زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 3، ویژه‌نامه 1395

جایگزینی فن‌آوری زیستی به جای روش‌های شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان

یوسفعلی اسدپور-اوصالو*، سیاوش گنجی گلمانخانه
استادیار، مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه

* ارومیه، صندوق پستی 368
Dr.asadpour@outlook.com
(دریافت مقاله: 94/5/25 پذیرش مقاله: 94/12/12)

چکیده- کیتین وکیتوزان دو فرآورده بسیار مهم از پلیمرهای زیستی هستند که در صنایع مصارف بسیار بالایی در صنایع ارزشمند دارند. تبدیل کیتین به کیتوزان با روش استیل‌زدایی و به شیوه ذوب قلیایی است که بدون حضور اکسیژن انجام می‌شود. تغییر ساختار شیمیایی، آلودگی شدید محیط زیست و دپلیمریزاسیون از مشکلات اساسی در صنعت تولید کیتوزان با کیفیت بالا می‌باشند. در این پژوهش برای تبدیل کیتین به کیتوزان به جای مواد شیمیایی از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* سویه (ATHUM-10864)، مولد آنزیم داستیلاز استفاده شد. کیفیت کیتوزان با آنالیزهای تجزیه عنصری دستگاه طیف سنجی مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، تعیین وزن مولکولی، درصد بلوری شدن، رنگ و ساختارمولکولی مشخص شد. نتایج نشان داد که بازده تبدیل کیتین به کیتوزان یا به عبارتی درجه استیل زدائی، در این روش 5±80 درصد است. کیتوزان حاصل دارای 44/4 درصد کربن، 8/9 درصد نیتروژن، 7/2 درصد هیدروژن و 39/5 درصد اکسیژن بود. مختصات فیزیکی ان شامل درصد بلورینگی 94/5 و رنگ آن قهوه ای کمرنگ بود و ساختارشیمیایی هر واحد کیتوزان بصورت ($C_6H_{12}NO_4$) بدست آمد. نتایج نشان داد که جایگزینی روش‌های زیستی به جای شیمیایی در دستیابی به این فرآورده با کیفیت مناسبی امکانپذیر بوده و موجب حذف استفاده از مواد شیمیایی مخرب محیط زیست نظیر هیدروکسیدسدیم غلیظ می‌شود.

کلیدواژگان: سیست، *آرتمیا اورمیانا*، کیتین، کیتوزان، *آسپرژیلوس نایجر*.

1- مقدمه

کیتوزان با فرمول شیمیایی ($C_6H_{12}NO_4$) و با نام علمی پلی (بتا-(1←4)-2-آمینو-2 دی‌اکسی-D-گلوکوپیرانوز)[1]، پس از حذف گروه استیل از کیتین حاصل می‌شود. این ماده برای اولین بار از یک نوع قارچ از خانواده موکور[2] توسط تارت[3] استخراج و شناسایی گردید. در این قارچ کیتین به صورت آنزیمی به کیتوزان تبدیل می‌شود [1]. کیتوزان از پلی ساکاریدهای ازت داری است که با واکنش

[1] Poly [β-(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]

[2] Mucor
[3] Tart

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]

استیل زدائی کیتین به صورت طبیعی ایجاد می‌شود. در این پدیده گروه N– استیل موجود بر روی کربن شماره دو کیتین به گروه آمین (NH2 -) تبدیل می‌شود. کیتوزان، یک بیوپلیمر طبیعی با خواص فیزیکی و شیمیایی کاملاً متفاوت از کیتین است [2]. کیتوزان خاصیت انحلال پذیری در محلولهای رقیق اسیدی و حلال‌های آلی دارد. معمولی‌ترین حلال کیتوزان اسید استیک 1 تا 2 درصد است که تشکیل کمپلکس همگن می‌دهد [3]. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کیتوزان شامل داشتن خاصیت انبساط و کشیدگی شدید، دارا بودن قدرت پالایش بیولوژیکی در طبیعت، غیرسمی و غیر حساسیت‌زا بودن، خاصیت ضد ویروسی و ضد باکتریایی، امکان تشکیل ترکیبات پیچیده با یون‌های فلزی و هیدروکربورهای آروماتیکی، خاصیت ژله‌ای شدن، قدرت بالا در جذب مواد رنگی، ابر جاذب بودن و قابلیت فوق العاده برای تبدیل به مواد و مشتقات متعدد در شرایط مختلف است که این خصوصیات باعث شده که بیشتر از 300 مورد کاربرد از آنها در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، آرایشی، غذایی، تولیدات گیاهی، پالایش آب، پزشکی، کاغذسازی، پالایش فلزات‌سنگین، تغذیه حیوانات، صنایع شیمیایی، نساجی، تولید فیبر و پرتوزدایی به ثبت برسد [4]. کیتوزان بدست آمده از مواد خام مختلف از نظر ساختار شیمیایی و فیزیکی متفاوت بوده و با توجه به نوع منبع اولیه و نحوه فرآوری تا حدودی از نظر خواص، عملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهند [5]. از عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمر، عدم دست‌یابی به ماده اولیه دایمی و فراوان و مشکلات ناشی از افت کیفیت درضمن استخراج با روشهای شیمیایی است [6]. همه ساله درخصوص بهینه‌سازی روشهای عمل‌آوری و بررسی امکان دست‌یابی به روشهای تازه در استخراج کیتوزان تحقیقات فراوانی صورت می‌پذیرد [7]. در این تحقیق برای دست‌یابی به فن‌آوری نوین زیستی، کیتین مستخرج از پوسته سیست آرتمیا برای اولین بار با روش ریستی و با استفاده از آنزیم قارچی داستیلاز مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت. هدف تحقیق جایگزین فن‌آوری زیستی استیل‌زدائی از کیتین بجای روش شیمیایی است که درضمن مشکل آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از تخلیه پساب ماده شیمیایی هیدروکسید سدیم غلیظ درطبیعت که درحین تولید پیش می‌آید نیز برطرف می‌شود.

2- مواد وروش‌ها

2-1- روش تعیین درجه استیل‌زدایی

استیل‌زدایی به مفهوم تبدیل گروه‌های استیل به گروه‌های آمین است. پس از انجام این واکنش درصد گروه‌های N-استیل نسبت به گروه‌های آمین کاهش می‌یابد. لذا اندازه‌گیری درصد گروه‌های آمین، مقدار درجه استیل زدایی را مشخص می‌نماید. در این پژوهش برای تعیین گروه‌های آمین از رابطه:

$$\%N\text{-acetylation}=(A_{1655}/A_{3450})\times 115$$

استفاده شد [8]. در این رابطه حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{3450} گروه استیل و حداکثر باند جذبی مربوط به پیک A_{1655} گروه آمین تعیین شد و بر اساس محورعمودی طیف‌سنجی FTIR، بصورت لگاریتمی مورد محاسبه قرار گرفت.

2-2- روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان

انجام این مرحله شامل تهیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مولد آنزیم طبیعی داستیلاز، کشت اولیه در محیط کشت عمومی قارچ، کشت اسلانت برای تعیین و تست مشخصات قارچ، استخراج آنزیم، انجام عمل استیل‌زدایی با محیط کشت حاوی آنزیم داسیتیلاز قارچی و درنهایت انجام آنالیزهای تشخیص کیفی و کمّی کیتوزان حاصل می‌باشد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]

2-3- تهیه و کشت اولیه قارچ *آسپرژیلوس نایجر*[1]

قارچ *آسپرژیلوس نایجر* مولد آنزیم داستیلاز با شماره کد ATCC 10864 از کلکسیون قارچی گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی- مهندسی دانشگاه تربیت مدرس به صورت کشت اسلانت مادر تهیه گردید. برای انجام کشت اولیه از محیط کشت عمومی بیولایف (Potato Dextrose Agar) استفاده شد. مقدار 10 گرم از این محیط کشت در 200 میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شده و در دمای 121°C به مدت 15 دقیقه در اتوکلاو سترون شد و به پلیت‌ها منتقل گردید. پس از رسیدن به دمای مورد نظر مقدار یک سانتیمتر مربع از اسپورهای اسلانت مادر به محیط کشت منتقل و به مدت سه روز در دمای 35°C گرماگذاری شد [9]. به علت خطرناک بودن امکان گسترش اسپورهای قارچی در محیط آزمایشگاهی، محیط‌های کشت حاوی قارچ هیچگاه در هوای آزاد قرار نگرفت.

2-4- کشت انبوه قارچ برای استیل‌زدایی

برای تهیه محیط کشت انبوه قارچ *آسپرژیلوس* که با تولید آنزیم داستیلاز عمل استیل‌زدائی کیتین را انجام می‌دهد، از محیط کشت اختصاصی این قارچ شامل پپتون 1 درصد، عصاره مالت 2 درصد، گلوکز 2 درصد، منیزیم سولفات آبدار 2 درصد و عصاره مخمر 3 درصد در یک لیتر آب مقطر استفاده شد. میزان یک سانتی متر مربع از کشت روز سوم پلیت قارچ به یک لیتر محیط کشت اختصاصی مایع آن تلقیح گشته و سپس به مدت 48 ساعت به منظور امکان رشد سریعتر و تولید آنزیم بیشتر در دمای 35 °C در شیکر-انکوباتور، گرماگذاری شد [10]. پس از پایان مدت گرماگذاری، برای استخراج و خالص سازی نمونه‌ها، آنزیمها به مدت 30 دقیقه هوادهی شده و با 10 میلی‌لیتر استات سدیم مخلوط گردیدند. محصول بدست آمده با سرعت 4000 دور در دقیقه در دمای 4 °C سانتریفیوژ شد. مایع فوقانی حاصله از سانتریفوژ جدا گردیده و مقدار 20 گرم از پودر کیتین استخراجی از پوسته سیست آرتمیا با روش زیستی، به آن اضافه شد. مخلوط نهایی در دمای 35 °C به مدت 24 ساعت دیگر در شیکر- انکوباتور با دور 180 در دقیقه قرار داده شد. محصول نهایی پس از جداسازی، چند بار با آب مقطر کاملاً شستشو داده شده و در نهایت به مدت 4 ساعت در آون دمای 80°C خشک گردید [11].

2-5- روش تعیین درجه استیل‌زدایی کیتوزان حاصله با روش زیستی

برای تعیین درجه استیل‌زدایی یعنی تبدیل گروه‌های استیل به گروه‌های آمین، از تغییرات باندهای جذبی گروه‌های مذکور در طیف FTIR آنها استفاده شد. ابتدا تغییرات مربوط به پیک‌های A_{1655} و A_{3450} اندازه‌گیری شده و در ادامه از طریق رابطه مایا و دیوید[2] (1992) یعنی معادله $\%N\text{-acetylation}=(A_{1655}/A_{3450})\times 115$، درجه استیل‌زدایی کیتوزان محاسبه گردید [12].

2-6- روش آزمایش تجزیه عنصری (CHNO-analyser)

نمونه‌ها با دستگاه تجزیه عنصری مدل ABB-Bomem مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفتند. برای این منظور یک گرم از نمونه در دمای 80°C خشک و هموژنیزه گردید. سپس نمونه آماده شده در ظرف مخصوص دستگاه از جنس قلع، قرار گرفته و درصد عناصر آن با دستگاه مشخص شد [13].

2-7- روش طیف‌سنجی مادون قرمز

طیف سنجی مادون قرمز با دستگاه ABB-Bomem انجام شد. برای انجام این آنالیز ابتدا مقدار 0/5 گرم از نمونه با

[1] *Aspergillus niger*

[2] Maya and David

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]

پودر برمید پتاسیم مخلوط گشته و درهاون چینی دستی ساییده شد، تا هموژنیزه شود. سپس با کمک دستگاه پرس کننده مخصوص به صورت صفحات شفاف به ضخامت 0/25 میلی‌متری آماده سازی شد. سپس نمونه‌ها در دستگاه قرار گرفته و پس از تنظیمات اولیه مورد آنالیز طیف‌سنجی قرار گرفتند [3].

2-8- روش پرتو نگاری با اشعه ایکس

طیف‌سنجی با پراش پرتوهای ایکس، پس از آماده‌سازی نمونه به صورت قرص‌های 4 میلی‌متری انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا مقدار 3 گرم از کیتین حاصله کاملاً در آون در دمای 80°C به مدت 2 ساعت خشک گردید. سپس نمونه‌ها تا اندازه 25 میکرومتر با دستگاه آسیاب شده و پودر حاصل با نیم گرم پودر اسیدبوریک به عنوان نگهدارنده و مقدار یک گرم موم سی به عنوان ماده هم‌بند به‌خوبی مخلوط گردید. مخلوط حاصل به‌وسیله دستگاه پرس و قالب‌گیر مخصوص به صورت قرص‌های 4 میلی-متری آماده گشته و به دستگاه طیف‌سنج XRD منتقل شد و مورد تجزیه و طیف‌گیری قرار گرفت [۱۴،۱۵].

2-9- روش گرانروی[1]سنجی (ویسکومتری)

تعیین گرانروی کیتوزان استخراج شده توسط دستگاه ویسکومتر، پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تنظیمات دستگاه، انجام شد. حلال مورد استفاده در این روش محلول دی متیل استامید با 5 درصد لیتیم کلراید (LiClDMAC-5%) بود [16].

2-10- روش تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی کیتین براساس معادله مارک- هوینگ (1998) $[\eta]=KM_v^{\alpha}$[2] تعیین شد. در این معادله $[\eta]$ گرانروی و K و α ضرایبی هستند که به وزن مولکولی بستگی ندارند. حلال مورد استفاده برای کیتوزان پوسته سیست در این روش محلول دی متیل استامید به همراه 5 درصد لیتیم کلراید بود که میزان $K=1.4\times10^{-2}$ و $\alpha=0.8$ تعیین گردید. در این معادله K ضریب ثابت تفکیک یونی و آلفا ضریب ثابت مارک-هوینگ حلال مصرفی می‌باشند، که مقادیر آنها از جدول مارک- هوینگ به دست می‌آید [6].

3- نتایج و بحث

با استفاده از عصاره از آنزیم قارچ *آسپرژیلوس* سویه (ATHUM-10864)، مولد آنزیم داستیلاز، به همراه 20 گرم از پودر کیتین در نهایت مقدار1± 15 گرم کیتوزان به دست آمد. راندمان محصول در این روش 5± 80 درصد بود. نتیجه نهایی اینکه قارچ *آسپرژیلوس* قادر به انجام واکنش استیل‌زدایی بوده و تولید کیتوزان با راندمان بالا را امکان پذیر می‌سازد.

3-1- نتایج آنالیز

نتایج آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت روی نمونه تولید شده به شرح جدول‌های 1 و 2 و شکل‌های 1 و 2 به دست آمد .

جدول 1 نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتوزان حاصله از روش زیستی از پوسته سیست آرتمیا

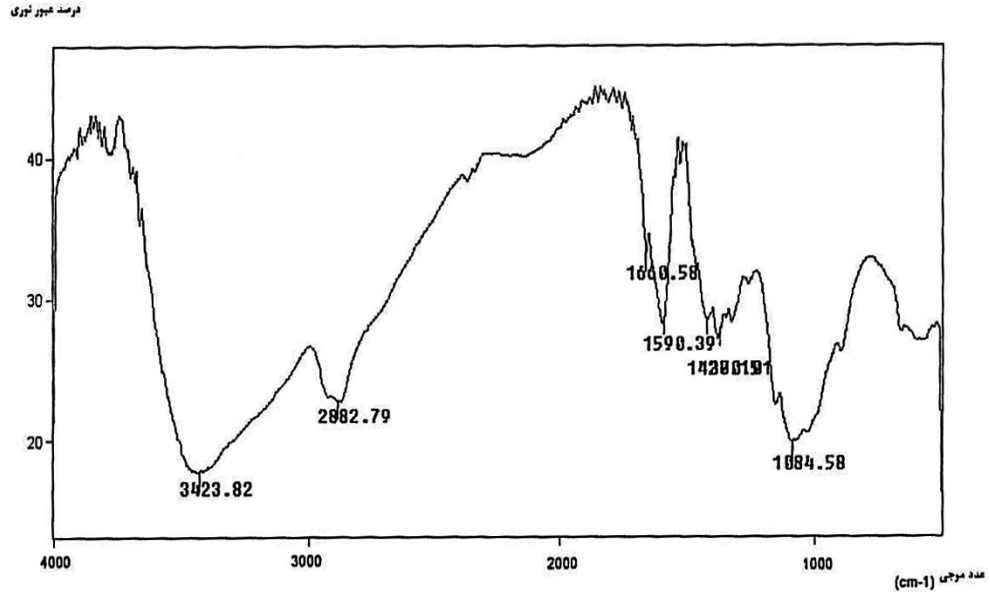
نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
مقدار (%)	44/4	8/9	7/2	39/5

جدول 2 خصوصیات فیزیکی کیتوزان تولیدشده با روش زیستی

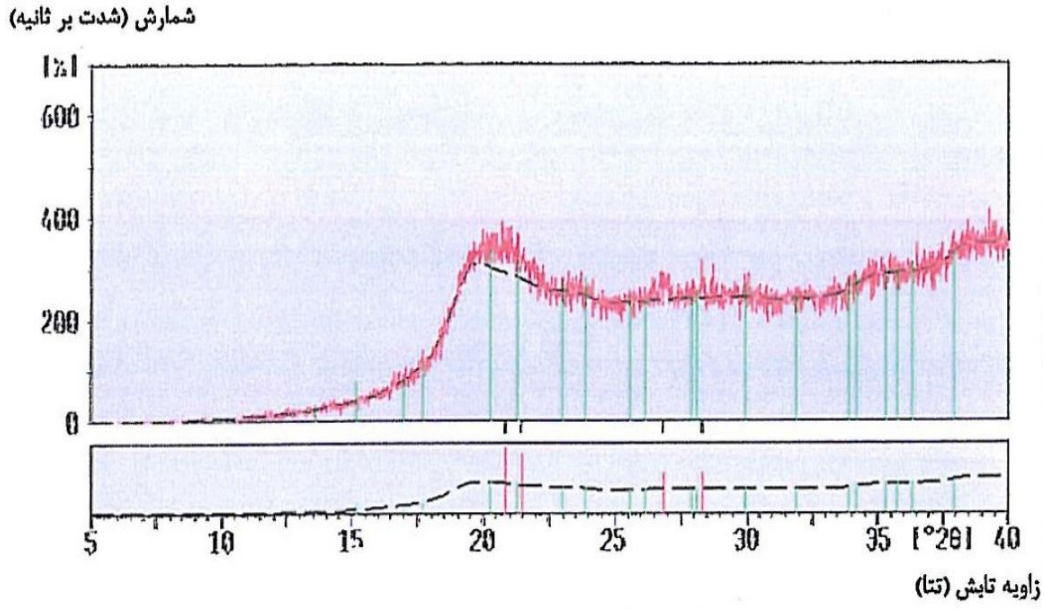
متوسط وزن مولکولی	گرانروی cps	رنگ	درجه استیل‌زدایی D.D.A	درصد بلورینگی
$5/1\times10^5$	18	قهوه‌ای کم رنگ	80±5	90

[1] Viscosity
[2] Mark-Huawink

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]



شکل 1 طیف FTIR نمونه کیتوزان حاصله از روش زیستی



D I F F R A C T I O N L I N E S :

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
9.325	9.47639	9.49971	0.480	55	45	21.4	1.34
19.315	4.59173	4.60302	0.560	256	292	100.0	3.16
26.505	3.36019	3.36846	0.640	23	292	9.0	1.11
29.435	3.03204	3.03950	0.160	81	350	31.6	0.75

شکل 2 طیف XRD حاصله از کیتوزان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]

پیک به دست آمده در 20 تتا، پیک شاخص ساختار بلوری پلیمر کیتوزان بود. حداکثر درصد بلورینگی بدست آمده از جدول پراش اشعه ایکس در پیک 20 تتا، معادل 90 درصد بود.

نتایج آنالیزهای کمی و کیفی محصولات حاصله نشان داد که می‌توان با روش زیستی کیتین را به کیتوزان تبدیل نمود.

2-3- فنون زیستی در تبدیل کیتین به کیتوزان

جایگزینی فنون زیستی به جای روش‌های رایج شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان، سبب حذف آلودگی‌های زیست محیطی شده و بدین ترتیب از تخلیه حجم وسیعی از پساب ماده شیمیایی هیدورکسید سدیم به اکوسیستم ممانعت بعمل می‌آید.

کیتوزان به اشکال مختلف در بسیاری از صنایع داخل کشور ازجمله داروسازی، آرایشی، زیست فن‌آوری پزشکی و غیره مصرف می‌شود. تولید این فراورده از پوسته سیست آرتمیاو براساس فنون بیولوژیکی می‌تواند جایگزین مناسب نوع مشابه وارداتی آن شود.

ساختار شیمیایی هر مونومر کیتوزان بدست آمده در این تحقیق، بصورت $(C_6H_{12}NO_4)$ تعیین گردید که همخوانی آن با ساختار مندرج در منابع استاندارد آلدریج و سیگما $(((C_6H_{11}NO_5)n)$، بیانگر موفقیت در تولید این محصول با فن‌آوری زیستی می‌باشد.

4- جمع‌بندی نتایج

بر اساس آنالیزهای تجزیه عنصری با دستگاه طیف سنج مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، ویسکومتری، رنگ سنجی، تعیین درصد بلورینگی و تعیین درجه استیل زدائی، تمامی خصوصیات ت کیفی و کمی کیتوزان بدست آمده در این پژوهش با نوع مشابه بدست آمده از پوسته میگو و پوسته خرچنگ، در مطالعات پیشین برابری می‌کرد [17]. مقایسه یافته‌های آرسیدیاکونو[1] و همکارانش [17] که راندمان 80 درصدی کیتوزان از کیتین را اعلام نمودند با نتایج تحقیق حاضر، بیانگر موفقیت در این پژوهش از یک منبع جدید می‌باشد.

در تبدیل کیتین به کیتوزان به جای روش‌های شیمیایی می‌توان از روش زیستی استفاده کرد و آنزیم داستیلاز طبیعی مترشحه از کشت مایع قارچ *آسپیرژیلوس نایجر*، می‌تواند جایگزین روش‌های رایج شیمیایی در تبدیل کیتین به کیتوزان باشد. در این حالت، بکارگیری روش زیستی به جای روش‌های شیمیایی مانع از بروز پدیده‌های واسرشتگی و دپلمریزاسیون یا تغییر ماهیت ناشی از تأثیر مستقیم هیدروکسید سدیم شده و افزایش کیفیت محصولات استخراج شده را درپی دارد.

باتوجه به اینکه بیشترین کاربرد کیتوزان مربوط به مشتقات آن است و کیفیت در کاربرد آنها نقش اساسی دارد، روش زیستی تبدیل کیتین به کیتوزان در مقایسه با روش‌های رایج شیمیایی نتیجه مطلوب‌تری به دنبال داشته است. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که برای افزایش کیفیت، کیتین تجاری وارداتی با روش زیستی به کیتوزان تبدیل گردد که ضمن افزایش کیفیت، می‌تواند رفع مشکلات زیست‌محیطی این پلیمر را نیز به دنبال داشته باشد.

5- سپاسگزاری

این پژوهش براساس طرح مصوب سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی به شماره مصوب 2-79-12-92149 و به شماره ثبت 47668 مورخه94/6/12 به انجام رسید. بدین وسیله از همکاری مرکز آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشکده شرکت نفت، پژوهشگاه پلیمر،

[1] Arcidiacono

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]

موسسه علوم تحقیقاتی شیلات ایران و مرکز تحقیقات آرتمیای کشور نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید .

6- منـابع

[1] Knapczyk, J. (1993) Excipient ability of chitosan for direct tableting. International journal of pharmaceutics, 89(1): 1-7.

[2] Araki Y, Ito E. (2007). "A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii* enzymatic de-acetylation of chitin" *Bichem. Biophy*. Res 56: 669-45.

[3] Charles, J. Pouchert. (2011) The Aldrich Library of Infrared Spectra. Edi, III: 1867 p.

[4] تهامی م. و تهامی، م. (1374). استخراج کیتین از پوسته خرچنگ، میگو، لابستر. گزارش نهائی، مرکز تحقیقات شیلات بندر عباس.

[5] Shahidi, F. and Arachechi, J.K. (2010) Food applications of chitin and chitosans, Elsevier J.FoodScie Tech., 10: 37-51.

[6] Hein, S., Chuen, N., Chandrkrachang, S. and Stevens, F. (2001) A systematic approach to quality assessment system of chitosan, in Asian Institute of Technology Internetpdf.http://ww.Southrnblue. Com/chitosan» Bangkok. 6.

[7] In Euro. Commission. Supported. STD-3 projects (1992-1995), Internet, pdf«http://user. Chollian.net/~Chitin/», 5.

[8] Park, O., Hiroshi, M., Watanabe, J. and Thoru, C. (2000) Method for preparing chitosan. U.S. Patent Documents, 5(232): 842, 7. [13] Peberdy, J.F. (2010) Biotechnological approaches to the total utilization of crustacean shellfish waste.

[9] Susana, L., Ronan, D., Shamlou, P.A. and Dunill, P. (2000) Biochemical engineering approaches to the challenges of Producing Pure Plasmid DNA. Trends in biotechnology, 18(7): 296-305.

[10] Simpson, B.K., Gange, N. and Simpson, M.V. (2000) Bioprocessing of Chitin and Chitosan". In Fisheries Processing; Biotechnological Appliations, (Martin, A.M.ed), Published in 1994 by Chapman and Hall, London, UK, 154173.

[11] Pinado, J. and Pastrana, L. (2011) Different strain of Aspergillus niger grown on an effluent" Biotechnology letters, 15 (11): 1157-1162.

[12] Maya, E. and Davis, M.J. (1992) Defense Response in slash pine: chitosan- treatment alters the abundance of specific mRNAs. In Molecular plant-microbe interactions, 10(1): 135-137.

[13] Laidter, K.J. (1973) The Chemical kinetics of NaOH action. 2nd , ed, Oxford, New York.

[14] Claus, J.W. (2000) Biobased packaging materials for the food industry. in Dairy and Food Science, Biopolymers, (ISSN 87-90504070) Denmark, 13-40.

[15] Knorr, D. (2000) Recovery and utilization of Chitin and Chitosan in food processing waste management. Food Technology, 45: 115-127.

[16] Bluestone M, Devey K, Shindoda S. 2008. Stop, don't throw those shells away an industry is growing around chitin." In Shellfish polymer, Buines week, March, 32: 70.

[17] Arcidiacono S, Lombardi S J, Kaplan D K. (2010). Fermentation, Processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii* in chitin and chitosan, (eds Skjak-Brake G, Anthonsen T, Sanford T.). Elsevier Applied science, New York. 319.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-03-14]