توان بیان کرد با تولید کایتوزان با درجه خلوص بالا در کشور می‌توان از واردات آن از خارج از کشور و همچنین خروج ارز از کشور جلوگیری کرد. بنابراین هدف از انجام پژوهش، استخراج کایتوزان از کیتین با درجه خلوص مناسب در مصارف دارویی، غذایی و صنعتی و همچنین تولید کایتوزان با ویژگی‌های قابل مقایسه با یک برند تجاری پرمصرف است. همچنین قابلیت تولید ذرات نانو از کایتوزان به‌دست آمده از پوسته میگو مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: پوسته میگوی (پرورسی) دریایی وانامی (*Litopenaeus Vannamei*) از شرکت‌های فرآوری میگو در جنوب کشور خریداری شده است.

مواد شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش هیدروکسیدسدیم ۹۸ درصد، هیدروکلریک اسید ۳۷ درصد، اسیداستیک ۹۹/۸ درصد، کلسیم کلرید، تری‌پلی‌فسفات بودند که از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

روش: جهت آماده‌سازی، پوسته‌های میگو را پس از شستشو به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. و سپس به‌منظور میکروبی‌زدایی به مدت ۲۴ ساعت در سود نیم نرمال قرار داده شده و مجدداً در آون با دمای ۶۰ درجه



شکل ۱- طرح‌واره‌ای از استخراج کایتوزان با کاربرد دارویی و تهیه نانو کایتوزان.

Figure 1. Schemes of chitosan extraction with pharmaceutical application and nano-chitosan preparation.

پیک‌های 1655 cm^{-1} و 3450 cm^{-1} که میزان جذب در موج 1655 cm^{-1} (مربوط به گروه کربونیل آمید استیل) و 3450 cm^{-1} (مربوط به گروه هیدروکسی) می‌باشد به‌عنوان تعیین میزان درجه استیل‌زدایی کایتوزان در نظر گرفته می‌شود.

وزن مولکولی: میانگین وزن مولکولی کایتوزان با تعیین ویسکوزیته ذاتی آن و ویسکومتر Brookfield تعیین شد. و بر اساس رابطه زیر، معادله مارک-هویک محاسبه شد.

$$M_v^\alpha K = [\eta] \quad (2)$$

کایتوزان استخراجی با غلظت‌های مختلف ($4/28$ ، $5/7$ و $7/14 \text{ g/dl}$) در حلال اسید استیک $0/1$ مولار تهیه شد. در این معادله، η گرانیروی ذاتی، α و K ضرایب ثابت‌اند (با توجه به نوع حلال) و M_v متوسط حجمی وزن مولکولی پلیمر می‌باشد (در دمای محیط). با داشتن $K=1/81 \times 10^{-5}$ و $\alpha=0/93$ و طبق معادله مارک-هویک وزن مولکولی کایتوزان به‌دست می‌آید (۲۱).

حلالیت کایتوزان: میزان حل شدن کایتوزان در اسید استیک، یکی از علامت‌های کیفیت آن است. کایتوزان با درجه استیل‌زدایی بالا (بیش‌تر از 80%) به‌طور کامل در 1 درصد اسید استیک حل می‌شود. 100 میلی‌گرم کایتوزان و 20 میلی‌لیتر اسید استیک 1 درصد تهیه شد. محلول برای 30 دقیقه در یک همزن مغناطیسی نگهداری می‌شود. نمونه خارج می‌شود و کایتوزان حل نشده از طریق فیلتر کاغذی برداشته شده و وزن می‌شوند (۱۶).

ویسکوزیته: کایتوزان با استفاده از یک ویسکومتر دیجیتال (Brookfield) در دمای اتاق تعیین شد.

آزمون اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR): جهت تعیین گروه‌های عاملی کایتوزان از دستگاه FTIR با مدل Tensor 27، شرکت سازنده

خالص‌سازی: کایتوزان رنگ‌بری شده به ترتیب با نسبت 1 به 100 کایتوزان و اسیداستیک (2 درصد) در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت با همزن مغناطیسی مخلوط شد. سپس به منظور ته‌نشین کردن و برداشت ناخالصی کایتوزان با دور 4500 rpm به مدت 10 تا 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. به محلول کایتوزان حل شده (به همان اندازه‌ی محلول کایتوزان حل شده) سود 1 نرمال اضافه شد و به منظور ته‌نشین سازی کایتوزان حل شده محلول سانتریفیوژ شد. همچنین برای خنثی کردن pH، کایتوزان با آب شسته شد. سپس در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 6 ساعت در آن خشک شد.

تهیه نانو کایتوزان: در این پژوهش برای آماده‌سازی نانو کایتوزان از روش ژلی شدن یونی استفاده شد که یک روش ساده می‌باشد. در این روش ابتدا $0/5$ گرم کایتوزان در 100 میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. سپس با افزودن اسیداستیک 1 درصد pH محلول بین 4 تا 5 تنظیم شد. دمای محلول به 60 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. $0/25$ گرم تری‌پلی‌فسفات در 100 میلی‌لیتر آب مقطر به مدت یک ساعت حل شد و سپس محلول تری‌پلی‌فسفات حاصل به نسبت 1 به 3 به محلول کایتوزان به صورت قطره‌قطره با قطره چکان اضافه شد و برای یک ساعت تحت هم‌زن مغناطیسی با شدت دور 800 rpm قرار داده شد و سپس محلول حاصل خشکانده شد (با خشک‌کن انجمادی).

تعیین خواص کایتوزان

درجه استیل‌زدایی: در این آزمون برای تعیین درجه استیل‌زدایی از روش FTIR استفاده شد. همچنین معادله زیر را برای تعیین درجه‌ی استیل‌زدایی کایتوزان بر اساس آزمون FTIR استفاده شد.

$$DD=100-[(A1655/A3450).100/1.33] \quad (1)$$

و باندهای کششی C-H برای گروه‌های CH_3 و CH_2 در محدوده فرکانسی $2840-2960 \text{ cm}^{-1}$ دارای فرکانس‌های جذبی هستند. همچنین، باند آمیدی دارای دو ناحیه جذبی در 1625 و 1660 cm^{-1} می‌باشد که مربوط به $\text{C}=\text{O}$ (گروه کربونیل) است. به‌طور مشخص، باند 1660 cm^{-1} مربوط به پیوندهای بین مولکولی گروه N-H با گروه کربونیل ($\text{C}=\text{O}$, H-N) و باند 1625 cm^{-1} مربوط به پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی گروه‌های OHCH_2 با گروه کربونیل است ($\text{C}=\text{O}$, HO- CH_2) هرچه درجه استیل‌زدایی شدن کیتین افزایش یابد و به کایتوزان تبدیل شود به همان اندازه شدت این نواحی جذبی کاهش می‌یابد. از دیگر باندهای جذبی کیتین می‌توان به باندهای $1300-1550 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به باند کششی C-N و همچنین $1100-1150 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به باندهای کششی (C-O اشاره کرد) (۱۷).

کایتوزان: با استیل‌زدایی کیتین به‌وسیله سدیم هیدروکسید غلیظ بررسی طیف FTIR نشان می‌دهد که قلیا و گرما باعث حذف اکثر گروه‌های استیل از نمونه کیتین و تولید کایتوزان شده است.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بعد از استیل‌زدایی کردن کیتین طیف IR کایتوزان پیک‌هایی در 3403 cm^{-1} (باند کششی O-H و N-H) و 2901 cm^{-1} (باند کششی N-H) و 1430 cm^{-1} (باند کششی N-H)، 1037 cm^{-1} (O-H) را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر نیز نوارهای جذبی مشابه در 3403 ، 2921 ، 2901 ، 1659 ، 1583 ، 1430 ، 1037 ، 893 و 742 cm^{-1} وجود دارد که ساختار کایتوزان را با توجه به شکل ۲ تأیید می‌کند.

Bruker استفاده شد. در این روش، نمونه کیتین و کایتوزان به شکل قرص مخلوط با پتاسیم‌پرمید آماده‌سازی و سپس در شرایط یکسان از آن‌ها طیف FTIR تهیه شد.

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM): برای بررسی ساختار میکروسکوپی، از میکروسکوپ FESEM با نام TESCAN، مدل Mira two Lmu ساخت کشور جمهوری چک استفاده شد. برای بررسی ساختار میکروسکوپی و اندازه‌گیری ابعاد ذرات تهیه شده از آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) استفاده شد.

آزمون طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX): جهت آنالیز عنصری از دستگاه (EDX) با مدل SAMX ساخت کشور فرانسه استفاده شد.

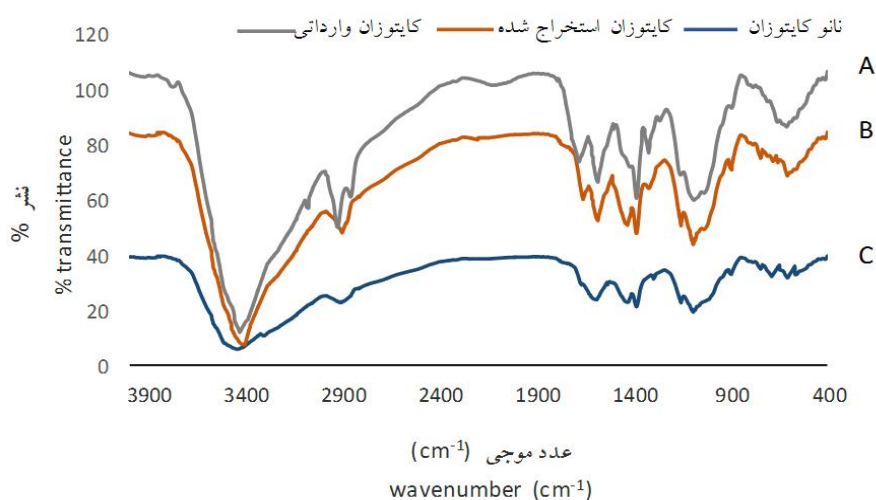
آزمون پراش پرتو ایکس (XRD): از دستگاه پراش پرتو ایکس (XRD) مدل Rigaku ultima IV ساخت کشور ژاپن برای تشخیص بلورینگی کایتوزان استفاده شد.

آزمون پتانسیل زتا: جهت اندازه‌گیری بار سطحی از دستگاه اندازه‌گیری پتانسیل زتا Brookhaven، مدل Omni، ساخت کشور آمریکا استفاده شد.

نتایج و بحث

طیف سنجی FTIR کیتین و کایتوزان

کیتین: در طیف سنجی FT-IR بر روی نمونه کیتین، وجود باندهای جذبی در محدوده 3438 ، 2913 ، 1656 ، 1590 ، 1384 و 1092 بیانگر گروه‌های آمینو استیل و CH-OH موجود در ساختمان کیتین می‌باشد. در کیتین، باندهای کششی N-H در محدوده $3420-3480 \text{ cm}^{-1}$ در O-H، 3400 در محدوده $3450-3480 \text{ cm}^{-1}$



شکل ۲- نمودار طیف FTIR کایتوزان وارداتی (A)، کایتوزان استخراج شده (B) و نانو کایتوزان (C).

Figure 2. FTIR spectrum chart of import chitosan (A) extracted chitosan (B) and nano chitosan (C).

استیل زدایی مختلف در محدوده ۷۵-۸۵ درصد به طور کلی یافت می شود. در این پژوهش پیک های ۱۶۵۹ (مربوط به گروه کربونیل آمید استیل) و ۳۴۰۳ (مربوط به گروه هیدروکسی) به عنوان تعیین میزان درجه استیل زدایی کایتوزان در نظر گرفته شدند. تفاوت بین این دو نقطه، مقدار گروه های آمینو را در زنجیره کایتوزان نشان می دهد که درجه استیل زدایی نامیده می شود. درجه استیل زدایی کایتوزان در این پژوهش ۸۷ درصد می باشد. می توان گفت با توجه به گفته های قبلی این درجه استیل زدایی در حلالیت مناسب و ویسکوزیته پایین کایتوزان در این پژوهش تاثیر مهمی داشته است.

حلالیت کایتوزان: یکی از پارامترهای مهم کیفیت کایتوزان است. چندین عامل بحرانی بر روی حلالیت کایتوزان، از جمله دما و زمان استیل زدایی، غلظت قلیا، نسبت محلول کیتین به قلیا و اندازه ذرات وجود دارد. با این حال، حلالیت عمدتاً با درجه استیل زدایی و وزن مولکولی کنترل می شود. در این پژوهش هم با توجه به درجه استیل زدایی که ۸۷ درصد است، حلالیت کایتوزان ۸۶ درصد به دست آمد. می توان نتیجه گرفت که با افزایش درجه استیل زدایی، حلالیت کایتوزان افزایش می یابد. بهبود حلالیت می تواند باعث افزایش کاربرد کایتوزان در سایر زمینه ها شود. از عامل

نانو کایتوزان: در طیف نانو ذرات کایتوزان نشان داده شده در شکل ۲ (C)، طیف در نواحی بین cm^{-1} ۱۰۰۰-۱۲۵۰ مربوط به تری پلی فسفات است و دو پیک در cm^{-1} ۱۵۶۷-۱۴۱۱ مربوط به گروه خمشی NH_4^+ است و این پیک ها نشان دهنده تشکیل میان کنش بین گروه های فسفات TPP و گروه های آمین کایتوزان اند (۵).

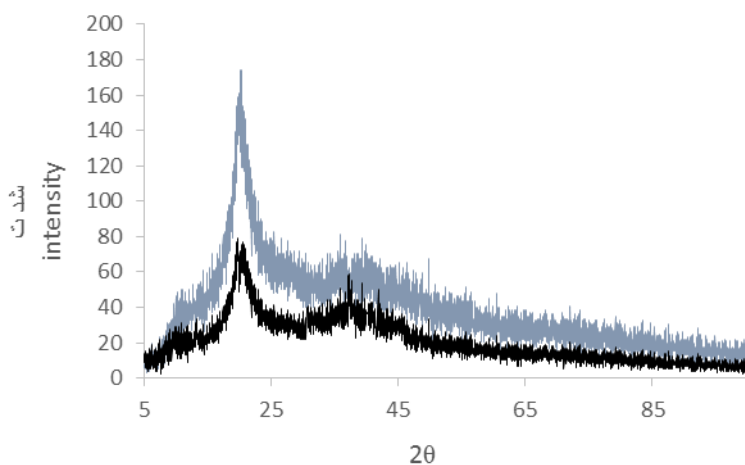
درجه استیل زدایی: نسبت گروه های استیل گلوکوز آمین به گروه های آمین موجود در ساختار کایتوزان را نشان می دهد. درجه استیل زدایی به عنوان مهم ترین ویژگی شیمیایی است که می تواند در عملکرد کایتوزان در بسیاری از موارد کاربرد داشته باشد. علت کاهش مقدار درجه استیل زدایی را می توان به نبود شرایط مناسب برای انجام مرحله استیل زدایی کیتین به کایتوزان نسبت داد. درجه استیل زدایی با توجه به مدت زمان و دمای واکنش، غلظت هیدروکسید سدیم استفاده شده و نوع منبع پوسته کیتینی می تواند متفاوت باشد. درجه استیل زدایی یک پارامتر مهم بر روی حلالیت، واکنش شیمیایی و تجزیه زیستی موثر می باشد. معمولاً درجه استیل زدایی در کیتین کم تر از ۵۰ درصد و در کایتوزان بیشتر از ۵۰ درصد است. کایتوزان تجاری با درجه های

پیک‌هایی در ۱۰ درجه و ۲۰ درجه را نشان می‌دهد. در الگوی پراش اشعه ایکس کایتوزان خالص‌سازی شده پیک‌هایی در ۳۵ درجه تا ۴۵ درجه را نشان می‌دهد که می‌تواند به دلیل خالص‌سازی کایتوزان این پیک‌ها ظاهر شده باشند.

وزن مولکولی: کایتوزان یک زیست‌پلیمر با وزن مولکولی بالا است و بر اساس منبع و همچنین روش‌های آماده‌سازی متفاوت است. به‌طور کلی دمای بالا موجب تخریب کایتوزان می‌شود. به‌عنوان مثال در دمای بالاتر از ۲۸۰ درجه و همچنین اسید مورد استفاده تخریب حرارتی کایتوزان اتفاق می‌افتد و زنجیرهای پلیمر به سرعت می‌شکند و در نتیجه وزن مولکولی کم می‌شود و با توجه به مراحل استخراج کایتوزان که همراه با اسیداستیک و هیدروکلریک اسید است، وزن مولکولی می‌تواند متفاوت باشد. در این پژوهش به منظور تعیین وزن مولکولی کایتوزان از روش ویسکومتری استفاده شد. همچنین از عوامل مؤثر بر انحلال‌پذیری، وزن مولکولی است. تغییر وزن مولکولی ماده، مقدار انحلال‌پذیری آن را در محلول‌های اسیدی نشان می‌دهد. وزن مولکولی کایتوزان متناسب با ویسکوزیته آن است (۲۸).

دیگر مؤثر بر انحلال‌پذیری، می‌توان وزن مولکولی را نام برد. تغییر وزن مولکولی ماده، میزان انحلال‌پذیری آن را در اسیداستیک را نشان می‌دهد. با افزایش وزن مولکولی مقدار انحلال‌پذیری کایتوزان در اسیداستیک کاهش می‌یابد. در نتیجه بررسی نقش انحلال‌پذیری کایتوزان در مجاورت استیک‌اسید، این مسئله روشن می‌شود که انحلال‌پذیری کایتوزان به pH محلول بستگی دارد. به همین دلیل، کایتوزان در pH کم‌تر از ۶ انحلال‌پذیر است. همچنین می‌توان گفت حلالیت پایین‌تر نشان می‌دهد که استیل‌زدایی و پروتئین‌زدایی به صورت ناقص صورت گرفته است.

بلورینگی: که برای تایید ماهیت پودر کایتوزان انجام شده است. الگوی XRD کایتوزان در شکل ۳ نشان داده شده است. الگوی XRD کایتوزان دارای پیک‌های پراکندگی گسترده در ۲ تا برابر است با ۱۰ و ۲۱ درجه که معمولاً مشخصه اصلی کایتوزان نیمه کریستالی است (۶ و ۲۷). پراش‌انت و همکاران در سال ۲۰۰۲ به الگوهای پراش اشعه ایکس رسیدند که دو پیک با مشخصه عمده کایتوزان استخراجی از میگو را در ۹/۹ تا ۱۰/۷ و ۱۹/۸ تا ۲۰/۷ درجه نشان می‌داد (۱۹). در این پژوهش همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود الگوهای پراش اشعه ایکس کایتوزان و همچنین کایتوزان خالص‌سازی‌شده نیز در ۲ تا



شکل ۳- مقایسه طیف‌های پرتو ایکس کایتوزان (بالا) و کایتوزان خالص‌سازی شده (پایین).

Figure 3. Comparison of X-ray chitosan (up) chitosan purified (down).

تری پلی فسفات با گروه‌های آمین پروتونه شده کایتوزان به ترتیب به واسطه پروتئین‌زدایی و ایجاد پیوندهای عرضی یونی می‌تواند واکنش دهند. علاوه بر این یون‌های هیدروکسیل به علت تحرک و پویایی بیش‌تر به‌طور مقدم به گروه‌های آمینوی پروتونه شده کایتوزان می‌پیوندند. وقتی که pH کم‌تر از ۴ باشد، کایتوزان به‌طور کامل حالت پروتونه خود را حفظ می‌کند. از این‌رو گروه‌های آمینوی پروتونه شده کایتوزان از طریق یون‌های تری پلی فسفات با وجود دفعه الکترواستاتیک بین مولکولی قوی به هم اتصال می‌یابند. زمانی که pH محلول واکنش در محدوده ۴ تا ۶ قرار می‌گیرد، یون‌های هیدروکسیل باقی‌مانده تاثیر آشکاری را بر روی درجه پروتونه شدن کایتوزان می‌گذارند و کشیدگی ساختار مولکول کایتوزان کم‌تر خواهد شد که این امر برای تشکیل ساختار ذرات با اندازه کوچک‌تر مورد توجه با افزایش pH از ۲ تا ۴ اندازه نانوذرات تولیدی با شیب زیادی کاهش پیدا می‌کند که به دلیل کاهش درجه پروتونه شدن مولکول‌های کایتوزان بوده و حالت سخت و امتدادپذیر زنجیر مولکولی کایتوزان کاهش یافته و زنجیر مولکولی کایتوزان انعطاف‌پذیر می‌شود. با افزایش pH از ۴ تا ۶ وجود یون هیدروکسیل در محلول آشکار می‌شود، در نتیجه یون‌های تری پلی فسفات با یون‌های هیدروکسیل برای ایجاد پیوند عرضی با گروه‌های آمین کایتوزان در رقابت می‌باشند. در pH های بالاتر از ۶ زنجیر مولکولی کایتوزان به‌طور کامل پروتئین‌زدایی می‌شود و این امر منجر به رسوب و ته‌نشینی کایتوزان خواهد شد (۲۸).

پتانسیل زتا: پتانسیل زتا کایتوزان و کایتوزان خالص‌سازی‌شده اندازه‌گیری شد. پتانسیل زتا کایتوزان مثبت شده است در حالی که پتانسیل زتا

ویسکوزیته ذاتی نمونه‌ی کایتوزان در این پژوهش 0.89 ds/g به دست آمد. با توجه به ویسکوزیته ذاتی به دست آمده، همچنین با قرار دادن در معادله مارک - هوینک وزن مولکولی کایتوزان محاسبه می‌شود، که در این پژوهش وزن مولکولی کایتوزان $110917/48$ دالتون به دست آمد. پائول و همکاران در سال ۲۰۱۴ کایتوزان با وزن مولکولی 159653 گرم بر مول (دالتون) استخراج کردند که آن را مناسب برای داروسازی کرده بود (۱۹). می‌توان گفت کایتوزان با وزن مولکولی بدست آمده در این پژوهش کاربرد مناسبی در داروسازی می‌تواند داشته باشد.

با توجه به غلظت HCl مورد مصرف و دمای استفاده شده برای تهیه کیتین، می‌توان اظهار داشت که زنجیرهای مولکولی پلیمر اولیه یعنی پلی ساکارید مورد انتظار تحت تاثیر هیدرولیز اسیدی قرار می‌گیرند و پیوندهای اتری بین زنجیرها شکسته می‌شود که نتیجه آن کاهش قابل ملاحظه در وزن مولکولی پلیمر استخراج شده می‌باشد، از طرفی فرایند استیل‌زدایی سبب کاهش شدید وزن مولکولی کیتین می‌شود. با وجود اینکه پلی ساکاریدها نسبت به محیط قلیایی مقاوم هستند اما به نظر می‌رسد غلظت بالای ۵۰ درصد سدیم هیدروکسید که در این پژوهش ۶۰ درصد بود موجب شکستن پیوند اتری و کاهش وزن مولکولی پلی ساکارید می‌گردد.

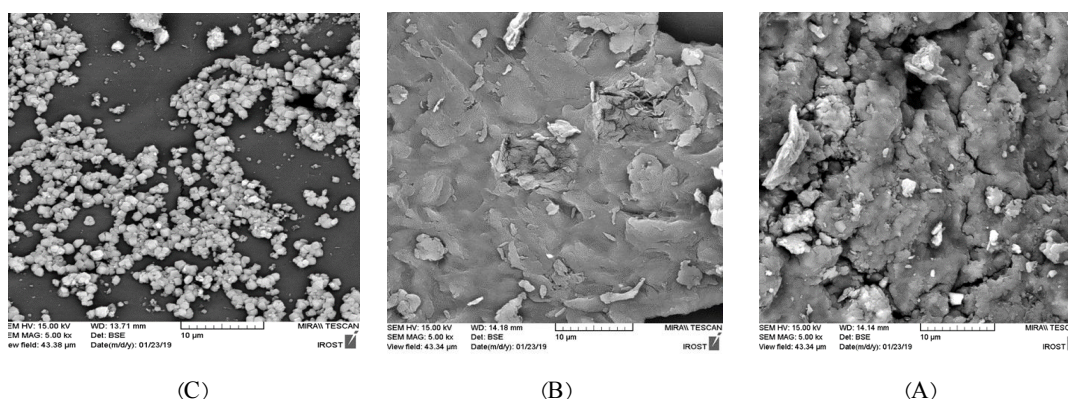
اندازه‌گیری pH: وقتی pH محلول از $4/7$ تا ۸ افزایش پیدا می‌کند درجه پروتونه شدن کایتوزان به سرعت کاهش پیدا می‌کند که بیان‌کننده این امر است که در بالاتر از pH ۶ پروتئین‌زدایی کایتوزان شروع می‌گردد. در pH اصلی محلول تری پلی فسفات ($9/7$) غلظت یون‌های تری پلی فسفات زیاد می‌باشند. عقیده بر این است که یون‌های هیدروکسیل و یون‌های

مربوط به FE-SEM کایتوزان به خوبی سطح صاف این ترکیب و همچنین پراکنش اشکال مختلف و نامنظم در اندازه‌های متفاوت را نشان می‌دهد. ولی در تصویر FE-SEM مربوط به کایتوزان خالص سازی شده به خوبی می‌توان تغییر شکل و همچنین تغییر سطح کایتوزان خالص سازی شده را که زیرتر شده مشاهده کرد. می‌توان نتیجه گرفت که این تغییر شکل به دلیل خالص سازی می‌تواند اتفاق بیافتد.

FE-SEM مربوط به نانوکایتوزان که در شکل ۴ (C) نشان داده شده است یک ساختار هموزن و تقریباً نیمه کروی را در اندازه‌های ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانومتر را نشان می‌دهد، البته در خیلی از مواقع در ساختارهای متراکم دیده می‌شوند، که می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً به خوبی دیسپرس نشده است.

کایتوزان خالص سازی شده شارژ منفی را نشان می‌دهد. این مقدار میانگین پتانسیل زتا نشان‌دهنده خالص سازی موفقیت‌آمیز است؛ به این دلیل که کایتوزان دارای گروه‌های آمینی می‌باشد که مثبت هستند، و همچنین باتوجه به pH کم‌تر نسبت به کایتوزان خالص سازی شده پتانسیل زتا مثبت شده است؛ در حالی که خالص سازی کایتوزان با هیدروکسید سدیم صورت گرفته است، به همین منظور pH بالا می‌رود و همچنین به دلیل گروه‌های هیدروکسیل پتانسیل زتا مقدار منفی را نشان می‌دهد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM): تصاویر FESEM مربوط به نمونه‌های کایتوزان و کایتوزان خالص سازی شده، به ترتیب در شکل ۴ (A) و (B) نشان داده شده است. تصاویر



شکل ۴- تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ FESEM در مقیاس ۱۰ میکرومتر کایتوزان (A)، کایتوزان خالص سازی شده (B)، نانوکایتوزان (C).

Figure 4. The images obtained from the FESEM microscope on a 10-micrometer scale of chitosan (A) chitosan purified (B) nano-chitosan (C).

(۳۸/۲۸)، عنصر نیتروژن (۶/۷۴)، و عنصر هیدروژن (۶/۰۸) در کایتوزان عنصر کلسیم با درصد وزنی ۳/۷۶ را می‌توان بعد از خالص سازی مشاهده کرد، ظاهر شدن عنصر کلسیم می‌تواند به دلیل خالص سازی صورت بگیرد.

طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX): در EDS مربوط به کایتوزان عنصر اکسیژن، کربن، نیتروژن و هیدروژن دیده می‌شود، که درصد وزنی آن‌ها به ترتیب ۴۴/۰۹، ۴۵/۰۱، ۶/۹۵ و ۴/۰۵ می‌باشد. در حالی که در EDS مربوط به کایتوزان خالص سازی شده علاوه بر عنصر اکسیژن (۴۵/۱۴)، عنصر کربن

اسیدی قرار می‌گیرند و پیوندهای اتری بین زنجیرها شکسته می‌شود که نتیجه آن کاهش قابل ملاحظه در وزن مولکولی پلیمر استخراج شده می‌باشد، از طرفی فرایند استیل‌زدایی سبب کاهش شدید وزن مولکولی کیتین می‌شود. با توجه به تغییر سطح کایتوزان که در تصاویر FESEM مشاهده شده بود می‌تواند به دلیل خالص‌سازی کایتوزان باشد. همچنین عنصر کلسیم که به میزان خیلی کم بعد از خالص‌سازی مشاهده می‌شود می‌تواند مربوط به مرحله پروتئین‌زدایی کایتوزان باشد که می‌شود گفت کاملاً کلسیم‌زدایی صورت نگرفته است، که البته این مقدار کلسیم می‌تواند معمول باشد. زمانی که pH محلول بیش‌تر از ۶ می‌رسد، پروتونه شدن مولکول کایتوزان کم‌تر شده و این امر منجر به رسوب و ته‌نشینی کایتوزان خواهد شد، و pH کم‌تر از ۴ باشد کایتوزان به‌طور کامل حالت پروتونه خود را حفظ می‌کند. همچنین با افزایش pH از ۲ تا ۴ اندازه نانوذرات تولیدی با شیب زیادی کاهش پیدا می‌کند. اندازه نانو ذرات ۱۰۰ تا ۱۵۰ نانومتر را نشان می‌داد، که البته با کنترل دقیق دما، pH و همچنین کنترل نسبت محلول کایتوزان و تری‌پلی‌فسفات می‌توانست اندازه نانوذرات بهتر شده و از ۱۰۰ نانومتر کم‌تر شود.

در EDS نانو کایتوزان علاوه بر عناصر کربن (۵۱/۳۱)، اکسیژن (۴۳/۱۸)، نیتروژن (۵/۴) و کلسیم (۰/۰۷)، عنصر فسفات با درصد وزنی ۰/۰۴ دیده می‌شود، با توجه به استفاده تری‌پلی‌فسفات در مرحله تهیه نانو کایتوزان، عنصر فسفات به این دلیل می‌تواند ظاهر شده باشد.

نتیجه‌گیری

با افزایش درجه استیل‌زدایی، حلالیت کایتوزان افزایش می‌یابد. بهبود حلالیت می‌تواند باعث افزایش کاربرد کایتوزان در سایر زمینه‌ها شود. با افزایش وزن مولکولی مقدار انحلال‌پذیری کایتوزان در اسیداستیک کاهش می‌یابد. در نتیجه بررسی نقش انحلال‌پذیری کایتوزان در مجاورت استیک‌اسید، این مسئله روشن می‌شود که انحلال‌پذیری کایتوزان به pH محلول بستگی دارد. می‌توان گفت با توجه به گفته‌های قبلی درجه استیل‌زدایی بیش‌تر در حلالیت مناسب و ویسکوزیته پایین کایتوزان در این پژوهش تاثیر مهمی داشته است. با توجه به غلظت هیدروکلریک‌اسید مورد مصرف و دمای استفاده شده برای تهیه کیتین، می‌توان اظهار داشت که زنجیره مولکولی پلیمر اولیه یعنی پلی‌ساکارید مورد انتظار تحت‌تاثیر هیدرولیز

منابع

1. Abdou, E.S., Nagy, K.S., and Elsabee, M.Z. 2008. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*. 99: 5. 1359-1367.
2. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Shojaosadati, S.A., Dorkoosh, F.A., and Elsabee, M.Z. 2011. Enhancement and characterization of chitosan extraction from the wastes of shrimp packaging plants. *J. Polymer. Environ.* 19: 3. 776-783.
3. Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., and Elsabee, M.Z. 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate polymers*. 77: 2. 410-419.
4. Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P.S., Deepthi, S., Chennazhi, K.P., Ehrlich, H., and Jayakumar, R. 2014. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 39: 9. 1644-1667.
5. Asghari, S.M., Ebrahimi Samamni, S., Seraj, Z., Khajeh, Kh., and Hoseinkhani, S. 2013. Optimization of synthesis of chitosan nanoparticles. *Biotechnology University of Tarbiat Modarres*. 4: 2. 21-29. (In Persian)
6. Bangyekan, C., Aht-Ong, D., and Srikulkit, K. 2006. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*. 63: 1. 61-71.

7. Choudhury, G.S., and Bublitz, C.G. 1996. Computer-based controls in fish processing industry. P 513-538, In: G.S. Mittal (ed), Computerized control systems in the food industry, Marcel Dekker, Inc, New York.
8. Felt, O., Buri, P., and Gurny, R. 1998. Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. Drug development and industrial pharmacy, 24: 11. 979-993.
9. Jiang, X., Chen, L., and Zhong, W. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. Carbohydrate Polymers. 54: 4. 457-463.
10. Hardani, S., Archangi, B., Zolgharnein, H., and Zamani, E. 2018. Optimization of the extraction of chitin and pure chitosan from chitin shell of the species portunus pelagicus and litopenaeus vannamei. Quar. J. Anim. Ecol. 10: 2. 231-238. (In Persian)
11. Khodaverdi, E., Ganji, F., Tafaghodi, M., and Sadoogh, M. 2013. Effects of formulation properties on sol-gel behavior of chitosan / glycerolphosphate hydrogel. Iran. Polymer J. 22:10. 785-790.
12. Kumar, M.N.R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive and functional polymers. 46: 1. 1-27.
13. Li, H., Du, Y., and Xu, Y. 2004. Interaction of cationized chitosan with components in a chemical pulp suspension. Carbohydrate Polymers. 58. 205-214.
14. Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W., and Goosen, M.F. 1992. Applications and properties of chitosan. J. Bioactive Compatible Poly. 7: 4. 370-397.
15. Mahdavi, B., Aghaalkhani, M., and Sharifi, M. 2014. Chitosan improves osmotic potential tolerance in safflower seedlings. Crop Improvement. 25: 6. 728-741.
16. Majekodunmi, S.O. 2016. Current Development of Extraction, Characterization and Evaluation of Properties of Chitosan and Its Use in Medicine and Pharmaceutical Industry. Amer. J. Polymer Sci. 6: 3. 86-91.
17. Mohammed, M.H., Williams, P.A., and Tverezovskaya, O. 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. Food Hydrocolloids. 31: 2. 166-171.
18. Nair, R., Reddy, B.H., Kumar, C.A., and Kumar, K.J. 2009. Application of chitosan microspheres as drug carriers: a review. J. Pharm. Sci. Res. 1: 2. 1-12.
19. Paul, S., Jayan, A., Sasikumar, C.S., and Cherian, S.M. 2014. Extraction and purification of chitosan from chitin isolated from sea prawn Fenneropenaeus indicus. Extraction, 7: 4. 201-204.
20. Pokhrel, S., Yadav, P.N., and Adhikari, R. 2015. Applications of chitin and chitosan in industry and medical science: a review. Nepal J. Sci. Technol. 16: 1. 99-104.
21. Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in polymer science, 31: 7. 603-632.
22. Sadeghi, M., Ganji, F., Taghizadeh, S.M., and Daraei, B. 2016. Preparation and characterization of rivastigmine transdermal patch based on chitosan microparticles. Iran. J. Pharm. Res. 15: 3. 283-294.
23. Sedaghat, F. 2014. Optimization of the extraction of chitin and chitosan from the *Penaeus merguensis* shrimp shell in the Persian Gulf, by chemical and biological methods. Master's dissertation. Hormozgan University. 98p. (In Persian)
24. Sivakumar, S.M., Safhi, M.M., Aamena, J., and Kannadasan, M. 2013. Pharmaceutical aspects of chitosan polymer. In Brief. Res. J. Pharm Tech. 6. 1439-1442.
25. Taghizadeh, S.M., and Javan, R.S. 2010. Dynamic parameters in preparing chitosan nanoparticles with incorporation method using novel drug delivery systems. Science and Technology, 23: 2. 103-110.
26. Tharanathan, R.N., and Kittur, F.S. 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. Crit Rev Food Sci Nutr. 43: 1. 61-87.
27. Yen, M.T., and Mau, J.L. 2007. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. LWT-Food Science and Technology. 40: 3. 472-479.
28. Zahedi, E. 2012. The production of nanoparticles of selective ccsan and the possibility of their application in medicine. Master's dissertation. University of Guilan. 119p. (In Persian)



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 26 (2), 2019

<http://jwfst.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jwfst.2019.16911.1823

Extraction of highly purified chitosan from shrimp shells with high de-acetylation degree

H. Kanaani¹, *M. Jonoobi², P. Moradpur³ and Gh.R. Rafie⁴

¹M.Sc. Graduate, Dept. of Wood and Paper Sciences and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,

²Associate Prof., Dept. of Wood and Paper Sciences and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,

³Assistant Prof., Dept. of Wood and Paper Sciences and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,

⁴Professor, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 05.16.2019 ; Accepted: 07.28.2019

Abstract

Background and Objectives: chitin and chitosan, as the most abundant amino-polysaccharide in nature, have characteristics such as biocompatibility, low toxicity, and biodegradability. These unique specifications have resulted in chitin and chitosan attracting a lot of attention because of the high potential for producing valuable products. Chitosan has many uses in the agricultural industry and wood preservation, such as pesticides and insecticides, as well as in biomedical applications, including the use in the pharmaceutical industry as a drug release, and can also be used as drug carriers. The purpose of this article is to extract highly purified chitosan with high de-acetylation degree from shrimp shells.

Materials and Methods: In this study, the extraction and characterization of chitosan from the shrimp shell (*Litopenaeus vannamei*) was investigated. For this purpose, chitosan was extracted by chemical method including mineralization (with 4% HCl concentration), protein degradation (with 4% NaOH concentration), and deacetylation (with 60% NaOH concentration). Also, nano-chitosan was prepared by ionic gelation method. A series of parameters were studied, which included the degree of deacetylation, molecular weight, pH and solubility. Also, FTIR spectroscopy, FESEM scanning electron microscopy, Zeta potential, X-ray diffraction spectroscopy (EDX) and X-ray diffraction (XRD) were used.

Results: The results of FTIR test on chitin and chitosan extracted from shrimp shell showed that the removal of protein and mineral materials was appropriate with the use of hydrochloric acid, sodium hydroxide. The high degree of deacetylation of chitosan in this study (87%) had a significant effect on the proper solubility and low viscosity of chitosan. The solubility of chitosan in acetic acid was 86%. The molecular weight of the chitosan extracted was 110 kDa. With this molecular weight, chitosan can be used well in the pharmaceutical industry. According to chitosan XRD patterns in previous studies, the peaks obtained in XRD patterns in this study confirmed the semi-crystalline structure of chitosan. Due to the change in the level of chitosan seen in FESEM images, it can be due to the purification of chitosan. The FESEM test confirms nano-chitosan with diameter range of 100 to 150 nm.

Conclusion: From the results of this study, it can be concluded that using the chitosan extraction method in this research, highly purified chitosan with the high de-acetylation degree

*Corresponding author: mehdi.jonoobi@ut.ac.ir

can be obtained. With increasing degree of deacetylation, the solubility of chitosan has increased and this degree of deacetylation has had a significant effect on improving molecular weight (Low molecular weight). As a result of the study of the role of solubility of chitosan in the vicinity of acetic acid, it becomes obvious that the solubility of the chitosan and the size of the nano-chitosan particles depend on the solution pH. The produced chitosan can be used in the wide variety of application mainly in pharmaceutical industry.

Keywords: Chitosan, Degree of deacetylation, Nanochitosan, Shrimp shell