

أمثلة شروط عزل الكيتين من نفايات حراشف الأسماك ذات النوع (Tilapia) بالاعتماد على المعالجة الكيميائية

خالد حب الرمان¹، د. سحر الحريري²، د. إيمان البكري³

1. طالب ماجستير، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
2. الأستاذ المشرف، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.
3. الأستاذ المشرف المشارك، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

يهدف هذا البحث إلى أمثلة شروط عزل الكيتين من حراشف الأسماك (Tilapia)، حيث أُزيلت الأملاح من الكتلة الخام باستعمال محلول HCl 1.5% وفق طريقة النقع، وأزيلت البروتينات باستعمال محلول NaOH 3% بالاعتماد على تقانة الأمواج فوق الصوتية عند 40 °س خلال ثلاثة مراحل معالجة والتي أبدت نتائج أفضل من طريقة النقع، وخاصة فيما يتعلق بكمية البروتينات المُزالة وقيمة الكتلة المسترجعة. وأخيراً أُزيلت الأصبغة باستعمال محلول H₂O₂ 0.36%. بلغ مردود الكيتين 25.47% ودرجة أستلة 92.03% ولوحظ أن هنالك توافق واضح بين طيف FT-IR للكيتين المعزول مع الأطياف المرجعية.

تاريخ الإيداع: 2022/4/23

تاريخ الموافقة: 2022/6/28



الكلمات المفتاحية: الكيتين - إزالة المعادن - إزالة البروتينات - إزالة الأصبغة - درجة الأستلة - معالجة إحصائية.

حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون

بحقوق النشر بموجب

الترخيص

CC BY-NC-SA 04

Optimization of conditions for isolating chitin from fish scale waste (Tilapia) based on chemical treatment

Khaled Hab Alrman¹ , Dr. Sahar Alhariri²

Dr. Iman Al Bakri³

1. Master Student, Department Of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Syria.

2. supervisor, Department Of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Syria.

3. Associated supervisor, Department Of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Syria.

Abstract

This research aims to determine the optimal conditions for isolating chitin from fish scales (Tilapia). The salts were removed from the raw mass using HCl 1.5% solution according to the soaking method. Whereas, the proteins were removed using NaOH 3% solution based on ultrasonication technique during three stages at 40 °C, which provided better results than the soaking method, especially with regard to the amount of proteins removed and the value of mass recovered. Finally, the dyes were removed using H₂O₂ 0.36% solution. The yield of chitin was 25.47%, the degree of acetylation was 92.03%, and it was noted that there was a good agreement between the FT-IR spectrum of isolated chitin with the reference spectra.

Received :2022/04/23

Accepted:2022/06/28



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

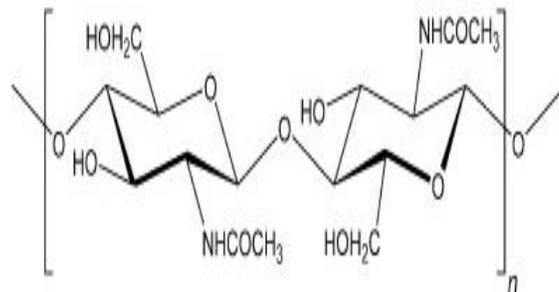
Key Words: Chitin- Demineralization- Deproteinization- Depigmentation- Degree of Acetylation- Statistical Processing.

1. المقدمة:

يتم سنوياً وفي جميع أنحاء العالم إلقاء ملايين الاطنان من مخلفات الأحياء المائية وخاصة من قبل الشركات التي تُنتج المأكولات البحرية [2,1]. تكون هذه النفايات بشكل عام على هيئة قشريات (Crustacean) كقشور السلطعون والجمبري والأسماك... وغيرها [2]. تُسبب هذه النفايات الصناعية الناجمة من المأكولات البحرية مخاطر بيئية كبيرة جداً، وخاصة أنّ هذه المخلفات من أكثر النفايات طرحاً في البيئة، حيث تبلغ كمية مخلفات حراشف الاسماك عالمياً بين (30-80) مليون طن/ سنة [3]، وفي الهند بلغت كمية مخلفات حراشف الأسماك حوالي 125000-150000 طن/ سنوياً [4]، ووصلت في إندونيسيا عام 2015 إلى 10.07 مليون طن [5]. يؤدي تراكم مخلفات الأحياء المائية إلى مشاكل بيئية كبيرة نظراً لبطء تحللها البيولوجي [6]، ولارتفاع قيمة المتطلب الكيميائي للأكسجين (COD) (Chemical oxygen demand) والمتطلب البيولوجي للأكسجين (BOD) (Biochemical oxygen demand)، إضافة لرفع قيم مجموع الكربون الكلي (TOC) (Total organic carbon) ومجموع المواد الصلبة المعلقة (TSS) (Total suspended solids)، وزيادة العوامل المسببة للأمراض [3]، وقد شكلت هذه المخلفات عبئاً بيئياً كبيراً وتحدٍ واضح للعديد من الباحثين حول العالم لاسيما أنّ كمية هذه النفايات تتزايد يوماً بعد يوم [7].

تُعد قشور الأحياء المائية وخاصة حراشف الأسماك أجزاء غير صالحة للأكل ولا تملك أي قيمة غذائية [8]، ولكنها تُشكل مصدراً هاماً وبارزاً لكل من الكيتين [8] والحموض الأمينية والبروتينات [9]. يتم عادة التخلص من هذه المخلفات على هيئة نفايات ويُستعاد منها بنسبة 5% فقط بحيث تُعالج بطريقة ما وتُستعمل كعلف للماشية [10]، وبالتالي فإن الاعتماد على هذه النفايات والاستفادة منها في مجال تطبيقي معين سيكون له العديد من الفوائد سواء على المنحى البيئي أو الاقتصادي أو الاجتماعي.

تُعد حراشف الأسماك من أهم المخلفات الثانوية الناتجة عن الثروة السمكية عند الكثير من الدول وتحتوي عدداً من المكونات العضوية واللعضوية وتتكون بشكل رئيس من: دهون مرافقة للحراشف [8]، وبروتينات بنسبة (30-40) %، وأملاح بنسبة (30-50) %، والكيتين بنسبة (20-30) %، إضافة لوجود بعض الأنواع من الأصبغة [11,2]، وبالنسبة للكيتين فهو من أكثر البوليمرات الطبيعية وفرة بعد السليلوز [12]، ويشكل أحد المكونات الرئيسة للقشرة المتصلبة أو الهيكل الخارجي للحيوانات القشرية عند الأسماك ومفصليات الأرجل (Arthropod) مثل الحشرات، وبعض اللافقاريات (Invertebrates) مثل (سرطان البحر - الجمبري - الجراد) [12]، ويدخل في بنية الجدار الخلوي لكثير من الأحياء الدقيقة وبعض أنواع الفطريات مثل فطر (*Aspergillus Niger*) [2]، وغيرها من المصادر الأخرى. ومن الناحية البنوية فإن الكيتين عبارة عن بولي سكاريد ناتج عن ارتباط الوحدات المونوميرية (β-1,4-N-أسيتيل-D-غلوكوز أمين [12] الشكل (1). ويُعد الكيتين ركيزة أساسية للحصول على مشتقات أكثر أهمية مثل الغلوكوز أمين والكيتوزان [13]، إذ أنّ الكيتوزان (chitosan) هو مشتق الكيتين منزوع الأسيتيل وهو سهل الانحلال [14].



الشكل (1) بنية الكيتين [15].

تتطلب عملية الحصول على الكيتين من قشور الأحياء المائية إلى إزالة كل من الأملاح والبروتينات والأصبغة، إلا أن عملية إزالة كامل البروتينات لا يمكن أن تتم بمرحلة واحدة [16]، وذلك بسبب العدد الكبير من الروابط الهيدروجينية التي تربط بشكل قوي ومتين بين البروتينات والكيتين [17]. يمكن زيادة كمية البروتينات المُزالة من القشور من خلال المعالجة على أكثر من مرحلة (الطريقة المتقطعة) [3,1]، إلا أن هذا الأمر سيكون على حساب مردود الكيتين المُستحصل وخصائصه الفيزيائية والكيميائية (الوزن الجزيئي - درجة الأستلة - درجة التبلور... إلخ). وخاصة أن المعالجة الكيميائية لن تكون انتقائية، لذلك تسعى بعض الدراسات الحديثة إلى تطوير طرائق معالجة أنزيمية لإزالة البروتينات كونها أكثر انتقائية علماً أن هذه الأنماط من المعالجة مازالت على النطاق المخبري [18].

يهدف هذا البحث إلى أمثلة الشروط والعوامل اللازم توفيرها لعزل الكيتين من نفايات حراشف الأسماك (نوع (Tilapia)) والحصول على الكيتين بأفضل مردود وأعلى نقاوة، وذلك بالاعتماد على المعالجة الكيميائية بغية التخلص من المكونات المرافقة للكيتين والموجودة في الكتلة الخام باتباع ثلاث مرحل أساسية وهي: إزالة المعادن والبروتينات والأصبغة. مع السعي أيضاً لعدم تخريب البروتينات المرافقة للكتلة الحيوية ذات القيمة الاقتصادية العالية.

2. مواد البحث وطرائقه

1.2. المواد والأجهزة المستعملة:

- جهاز FT-IR Spectrometer من نوع Bruker طراز Vector 22 أمريكي الصنع، محرك أنابيب vortex (Velp Scientifica) صناعة إيطالية، جهاز الأمواج فوق الصوتية من نوع (Rocker) صناعة تايوانية، ميزان حساس بأربعة مراتب بعد الفاصلة من نوع Precisa 240A صنع في Switzerland، مبخر دوّار (IKA RV 10) صناعة صينية، مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Visible Spectrometer من نوع Optizen 3220 صناعة كورية، مرمدة من نوع (K&H. industries,) (Damascus, Syria)، فرن تجفيف من نوع (LTD,UK).
- حمض كلور الماء (كثافة 1.19 g/ml، 37%) من Paneecac، هيدروكسيد الصوديوم (98%) من Scp Surechem Products، نظامي الهكسان (95%) من Scp Surechem Products، كبريتات النحاس خماسية التميّه (99.5%) من Riedel-de Haën، ماء أوكسجيني (35%) من Riedel-de Haën، طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم رباعية التميّه عالية النقاوة من BDH، مصّل الألبومين البقري (Bovine Serum Albumin) من fluka (نقاوة أعلى من 95%).

2.2. تعيين المحتوى الكيميائي لحراشف الأسماك (Tilapia):

1.2.2. تهيئة الكتلة الخام لحراشف الأسماك (RM) (Raw Mass) والكتلة الخام المجففة (DM) (Dry Mass):

جُمعت نفايات الأسماك (نوع (Tilapia)) من السوق المحلية، وغُسّلت عدة مرات بماء الصنبور بغية إزالة المكونات العالقة وغير المرغوبة مثل الجلد والذيل والزعانف وبقايا الأحشاء. جُففت الحراشف المغسولة بأشعة الشمس لمدة 48 ساعة وخزنت ضمن عبوات محكمة الاغلاق بحيث لا تصلها الرطوبة لحين الاستعمال ورُمزت ب (RM). حُضرت الكتلة الخام المجففة (رُمزت ب (DM)) عن طريق وضع الكتلة الخام (RM) في المجفف عند درجة الحرارة 80°س مع متابعة وزن العينة. تم التأكد من أن زمن 24 ساعة كافٍ لثبات لوزن. (اعتمدت الشروط نفسها ضمن البحث في تجفيف جميع العينات).

2.2.2. تعيين النسبة المئوية للرطوبة M_w % في الكتلة الخام (RM):

جُفّف 0.50 غ من RM وحُسبت النسبة المئوية للكتلة الخام المجففة والنسبة المئوية للرطوبة وفق العلاقتين (1) و (2) على الترتيب [19]:

$$\%W_{DM} = \left(\frac{W_2}{W_1} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\%M_w = 100 - \%W_{DM} \quad (2)$$

تمثل: W_1 وزن RM (غ)، W_2 وزن DM (غ)، W_{DM} النسبة المئوية للكتلة الخام المجففة، M_w النسبة المئوية للرطوبة.

3.2.2. تعيين نسبة الرماد %Ash والمحتوى العضوي الكلي %TOC في (DM):

وُضع 0.50 غ من DM في جفنة خزفية جافة وموزونة بدقة داخل المرمدة لمدة 8 ساعات عند درجة الحرارة 600 °س وتحت الضغط الجوي (اعتمدت الشروط نفسها ضمن البحث في ترميد جميع العينات). حُسبت النسبة المئوية لكلٍ من الرماد (%ash) [17] والمحتوى العضوي الكلي (%TOC) وفق العلاقتين التاليتين (3) و (4) على الترتيب:

$$\%ash = \left(\frac{W_{ash}}{W_{DM}} \right) * 100 \quad (3)$$

$$\%TOC = 100 - \%ash \quad (4)$$

تمثل: W_{ash} وزن الرماد المتبقي، W_{DM} وزن الكتلة الخام المجففة.

4.2.2. تعيين النسبة المئوية للمادة الدسمة في DM "طريقة سكسوليت":

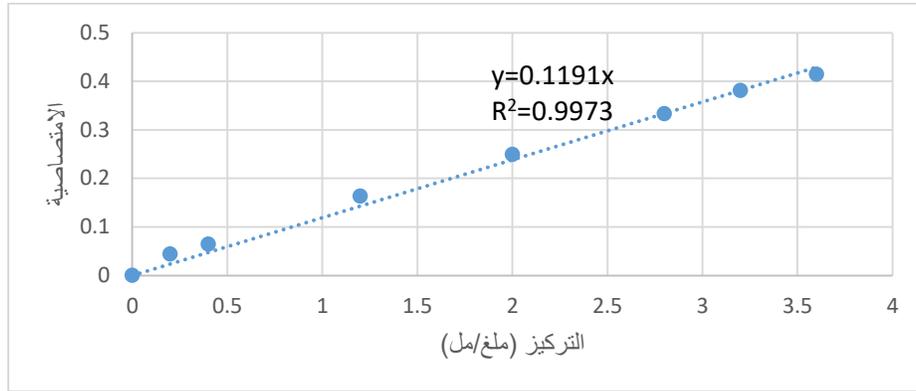
استُخلصت المادة الدسمة من DM وفق طريقة سكسوليت. وُضع 10 غ من DM المطحونة في خرطوشة الاستخلاص واستُعمل نظامي الهكسان كمذيب (200 مل). استمرت عملية الاستخلاص مدة 8 ساعات [20]. بُخر المذيب باستعمال المبخر الدوار وحُسبت النسبة المئوية للزيت (%Oil) وفق العلاقة التالية (5):

$$\%Oil = \left(\frac{W_{oil}}{W_{DM}} \right) * 100 \quad (5)$$

تمثل: W_{oil} وزن الزيت المُستخلص، W_{DM} وزن الكتلة الخام المجففة.

5.2.2. تعيين النسبة المئوية للبروتينات في DM "طريقة البيوريت":

بُغية التعيين الكمي للبروتينات حُصن 100 ملغ من DM المطحونة في 100 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم ذو التركيز 3% (وزن/وزن) مع التعريض للأمواج فوق الصوتية لمدة 60 دقيقة عند درجة الحرارة 40 °س. رُشح الناتج وغُيبت البروتينات الموجودة في الرشاحة القلوية بالاعتماد على طريقة البيوريت وباستعمال مصل الألبومين البقري (BSA) كمحلول معياري. أُخذ 2 مل من الرشاحة البروتينية وأضيف لها 2 مل من كاشف البيوريت وبالإسقاط على السلسلة المعيارية حُدّد تركيز البروتينات [21]. حُضر كاشف البيوريت بوضع 0.37 غ من ملح كبريتات النحاس المائية $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ في دورق معياري سعة 250 مل، وأضيف فوقه 1.5 غ من ملح طرطرات الصوديوم واليوتاسيوم المذابة في 150 مل من الماء المقطر ثم أُضيف وببطيء مع التحريك المستمر 75 مل من هيدروكسيد الصوديوم 10%، واخيراً ثُم حجم المحلول بالماء المقطر إلى 250 مل [22].



الشكل (2): السلسلة المعيارية لمصل الألبومين البقري مع كاشف البيوريت

يُبين الشكل (2) السلسلة المعيارية لمصل الألبومين البقري مع كاشف البيوريت عند طول الموجة 544 نانومتر، إذ حُدثت λ_{max} بإجراء مسح طيفي بين (400-800) نانومتر.

3.2. أمثلة شروط إزالة الأملاح من DM (طريقة النقع) باستخدام HCl:

1.3.2. دراسة أثر تغير تركيز حمض كلور الماء:

نُقع 0.50 غ من DM في محلول HCl وبتركيز (0.5-1-1.5-2-3-4-5) % وبنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة المخبر. رُشحت العينة وغُسلت الراسب بالماء المقطر حتى pH معتدل. جُففت الكتلة المسترجعة وأُخذ وزنها. رُمِدت الكتلة المسترجعة ووزنت ثم حُسبت النسبة المئوية للكتلة المسترجعة وللرماد المتبقي [23].

2.3.2. دراسة أثر تغير الزمن:

نُقع 0.50 غ من DM في محلول HCl (1.5%) وبنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) خلال أزمنة (0.5-1-3-24) ساعة عند درجة حرارة المخبر. رُشح الراسب وغُسل بالماء المقطر حتى pH معتدل. جُففت الكتلة المسترجعة وأُخذ وزنها. رمدت الكتلة المسترجعة ووزنت ثم حُسبت النسبة المئوية للكتلة المسترجعة وللرماد المتبقي [21].

4.2. أمثلة شروط إزالة البروتينات وفق طريقة النقع وتقانة الأمواج فوق الصوتية باستخدام هيدروكسيد الصوديوم:

1.4.2. إزالة البروتينات بطريقة النقع:

نُقع 0.50 غ من DM في محلول NaOH بتركيز (0.3-0.5-1-1.5-2-3-4) % وبنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة المخبر. نُقِل الناتج وحسب تركيز البروتينات الموجودة ضمن الرشاحة القلوية بالاعتماد على طريقة البيوريت (الفقرة 5.2.2). غُسل الراسب بالماء المقطر حتى pH معتدل، ثم جُففت وأُخذ وزنه وعُينت قيمة الكتلة المسترجعة [23].

2.4.2. إزالة البروتينات وفق تقانة الأمواج فوق الصوتية:

1.2.4.2. دراسة أثر تغير تركيز هيدروكسيد الصوديوم:

نُقع 0.50 غ من DM في محلول NaOH بتركيز (0-0.5-1-2-3-4-5) % وبنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) مع التعريض للأمواج فوق الصوتية لمدة 60 دقيقة عند 40°س. نُقِل الناتج وحُسب تركيز البروتينات الموجودة ضمن الرشاحة القلوية بالاعتماد على طريقة البيوريت. غُسل الراسب بالماء المقطر حتى pH معتدل وجُففت ووزن وعُينت قيمة الكتلة المسترجعة [17].

2.2.4.2. دراسة أثر تغير الزمن:

نُقِع 0.50 غ من DM في محلول NaOH تركيزه 3% وبنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) خلال أزمنة (15-30-45-60-75-90) دقيقة مع التعريض للأمواج فوق الصوتية عند 40°س. نُقِل الناتج وحُسب تركيز البروتينات الموجودة ضمن الرشاحة القلوية بالاعتماد على طريقة البيوريت. غُسل الراسب بالماء المقطر حتى pH معتدل وجُفّف وعُيّن قيمة الكتلة المسترجعة [17].

3.4.2. إزالة البروتينات وفق الطريقة المتقطعة (المتتابعة) بالاعتماد على تقانة الأمواج فوق الصوتية باستعمال هيدروكسيد الصوديوم:

بغية رفع نقاوة الكيتين المعزول [3] وإزالة أكبر كمية ممكنة من البروتينات الموجودة في الـ DM، واعتماداً على تحليل نتائج الفقرتين (1.2.4.2) و (2.2.4.2) في تعيين الظروف المثلى لإزالة البروتينات من DM، فقد أُخذت الكتلة المسترجعة والناتجة عن معالجة DM بـ NaOH 3% خلال 45 دقيقة (الفقرة 2.2.4.2) وكررت لها المعالجة بالطريقة نفسها لمرحلتين إضافيتين مع تغير زمن المعالجة واستعمال التركيز 3%. حُدّد زمن المعالجة الأمثل لكل مرحلة على حدة.

5.2. إزالة تصبغ (Depigmentation) الكيتين:

عُولج الكيتين المعزول بالماء الأكسجيني H₂O₂ (0.36%) بنسبة (10/0.5) (وزن/حجم) لمدة 2.5 ساعة مع التحريك المغناطيسي بسرعة 20 (دورة/دقيقة). رُشّحت العينة وغُسلت بالماء المقطر للتخلص من H₂O₂ الفائض. جُفّف الناتج وحُزّن في عبوات جافة محكمة الاغلاق [24].

6.2. توصيف الكيتين:

1.6.2. دراسة طيف FT-IR للكيتين المعزول وتعيين درجة الأستلة (Degree of Acetylation):

سُجّل طيف FT-IR لكلّ من عينة الـ DM وعينة الكيتين المعزولة بعد مراحل المعالجة الكيميائية المتتابعة. إذ جُفّف KBr عند 115 °س لمدة 48 ساعة (حتى وزن ثابت)، ومُزجت العينة مع KBr بنسبة (100:1) (عينة:KBr)، وضغطت على هيئة قرص بالاستعانة بمكبس مناسب ومن ثم أُجري مسح طيفي من (400-4000) سم⁻¹ بمتوسط عدد المسحات (scan) 64 مرة. عُيّن درجة الأستلة (DA) للكيتين الناتج بالاعتماد على علاقة روبرتس (Roberts) (6) □ [25]:

$$DA\% = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) * 100/1.33 \quad (6)$$

تمثل: A₁₆₅₅ و A₃₄₅₀ قيم الامتصاصية العائد لزمرة الأميد I والهيدروكسيل على الترتيب.

7.2. التحليل الإحصائي:

حُسبت المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية والفروق المعنوية بين المتوسطات بمجال ثقة 95% (P=0.05). استعمل برنامج 23 IBM SPSS Statistic لمعالجة النتائج، وهي حزمة برمجية للتحليل الإحصائي وإدارة البيانات. كُريت كل تجربة 3 مرات (n=3) لجميع النتائج.

3. النتائج والمناقشة

1.3. المحتوى الكيميائي للكتلة الخام لحراشف الأسماك (Tilapia) (RM):

يبين الجدول (1) نسبة الرطوبة في الكتلة الخام RM والمحتوى الكيميائي للكتلة المجففة لحراشف الأسماك ذات النوع (Tilapia) (DM). حُسبت النسبة المئوية للكربوهيدرات (%CHO) وفق العلاقة (7) □ [8]:

$$\%CHO = 100 - (\text{الرماد} \% + \text{البروتينات} \% + \text{المادة الدسمة} \%) \quad (7)$$

الجدول (1): المحتوى الكيميائي لحراشف الأسماك (Tilapia).

المحتوى العضوي %	الكربوهيدرات %	المادة الدسمة %	البروتين %	الرماد %	المرجع	
RM في					الرطوبة في RM	حراشف الأسماك
60.58	29.64	0.42 ± 0.04	30.51 ± 0.001	39.42 ± 0.18	8.65 ± 0.47	Tilapia (الدراسة الحالية)
63.94	9.21	0.34 ± 0.12	54.25 ± 0.72	36.06 ± 0.67	13.8 ± 0.004	Nile Tilapia[8]

يُعزى التباين بين نسب مكونات حراشف الأسماك إلى اختلاف نوعية الأسماك المدروسة وموطنها وعمرها وموسم الصيد، وهذا ما أكده (Begum, M) وزملاؤه [26] من خلال دراستهم المحتوى الكيميائي لأنواع مختلفة من الأسماك.

2.3. أمثلة شروط إزالة الأملاح من DM بطريقة النقع ب HCl:

1.2.3. دراسة أثر تغير تركيز HCl:

أظهرت نتائج معالجة إزالة الأملاح من الكتلة الخام المجففة DM باعتماد طريقة النقع لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة المخبر وباستعمال تراكيز متغيرة من HCl (الجدول (2))، أن معالجة DM بتركيز من HCl يزيد عن 1.5% لا يترافق بتزايد معنوي لكمية الأملاح المزالة من الكتلة المُعالجة، وهذا ما أكدته التحليل الإحصائية (اختبار (One Way Anova) برنامج (SPSS)) لنتائج نسبة الرماد المتبقي. كما أظهرت النتائج (الجدول (2)) أن زيادة تركيز الحمض عن 1.5% سيقبل من كمية الكتلة المسترجعة أي سيؤدي زيادة تركيز الحمض إلى تخريب المكونات المهمة (البروتينات والكيتين)، إضافة إلى أن معالجة DM بتراكيز عالية من HCl ستؤثر على الخصائص الفيزيائية والكيميائية للكيتين الناتج [13] (هدف البحث)، علاوة على الأثر البيئي غير المرغوب والتكلفة الاقتصادية الكبيرة على المنحى الصناعي (سواءً التكلفة المادية أو تآكل المفاعلات أو تكلفة معالجة الرشاحة المتشكلة بعد إزالة الأملاح قبل طرحها ضمن المستقبلات المائية (إذا لم يتم الاستفادة منها بطريقة ما)).

الجدول (2): أثر تغير تركيز HCl المستعمل في إزالة الأملاح من DM في نسبة الرماد المتبقي والكتلة المسترجعة

الرماد %	الكتلة المسترجعة %	HCl %
21.74 ^a ± 0.99	78.68 ± 1.03	0.5
2.12 ^b ± 0.062	55.80 ± 1.07	1
0.21 ^c ± 0.073	54.07 ± 0.41	1.5
0.26 ^c ± 0.059	49.41 ± 0.47	2
0.25 ^c ± 0.050	48.71 ± 0.66	3
0.16 ^c ± 0.041	46.95 ± 1.55	4
0.13 ^c ± 0.087	45.85 ± 1.58	5

حيث: اختلاف الأحرف الصغيرة (a,b,c,...) يدل على وجود فروق معنوية بين النتائج لأن $p < 0.05$ وتماثل الأحرف الصغيرة يشير إلى عدم وجود فروق معنوية لأن $p > 0.05$ استناداً إلى SPSS ولهذه الأحرف المدلول نفسه في جميع الجداول الأخرى أينما وردت.

2.2.3. دراسة أثر تغير الزمن:

أظهرت الدراسة الإحصائية "وفق اختبار (One Way Anova) بالاعتماد على برنامج (SPSS) لنتائج دراسة أثر تغير زمن معالجة DM بـ HCl (1.5%) بطريقة النقع عند درجة حرارة المخبر (الجدول (3))، أنّ المعالجة لمدة ساعة واحدة هو زمن كافٍ لإزالة الأملاح من الكتلة المعالجة (DM) (خفض نسبة الرماد المتبقي)، وأنّ زيادة الزمن عن هذا الحد لا يُحقق فروق معنوية تُذكر في خفض كمية الرماد المتبقي والذي لم يتجاوز 0.22%، علماً أنّ زيادة زمن المعالجة لم يؤثر بشكل معنوي على قيمة الكتلة المسترجعة (هدف البحث).

الجدول (3): أثر تغير زمن معالجة DM بـ HCl (1.5%) في نسبة الرماد المتبقي والكتلة المسترجعة

الزمن (ساعة)	الكتلة المسترجعة %	الرماد %
0.5	54.29 ± 0.33	1.40 ^a ± 0.0054
1	54.61 ± 1.85	0.22 ^b ± 0.033
3	54.49 ± 1.22	0.19 ^b ± 0.037
24	54.07 ± 0.41	0.21 ^b ± 0.073

تُشجع نتائج الجدول (3) على التوصية باعتماد طريقة نقع حراشف الأسماك لمدة ساعة بـ HCl (1.5%) بغية إزالة الأملاح المرافقة، حيث لا داعٍ لاستعمال تقانات مكلفة كتنقية الأمواج فوق الصوتية أو حتى الخلط أو التسخين. صرّح (Mahmoud) وزملاؤه [27] عن إمكانية الاستفادة من الرشاحة الحمضية الناتجة عن طريق استبدال حمض كلور الماء بـ حمض الخل أو حمض اللاكتيك وذلك للحصول على منتجات مفيدة (خلات الكالسيوم أو لآكتات الكالسيوم) (مواد حافظة للأغذية) و/أو عوامل إزالة الجليد، وبينوا أنّ هذا الاستبدال لا يؤثر على فعالية إزالة الأملاح من الكتلة المعالجة.

3.3. أمثلة شروط إزالة البروتينات من DM:

1.3.3. إزالة البروتينات من DM وفق طريقة النقع:

1.1.3.3. أثر تغير تركيز NaOH في إزالة البروتينات من DM (النقع):

تُظهر نتائج الجدول (4) أنّ كمية البروتينات المنتقلة إلى الطور المائي والمُزالة من الـ DM بطريقة النقع لمدة 24 ساعة عند حرارة المخبر تتزايد بتزايد تركيز الـ NaOH، إلا أنّ زيادة تركيز NaOH المستعمل في المعالجة يؤدي إلى تناقص واضح في قيمة الكتلة المُسترجعة، مما يعني زيادة الكتلة الضائعة أي زيادة الأثر التخريبي على المكونات الأخرى الموجودة في العينة المدروسة.

الجدول (4): أثر تغير تركيز NaOH في إزالة البروتينات من DM (طريقة النقع) وقيمة الكتلة المسترجعة

%NaOH	البروتين المُزال %	الكتلة المسترجعة %
0.3	0.51 ^a ± 0.018	98.51 ± 1.08
0.5	0.70 ^b ± 0.050	98.31 ± 0.56
1	1.18 ^c ± 0.20	96.39 ± 0.55
1.5	1.96 ^d ± 0.24	93.79 ± 0.46
2	2.88 ^e ± 0.060	87.43 ± 1.23
3	2.89 ^e ± 0.16	72.08 ± 1.64
4	3.09 ^e ± 0.17	45.71 ± 1.37

تُمكن دراسة النتائج المبينة في الجدول (4) من استنتاج أنّ تركيز 2% لهيدروكسيد الصوديوم سيكون مناسباً لإزالة أكبر كمية ممكنة من البروتينات من الكتلة المدروسة (حوالي 2.9%)، مع المحافظة قدر المستطاع على سلامة الكتلة المُسترجعة والتي تحوي الكيتين (هدف البحث).

2.3.3. إزالة البروتينات من DM وفق تقانة الأمواج فوق الصوتية:

1.2.3.3. أثر تغير تركيز NaOH في إزالة البروتينات من DM (الأمواج فوق الصوتية):

يُلاحظ من الجدول (5) أنّ التركيز الأمثل لـ NaOH اللازم لإزالة البروتينات من DM لدى المعالجة باستعمال تقانة الأمواج فوق الصوتية لمدة ساعة عند درجة حرارة 40°س هو 3%، حيث أكدت الدراسة الإحصائية للنتائج (SPSS) أنّ زيادة تركيز الأساس عن هذا الحد لا يؤدي إلى ظهور فروق معنوية تُذكر في قيمة البروتينات المزالة.

الجدول (5): أثر تغير تركيز NaOH في إزالة البروتينات من DM (تقانة الأمواج فوق الصوتية) (1 ساعة - 40°س)

البروتين المزال (غ/100 غ كتلة خام)	NaOH%
0.51 ^a ± 0.036	0
1.02 ^b ± 0.034	0.5
1.30 ^c ± 0.20	1
1.75 ^d ± 0.15	2
3.75 ^e ± 0.15	3
3.46 ^e ± 0.30	4
3.13 ^e ± 0.044	5

2.2.3.3. أثر تغير الزمن في إزالة البروتينات من DM (الأمواج فوق الصوتية):

تُبين نتائج دراسة إزالة البروتينات من DM باعتماد تقانة الأمواج فوق الصوتية واستعمال NaOH (3%) عند 40°س (الجدول (6))، أنّ كمية البروتينات المزالة من الكتلة الحيوية تزداد بزيادة زمن الحضان في حين تتخفّف نسبياً كمية الكتلة المسترجعة، وأنّ الزمن 45 دقيقة هو الزمن الأمثل لإزالة البروتينات من الكتلة المعالجة، وأنّ زيادة زمن المعالجة عن هذا الزمن لن يزيد من نسبة البروتينات المزالة والتي بلغت 3.7% (وهذا ما أكدته المعالجة الإحصائية (SPSS) حيث لم يُلاحظ فروق معنوية تُذكر).

الجدول (6): أثر تغير الزمن في إزالة البروتينات من DM (تقانة الأمواج فوق الصوتية) (NaOH 3% - 40°س)

الزمن (دقيقة)	البروتين المزال (غ/100 غ كتلة خام)	الكتلة المسترجعة (غ/100 غ كتلة خام)
15	1.37 ^a ± 0.074	96.31 ± 0.58
30	2.51 ^b ± 0.32	93.24 ± 1.25
45	3.72 ^c ± 0.092	87.18 ± 1.64
60	3.75 ^c ± 0.15	86.18 ± 3.43
75	3.64 ^c ± 0.11	86.12 ± 1.06
90	3.40 ^c ± 0.12	84.00 ± 3.34

بمقارنة نتائج إزالة البروتينات والكتلة المسترجعة من DM بطريقة النقع وتقانة الأمواج فوق الصوتية باستعمال NaOH (3%)، يُلاحظ تفوق تقانة الأمواج فوق الصوتية على طريقة النقع حيث كانت كمية الكتلة المُسترجعة أكبر وتركيز البروتينات المزالة أعلى. بلغت كمية الكتلة المسترجعة وكمية البروتينات المزالة بتقانة الأمواج فوق الصوتية 87% و3.7% خلال 45 دقيقة على الترتيب (الجدول (6))، في حين بلغت كمية الكتلة المسترجعة من طريقة النقع 72% ولم تتجاوز كمية البروتينات المزالة 2.9% خلال 24 ساعة (الجدول (4)).

فسر (Suryawanshi N) وزملاؤه الكفاءة العالية لتقانة الأمواج فوق الصوتية في إزالة البروتينات من قشور الجمبري بغية استخلاص الكيتين، إلى أن الأمواج فوق الصوتية تزيد من سرعة التفاعل وخاصة ضمن التجايف، إضافة إلى أنها تحسن عمليات النقل الحراري وهذا بدوره يعزز من جودة عملية التنقية للكيتين [17].

4.3. إزالة البروتينات من DM وفق الطريقة المتقطعة (تقانة الأمواج فوق الصوتية):

على الرغم من أن تقانة الأمواج فوق الصوتية قد حققت نتائج أفضل من طريقة النقع ولكن إجراء معالجة واحدة لن تكفي لإزالة كامل البروتينات [16,3]. إضافة إلى إمكانية الاستفادة من البروتينات على هيئة منتج جانبي لا تقل أهميته عن الكيتين.

- **مرحلة المعالجة الثانية:** جُمعت الكتلة المسترجعة الجافة والناجمة عن مرحلة المعالجة الأولى أي عند 45 دقيقة (الزمن الأمثل) وأجري لها معالجة ثانية بتنشيط تركيز محلول هيدروكسيد الصوديوم 3% وتغيير زمن المعالجة وفق تقانة الأمواج فوق الصوتية عند درجة الحرارة 40°س. يُبين الجدول (7) نتائج مرحلة المعالجة الثانية. يُلاحظ من الجدول (7) أن الزمن الأمثل في المعالجة هو 15 دقيقة حسب نتائج SPSS.

الجدول (7): أثر تغيير زمن الحضانة في كمية البروتينات المزالة والكتلة المسترجعة خلال مرحلة المعالجة الثانية (NaOH 3% - 40°س)

الزمن (دقيقة)	البروتين المزال (غ/87.18 كتلة مسترجعة أولى)	الكتلة المسترجعة (غ/87.18 كتلة مسترجعة أولى)
5	0.84 ^a ± 0.17	76.84 ± 0.17
10	1.64 ^b ± 0.22	73.74 ± 0.093
15	2.65 ^c ± 0.093	72.17 ± 0.22
20	2.67 ^c ± 0.22	64.21 ± 0.22
25	2.80 ^c ± 0.039	61.12 ± 0.040
30	2.58 ^c ± 0.14	59.76 ± 0.14
60	2.53 ^c ± 0.10	49.90 ± 0.10

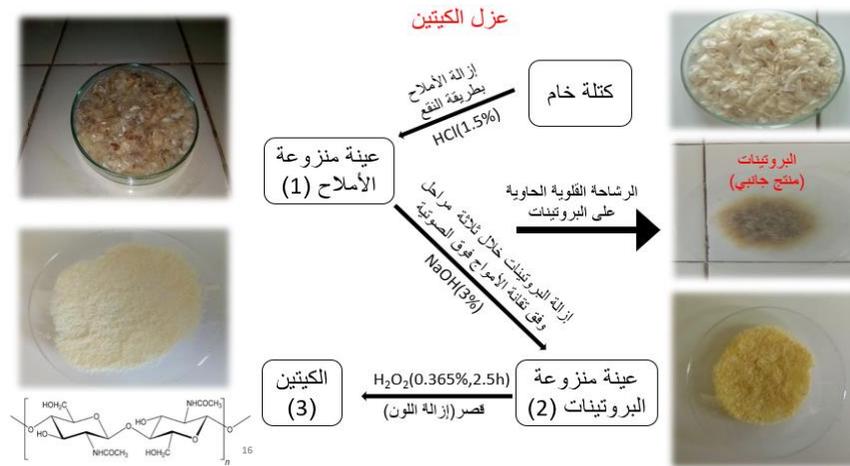
- **مرحلة المعالجة الثالثة:** جُمعت الكتلة المسترجعة الناتجة عن عملية المعالجة الثانية أي عند 15 دقيقة (الزمن الأمثل) وأجري لها معالجة ثالثة بتنشيط تركيز محلول هيدروكسيد الصوديوم 3% وتغيير زمن المعالجة وفق تقانة الأمواج فوق الصوتية عند درجة الحرارة 40°س. يُبين الجدول (8) نتائج مرحلة المعالجة الثالثة. يُلاحظ من الجدول (8) أن الزمن الأمثل في المعالجة هو 15 دقيقة حسب نتائج SPSS.

الجدول (8): أثر تغيير زمن الحضانة في كمية البروتينات المزالة والكتلة المسترجعة خلال مرحلة المعالجة الثالثة (NaOH 3% - 40°س)

الزمن (دقيقة)	البروتين المزال (غ/72.17 كتلة مسترجعة ثانية)	الكتلة المسترجعة (غ/72.17 كتلة مسترجعة ثانية)
5	1.68 ^a ± 0.10	62.99 ± 1.19
15	2.28 ^b ± 0.36	62.89 ± 2.37
30	2.55 ^b ± 0.39	57.95 ± 1.167
45	2.63 ^b ± 0.092	53.51 ± 2.58
60	2.47 ^b ± 0.22	49.79 ± 3.29

5.3. مراحل عزل الكيتين انطلاقاً من الكتلة الخام:

يُبين الشكل (3) الخطوات المتبعة لعزل الكيتين انطلاقاً من حراشف الأسماك الخام ذات النوع (Tilapia)، وقد بلغ مردود الكيتين المعزول بالنسبة للكتلة الحيوية الابتدائية 25.47 %، وهذا المردود أعلى من القيمة المُصرح بها من قبل (Boarin-Alcalde L) وزملاؤه والتي بلغت 20% [8]، وهذا يشير إلى كفاءة عملية الأمثلة وقدرتها في المحافظة على بنية الكيتين من الأثر التخريبي أثناء المعالجة الكيميائية. وتجدر الإشارة إلى أن مرحلة إزالة الأملاح قد سبقت مرحلة إزالة البروتينات وذلك لأن البروتينات الموجودة ضمن بنية حراشف الأسماك تكون على هيئة طبقة تُغلف الكيتين وبالتالي فهي قادرة على حمايته من الأثر التخريبي لحمض كلور الماء المُستعمل لإزالة الأملاح أثناء عملية المعالجة [8].

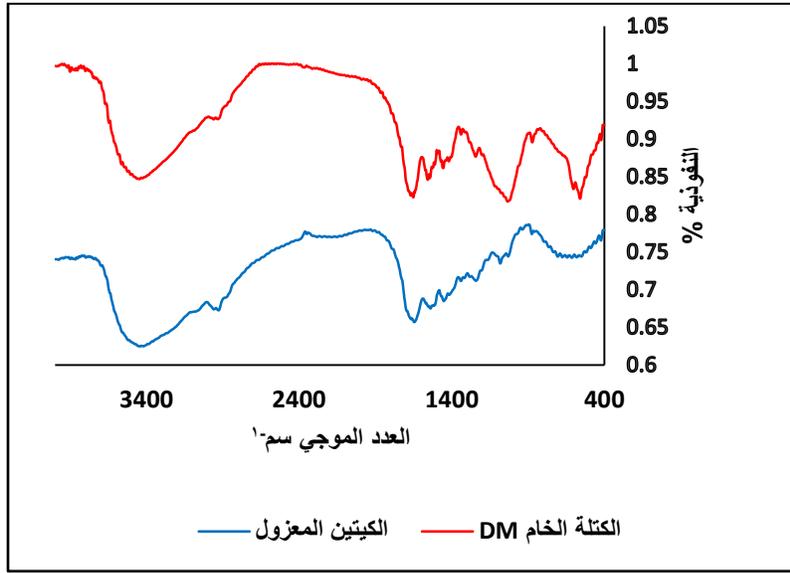


الشكل (3): مراحل عزل الكيتين

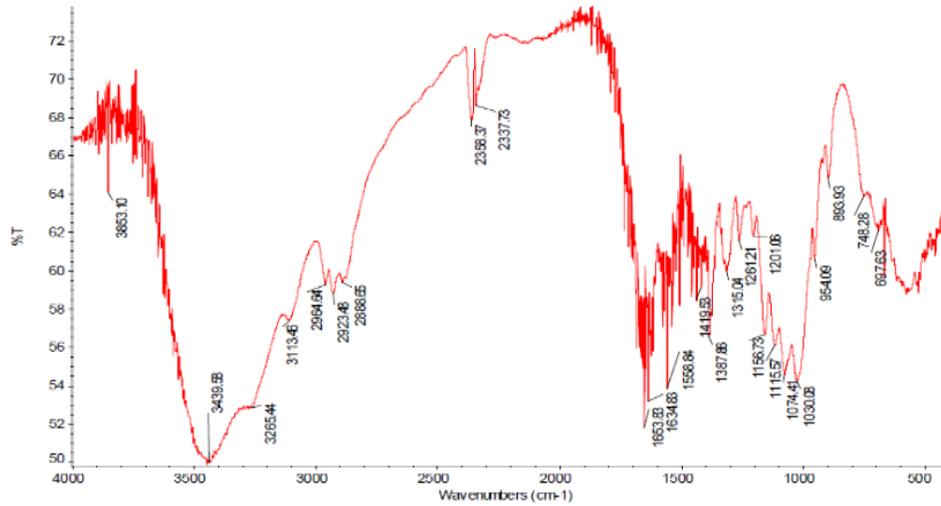
6.3. التوصيف:

1.6.3. طيف FT-IR للكيتين المعزول:

يُبين الشكل (4) طيفي ما تحت الأحمر لـ DM والكيتين المعزول على الترتيب ويُلاحظ اختلاف واضح في كلا الطيفين وخاصة فيما يتعلق بشدة عصابات الامتصاص وموقعها وإن الاختلاف المُلاحظ بين الطيفين يدل على فعالية عملية المعالجة في عزل الكيتين والتخلص من كل من الأملاح والبروتينات، إذ يُلاحظ من طيف DM عدم ظهور عصابات الامتصاص العائدة للزمر الوظيفية المهمة الموجودة في بنية الكيتين بشكل واضح، ويُعزى ذلك إلى أن هذه الزمر الوظيفية وخاصة (C=O, -NH-, -O-H) تحوي أشفاً إلكترونية n تعود للمدارات اللارابطة والتي تكون قادرة على تشكيل معقدات مع أيونات Ca²⁺ الموجودة بصورة رئيسية في الكتلة الخام [28]، إضافة إلى أن البروتينات يمكن أن تشوش الطيف وخاصة أنها تحوي العديد من الزمر الوظيفية المختلفة، ويُلاحظ أن هناك تشابه في مواقع الامتصاص إلى حد التطابق بين طيف FT-IR للكيتين المعزول الشكل (4) مع طيف الكيتين المرجعي الشكل (5) مع انزياح طفيف في مواقع عصابات الامتصاص وهو أمر طبيعي.

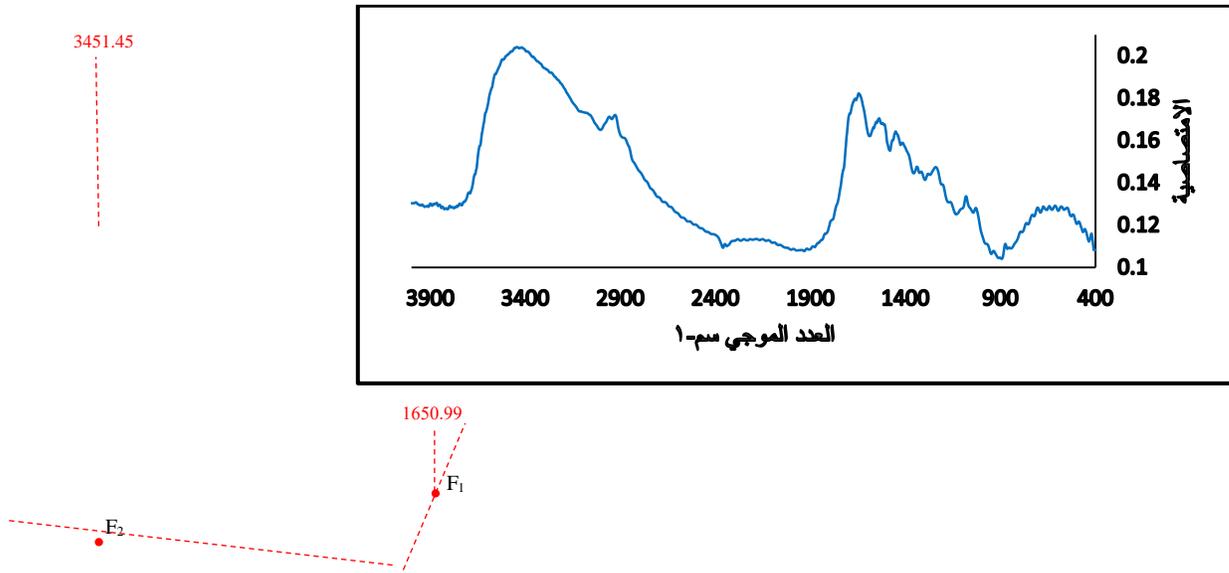


الشكل (4): طيف FT-IR للكيتين وDM



الشكل (5): طيف FT-IR للكيتين [13]

يُبين الجدول (9) قيم أهم عصابات الامتصاص العائدة للزمر الوظيفية الموجودة في بنية الكيتين، ويُلاحظ توافق واضح بين قيم عصابات الامتصاص وشدتها مع ما هو موجود ضمن الأدبيات [7, 13]. بالاعتماد على طيف FT-IR للكيتين المعزول بدلالة الامتصاصية (الشكل (6)) وبتطبيق العلاقة (6) مع الأخذ بعين الاعتبار خط الأساس (base line) يُمكن حساب درجة أستلة الكيتين المُستحصل (DA%) والتي بلغت 92.03% إذ أنّ قيم كل من A_{3450} و A_{1655} هي 0.125 و 0.153 على الترتيب والتي يُمكن تعيينها من خلال اسقاط النقطتين F_1 و F_2 على محور الامتصاصية.



الشكل (6): طيف FT-IR للكيتين بدلالة الامتصاصية

الجدول (9): قيم أهم عصابات الامتصاص للكيتين المعزول

عصابة الامتصاص	العدد الموجي (سم ⁻¹)
امتطاط زمرة الهيدروكسيل O-H	3451.45
امتطاط C-H العائدة لمجموعة -CH ₃	2933.59
انحناء -NH-	1509.22
امتطاط -CN- في مجموعة الأسيت أميد	1456.18
الأميد I	1650.99
الأميد II	1543.94
امتطاط C-O-C لحلقة الغلوكوز أمين	1085.87
امتطاط الرابطة الغليكوزيدية β (4,1)	876.60

4. الاستنتاجات:

- عُزل الكيتين من حراشف الأسماك (Tilapia)، وعُينت الشروط المثلى لاستحصله بغية الحصول على أعلى مردود والمحافظة على بنيته. بلغ مردود الكيتين المستحصل 25.47% مع درجة أستلة 92.03% وهذا ما يشير لكفاءة عملية الأمثلة.
- نجحت طريقة النقع في إزالة الأملاح باستعمال تركيز 1.5% من حمض كلور الماء وكان زمن النقع الأمثل 1 ساعة (حسب نتائج الدراسة الاحصائية (SPSS)).
- تفوقت تقانة الأمواج فوق الصوتية في إزالة البروتينات مقارنة مع طريقة النقع، وذلك من حيث زمن المعالجة (45 دقيقة) وكمية كلٍ من البروتينات المُزالة والكتلة المسترجعة.
- فُصر الكيتين الناتج من مرحلتي إزالة الأملاح والبروتينات بواسطة الماء الأكسجيني بحيث نتج كيتين ذو لون أبيض عديم الرائحة.
- أظهر التحليل الطيفي FT-IR للكيتين المعزول توافق واضح بين طيف الكيتين مع أطيف الكيتين المرجعية وهذا يُشير لكفاءة عملية المعالجة.

المراجع:

1. Faisal, M., Elhussieny, A., Ali, K. A., Samy, I., & Everitt, N. M. (2018, November). Extraction of degradable bio polymer materials from shrimp shell wastes by two different methods. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 464, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
2. Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., & Dutta, J. (2019). Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. *Applied Sciences*, 9(12), 2409.
3. Kumari, S., Rath, P., Kumar, A. S. H., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, 77-85.
4. Vinusha C.V.B, Apr 2019, "Extraction and Characterization of Chitosan from aquatic biowaste, *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, pp. 2217-2220.
5. Irawan, C., Nata, I. F., Putra, M. D., Marisa, R., Asnia, M., & Arifin, Y. F. (2018). Biopolymer of Chitosan from Fish Scales as Natural Coagulant for Iron-Contaminated Groundwater Treatment. *Jurnal Rekayasa Kimia & Lingkungan*, 13(2), 93-99.
6. Durairaj, B., Santhi, R., & Hemalatha, A. (2018). Isolation of chitosan from fish scales of *Catla catla* and synthesis, characterization and screening for larvicidal potential of chitosan-based silver nanoparticles. *DrugInvention Today*, 10(8).
7. Zaku, S. G., Aguzue, S. E. O., & Thomas, S. A. (2011). Extraction and characterization of chitin; a functional biopolymer obtained from scales of common carp fish (*Cyprinus carpio L.*): A lesser-known source. *African Journal of Food Science*, 5(8), 478-483.
8. Boarin-Alcalde, L., & Graciano-Fonseca, G. (2016). Alkali process for chitin extraction and chitosan production from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(4), 683-688.
9. Masood, Z., Yasmeen, R., Haider, M. S., Tarar, O. M., & Hossain, M. (2015). Evaluations of crude protein and amino acid contents from the scales of four mullet species (*Mugilidae*) collected from Karachi fish harbour, Pakistan.
10. Srinivasan, H., Kanayairam, V., & Ravichandran, R. (2018). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *Penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International journal of biological macromolecules*, 107, 662-667.
11. Kumari, S., & Rath, P. K. (2014). Extraction and characterization of chitin and chitosan from (*Labeo rohita*) fish scales. *Procedia Materials Science*, 6, 482-489.
12. Akakuru, O. U., Louis, H., Amos, P. I., Akakuru, O. C., Nosike, E. I., & Ogulewe, E. F. (2018). The chemistry of chitin and chitosan justifying their nanomedical utilities. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 7(241), 2167-0501.
13. Jalal, A. F., Risheed, C. M., & Ibrahim, B. M. (2012). Optimization of chitin extraction from chicken feet. *J. Anal. Bioanal. Tech*, 3(5).
14. DAVIS S.D, March 31, 2011, *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)*, UK ed. Edition.
15. Pérez-Álvarez, L., Ruiz-Rubio, L., & Vilas-Vilela, J. L. (2018). Determining the deacetylation degree of chitosan: opportunities to learn instrumental techniques. *Journal of Chemical Education*, 95(6), 1022-1028.
16. Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W. R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate research*, 303(3), 327-332.
17. Suryawanshi, N., Ayothiraman, S., & Eswari, J. S. (2020). Ultrasonication mode for the expedition of extraction process of chitin from the maritime shrimp shell waste. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (IJBB)*, 57(4), 431-438.
18. Pal, J., Verma, H. O., Munka, V. K., Maurya, S. K., Roy, D., & Kumar, J. (2014). Biological method of chitin extraction from shrimp wastes an eco-friendly low-cost technology and its advanced application. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 1(6), 104-107.

19. Ngo, T. H. D., & Ngo, D. N. (2017). Effects of low–frequency ultrasound on heterogenous deacetylation of chitin. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1604-1610.
20. Mudalip, S. K. A., Yunus, R. M., Embong, A., Abdullah, S., Sulaiman, S. Z., & Man, R. C. (2010, June). Extraction of fish oil from *Parexocoetus brachypterus* (flying fish) via soxhlet extraction method. In *Regional Seminar on Science, Technology and Social Sciences Ms Garden Kuantan* (pp. 1-2).
21. Shrinivas Rao, M., Aye Nyein, K., Si Trung, T., & Stevens, W. F. (2007) Optimum parameters for production of chitin and chitosan from squilla (*S. empusa*). *Journal of applied polymer science*, 103(6), 3694-3700.
22. حمادة، وسيم، (2018)، الاستفادة من مخلفات معاصر بذور القطن لاستحصال مركبات ذات قيمة اقتصادية، أطروحة ماجستير. قسم الكيمياء. كلية العلوم. جامعة دمشق. سورية. 117.
23. Srivastav, A., Mishra, S. S., Debnath, S., & Datta, D. (2018). Extraction and characterization of chitosan from waste scales of *Labeo rohita*. *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research (JETIR)*, 5(6), 540-544
24. Złotko, K., Waśko, A., Kamiński, D. M., Budziak-Wieczorek, I., Bulak, P., & Bieganski, A. (2021). Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and Its Usage to Metal Sorption. *Polymers*, 13(5), 818.
- [Czechowska-Biskup, R., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., & Rosiak, J. M. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 17, 5-20.
25. Begum, M., Mun, M. Z. U. A. M., & Satter, M. A. (2021). Nutritional profiling of selected fish's scales: An approach to determine its prospective use as a biomaterial, *international journal of fisheries and aquatic studies*, 9(3):26-31.
26. Mahmoud, N. S., Ghaly, A. E., & Arab, F. (2007). Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *Am. J. Biochem. Biotechnol*, 3(1), 1-9.
27. Poeloengasih, C. D., Hernawan, H., & Angwar, M. (2008). Isolation and Characterization of Chitin and Chitosan Prepared Under Various Processing Times. *Indonesian Journal of Chemistry*, 8(2), 189-192.