نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳٤، بهـار ۱٤۰۱
ص‌ص: ۹۱~۱۰۲

آنالیز تقریبی و تعیین میزان کیتین در برخی حشرات قابل استفاده در تغذیه طیور

- **مهدی امیرصادقی** (نویسنده مسئول)
استادیار مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- **امیرحسین علیزاده قمصری**
استادیار مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت : تیر ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۴۰۰
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۳۷۲۳۱۸۰
Email: m.amirsadeghi@areeo.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2021.343635.2080

چکیده

امروزه علاقه وافری برای استفاده از حشرات در تغذیه دام و طیور وجود دارد. تمامی حشرات اسکلت خارجی می‌سازند که بر پایه کیتین است. تعیین مقدار دقیق کیتین در حشرات به دلیل کاربرد این ماده در صنایع مختلف و گوارش اندک در اکثر گونه‌های دامی، ضروری است. با توجه به ساختار کیتین و نامحلول بودن آن در حلال‌های رایج، اندازه‌گیری مقدار این ترکیب اغلب دشوار و به صورت تخمینی انجام می‌گیرد. در این پژوهش، دو روش مختلف برای اندازه‌گیری میزان کیتین حشرات، مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت. آزمایش با استفاده از شش نمونه مختلف حشره شامل لارو سوسک شب‌زی (میل‌ورم) (*Tenebrio molitor*)، جیرجیرک (*Gryllodes sigillatus*)، زنبور عسل (*Apis mellifera meda*) و سه واریته ۳۱، ۵۱ و ۱۰۷ کرم ابریشم (*Bombix mori*) انجام شد. در روش اول، میزان کیتین با استفاده از اندازه‌گیری فیبر نامحلول در شوینده اسیدی تخمین زده شد. در روش دوم، میزان کیتین با روش خالص‌سازی شیمیایی اندازه‌گیری شد. مقدار کیتین اندازه‌گیری شده با روش خالص‌سازی شیمیایی برای نمونه زنبور عسل، ۰/۰۷۱ ±۱۲/۰۵، میل‌ورم، ۰/۲۵۹±۸/۱۸، جیرجیرک، ۰/۱۰۷±۷/۷۹ و برای سه واریته کرم ابریشم به ترتیب ۰/۰۵۸±۷/۹۲، ۰/۰۹۱ ±٤/۹۳ و ۰/۱۱٦ ±٦/۰۸ درصد برای واریته های ۳۱، ۵۱ و ۱۰۷ بود. با توجه به مقدار بیشینه توصیه شده کیتین در خوراک طیور در سطح ۷ گرم در کیلوگرم و نیز تاثیر کیتین در محاسبه پروتئین کل، تعیین مقدار کیتین حشرات قبل از مصرف در جیره ضروری است و بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، استفاده از روش خالص‌سازی شیمیایی جهت تعیین میزان کیتین حشرات، پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: حشرات، کیتین، خالص‌سازی شیمیایی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 134 pp: 91-102

Approximate Analysis and Determination of Chitin Content in Some Insects Used In Poultry Nutrition

By: Mahdi Amirsadeghi[1*], Amir Hossein Alizadeh-Ghamsari[1]

1- Assistant Professor, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2-

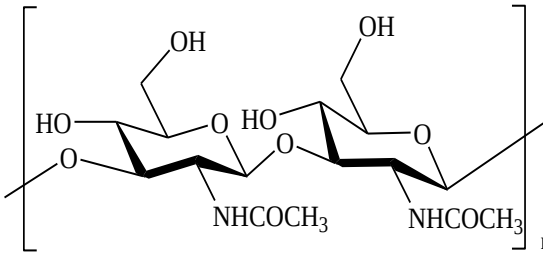
Received: July 2020 **Accepted: September 2021**

Nowadays, there is an abundant interest in the use of insects in poultry and livestock nutrition. All insects produce chitin-based exoskeletons. A precise determination of chitin content of insects is necessary because of its application in various industries and poor digestion in some livestock. Therefore it is necessary to specify their skeleton composition including chitin. Due to the structure of chitin and insolubility in common solvents, the measurement of this compound is difficult and undertaken by estimation. In this study, two different methods are used and compared for chitin content measurement of insects. The experiment was carried out using six different samples of insects including larva of darkling beetle (mealworm) (*Tenebrio molitor*), crickets (*Gryllodes sigillatus*), honey bee (*Apis mellifera meda*) and varieties 31, 51 and 107 of silkworm (*Bombix mori*). In the first method, chitin content was estimated by measuring the acid detergent fiber. In the second method, the chitin measured by chemical purification method. The measured chitin contents by chemical purification were 12.05%± 0.071 for honey bee, 8.18%± 0.259 for mealworm, 7.79% ± 0.107 for cricket and 7.92% ± 0.058, 4.93% ± 0.091, 6.08% ± 0.116 for variety 31, 51 and 107 of silkworm samples respectively. Due to the recommended maximum amount of chitin in poultry feed at the level of 7 g/kg and effect of chitin in determination of total protein, measurement of chitin before usage in feed is necessary and according to the obtained results, for determination of chitin content use of chemical purification method is recommended.

Key words: Chemical Purification, Chitin, Insects..

مقدمه

کیتین، از دسته مواد پلی‌ساکاریدی طبیعی با ساختار بتا-۱و۴ N- استیل- D- گلوکوز آمین است (شکل ۱) که بعد از سلولز، بیشترین فراوانی را در طبیعت دارد. (Li و همکاران، ۲۰۱۰). در اثر واکنش حذف گروه استیل از کیتین، محصول کیتوزان ایجاد می‌شود که یک پلی‌ساکارید کاتیونی محلول در آب است و می‌توان آن را به صورت صنعتی تهیه کرد. کیتین و کیتوزان حاصل از آن، در صنایع مختلف دارویی، آرایشی- بهداشتی، غذایی و غیره کاربرد دارند(Jeon و همکاران، ۲۰۰۰)



شکل ۱- ساختار شیمیایی کیتین (برگرفته از Li و همکاران، ۲۰۱۰)

کیتین برای حیوانات تک معده ای قابل گوارش نیست (Sánchez-Murosو همکاران، ۲۰۱۴) اما میتواند برای سلامتی طیور اثرات مثبتی داشته باشد. مشاهده شده است که استفاده از مگس سرباز سیاه، میل ورم یا جیرجیرک در جیره طیور، استفاده از آنتی بیوتیک ها را کاهش میدهد و وجود ۳ درصد کیتین در جیره سبب افزایش جمعیت لاکتوباسیل‌ها و کاهش اشرشیاکلی و سالمونلا در روده می‌شود(Van Huis، ۲۰۱۳).

در حشرات عمده کیتین در پوسته خارجی قرار دارد و برای آن مزایای و معایبی مطرح شده است. هنگامی که از حشرات در جیره مرغ گوشتی استفاده شود، نسبت آلبومین به گلوبولین کاهش میابد که نشان دهنده مقاومت بیشتر در برابر بیماری‌ها و پاسخ ایمنی بهتر می‌باشد که آن را به نقش پروبیوتیکی کیتین نسبت می‌دهند.(Khan، ۲۰۱۸).

کیتین سبب پایین آمدن چربی خون بخصوص کلسترول می‌شود. مقدار کیتین در سطح ۱۳ درصد ماده خشک سبب افزایش دفع کلسترول و اسیدهای صفراوی می‌شود که احتمالاً از طریق جلوگیری از جذب آنها در روده عمل می کند (Salter، ۲۰۱۹)

در طیور،کیتین می‌تواند تکامل و توسعه روده را با دو مکانیسم کاهش گوارش‌پذیری و فعالیت پریبیوتیکی تنظیم کند. به دلیل گوارش پذیر نبودن کیتین، میتواند هضم پذیری پروتئین را در طیور تحت تاثیر قرار داده و سبب کاهش گوارش پذیری کل ماده خشک جیره شود. (Khempaka و همکاران، ۲۰۱۱)

قابلیت هضم ایلئومی ماده خشک و ماده آلی در جوجه های گوشتی که با میل ورم تغذیه شدند دو درصد کمتر از نمونه‌های بود که با کنجاله سویا تغذیه شده بودند و این مقدار برای پروتئین خام ۸/۲ درصد پایین‌تر است. همچنین کیتین می‌تواند سبب کاهش مقدار خوراک مصرفی و قابلیت دسترسی مواد مغذی شده و در نتیجه عملکرد رشد و مورد استفاده قرار گرفتن مواد مغذی را کاهش دهد. (Kroeckel و همکاران، ۲۰۱۲)

استفاده از کیتین تا سطح ۷/۵ گرم در کیلوگرم در جیره مرغ گوشتی بدون اثرگذاری منفی بر عملکرد و قابلیت هضم، امکان پذیر است ولی استفاده از سطوح بالاتر ممکن است بر افزایش وزن، اثر منفی داشته باشد.

(Moula and ۲۰۱۹،; Hossain and Blair ۲۰۰۷ ، Detilleux)

با وجود اهمیت تعیین مقدار کیتین در نمونه‌های حشرات و جلوگیری از خطرات احتمالی یا پیگیری اثرات آن در جیره، لازم است از روش دقیق و قابل اطمینانی برای اندازه‌گیری آن استفاده شود اما هنوز روش استاندارد و مرجعی برای اندازه‌گیری کیتین ارائه نشده است و در مقالات موجود روش‌های متفاوت با اعداد متفاوت گزارش می‌شود.

کیتین به شکل خالص در طبیعت وجود ندارد و همواره در کنار آن گروه‌های مختلف پروتئینی، لیپیدی، مواد معدنی و ترکیبات رنگی مشاهده می‌شوند(Finke، ۲۰۰۷). بر اساس اینکه مواد همراه کیتین چه موادی باشند و چگونه با آن در اتصال قرار گرفته باشند، روش‌های مختلفی برای حذف این مواد و تهیه کیتین خالص و تعیین مقدار آن ارائه شده است و بنابراین برای اندازه گیری کیتین روش های مختلفی وجود دارد.

اندازه گیری کیتین در نمونه‌های موجودات دریایی شامل انواع سخت‌پوستان آبزی، خرچنگ و میگو دارای سابقه طولانی تر و گزارشات بیشتری است. برای اندازه گیری کیتین در موجودات دریایی، از روش خالص‌سازی شیمیایی استفاده می‌شود که در این روش مواد معدنی و پروتئین‌های همراه با نمونه با استفاده از محلول های غلیظ اسیدی و بازی، حذف شده و باقی‌مانده نمونه به عنوان کیتین گزارش می‌شود.(Weska و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kaya و همکاران، ۲۰۱۵؛ Kovaleva و همکاران، ۲۰۱۶)

در روش کار خالص سازی، ترتیب کار و مواد و روش‌های به کار رفته، با هم متفاوت است (Weska و همکاران، ۲۰۰۷). برای مثال، در مرحله حذف مواد معدنی (کربنات‌ها، فسفات‌ها و دیگر نمک‌های معدنی)، غالباً از محلول رقیق اسید کلریدریک (یک تا ده درصد) در دمای محیط (۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و زمان کوتاه (۱ تا ۳ ساعت همراه با هم‌زدن) استفاده شده است. در این شرایط می‌توان مطمئن بود که تمام بخش مواد معدنی، جدا شده و به زنجیره پلیمری نیز آسیبی وارد نمی‌شود. دیگر اسیدها مانند اسید

نیتریک، اسید سولفوریک، اسید فرمیک، اسید استیک و EDTA نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما این کار تخریب نسبی زنجیره پلیمری را به همراه داشته است (No and Meyers ، ۱۹۹۵؛ Piccin و همکاران، ۲۰۰۹؛ Moura و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین در مرحله حذف پروتئین و چربی، مواد قلیایی مختلفی نظیر NaOH، Na_2CO_3، $NaHCO_3$، KOH، K_2CO_3 و $Ca(OH)_2$ پیشنهاد شده است ولی معمول‌ترین روش، استفاده از سود با غلظت (۱ تا ۱۰ درصد) و هم زدن محلول به مدت ۲ تا ۷۲ ساعت در دمای بین ۲۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است (Shahidi و همکاران، ۱۹۹۹؛ Campana-Filho و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kaya و همکاران، ۲۰۱۵). در این مرحله نیز باید بر روی دما و زمان واکنش، کنترل دقیقی اعمال شود زیرا دمای بالا و زمان طولانی واکنش سبب تخریب زنجیره پلیمری می‌شود(Kumar، ۲۰۰۰). البته برای حذف پروتئین می‌توان از روش‌های آنزیمی (آنزیم‌هایی مانند پپسین و تریپسین) نیز استفاده کرد اما اثر بخشی آن‌ها، از روش قلیایی کمتر است (Campana-Filho و همکاران، ۲۰۰۷).

از سوی دیگر، برخی پژوهشگران معتقدند روش اندازه‌گیری NDF و ADF که عموماً برای تجزیه اجزای فیبر خام خوراک دام استفاده می‌شود را می‌توان برای اندازه‌گیری مقدار کیتین نیز به کار برد (Barker و همکاران، ۱۹۹۸). در مورد نمونه‌های گیاهی، در مرحله تعیین NDF مواد محلول مانند کربوهیدرات‌های محلول در آب، چربی‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌های محلول در آب، جدا شده و دیواره سلولی باقی می‌ماند. در مرحله تعیین ADF نیز سایر مواد در شوینده اسیدی حل شده و مواد باقی مانده بیشتر شامل لیگنین و سلولز است. با این استدلال که در بدن حشرات، لیگنین وجود ندارد و با توجه به مشابهت ساختار کیتین (پلیمر خطی شامل واحدهای بتا (۱-۴) N- استیل- D- گلوکز-آمین) با سلولز (پلیمر خطی شامل واحدهای بتا (۱-۴) D- گلوکوپیرانوز)، مقدار ADF اندازه‌گیری شده در حشرات برابر با مقدار کیتین در نظر گرفته می‌شود (Finke، ۲۰۰۲).

اندازه‌گیری کیتین در سخت پوستان آبزی دارای گزارشات زیادی است اما در مورد حشرات، داده‌های بسیار محدودی گزارش شده است و بیشتر بر اساس اندازه گیری فیبر استوار است (Finke، ۲۰۰۷؛ Kovaleva و همکاران، ۲۰۱۶).

در سال‌های اخیر طرح هایی جهت تامین بخشی از پروتئین، انرژی و چربی جیره طیور با استفاده از حشرات در کشور انجام شده است (علیزاده قمصری، ا.ح، ۱۳۹۹، هاشمی، س.م، ۱۳۹۹) ولی لازم است تا درکنار استفاده از حشرات، مقدار کیتین آنها نیز با روش مطمئن تعیین گردد.

این پژوهش، با هدف تعیین مقدار کیتین در چند گونه از حشراتی که در داخل کشور پرورش داده می‌شوند و قابلیت استفاده در خوراک دام و طیور را دارند، انجام شده است و برای این کار هر دو روش جداسازی شیمیایی و اندازه‌گیری فیبر انجام شده و اطلاعات به دست آمده با یکدیگر مقایسه می‌شوند و روش دقیق‌تر و کاربردی تر برای اندازه‌گیری کیتین در حشرات، معرفی می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ابتدا نمونه‌های لارو سوسک شب‌زی (میل‌ورم) (*Tenebrio molitor*)، لاشه جیرجیرک (*Gryllodes sigillatus*)، لاشه زنبور عسل (*Apis mellifera meda*) و سه واریته کرم ابریشم شامل واریته‌های ۳۱، ۵۱ و ۱۰۷ (*Bombix mori*) از مراجع مورد تأیید موسسه تحقیقات علوم دامی و مرکز تحقیقات کرم ابریشم کشور، تهیه شد. در ادامه، مقدار ۱۰۰ گرم از هر گونه حشره مورد بررسی به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک ومقدار ماده خشک نمونه ها محاسبه گردید. نمونه ها با آسیاب با دانه بندی ۰/۵ میلی‌متری، آسیاب و برای آزمایشات بعدی استفاده شدند.

عوامل مهم تغذیه‌ای شامل خاکستر، چربی و پروتئین طبق روش‌های استاندارد اندازه گیری شد(AOAC، ۱۹۹۰). در صد چربی خام با روش استخراج با سوکسله و با حلال دی اتیل اتر انجام شد و باقی‌مانده نمونه پس از خشک شدن به عنوان درصد چربی گزارش شد. مقدار پروتئین خام نیز با روش کجلدال و با

اندازه‌گیری مقدار نیتروژن کل و ضرب آن در عدد ۶/۲۵ به عنوان ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین انجام شد. از هر گونه، دو نمونه ۵ گرمی تهیه و کیتین موجود در آنها به دو روش مختلف زیر اندازه گیری شد.

الف)روش اندازه گیری فیبر: برای تعیین مقدار فیبر نامحلول در شوینده خنثی[1] NDF و سپس مقدار فیبر نامحلول در شوینده اسیدی[2] ADF ، از روش توصیف شده توسط ون‌سوست و همکاران و با استفاده از دستگاه فایبرتک (Fibertec System، مدل ۱۰۲۰، ساخت کشور سوئد) استفاده شد(Van Soest و همکاران، ۱۹۹۱). برای این منظور، محلول شوینده خنثی شامل ۳۰ گرم سدیم دودسیل سولفات، ۱۸/۶۱ گرم EDTA[3] ، ۶/۸۱ گرم سدیم بورات ۱۰ آبه و ۴/۵۶ گرم سدیم هیدروژن فسفات، در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. مقدار یک گرم از ماده خشک هر نمونه در ظرف کروسیبل دستگاه فایبرتک قرار و ابتدا جهت حذف چربی نمونه‌ها، با ۵۰ میلی لیتر استون شستشو داده شد و به آن ۱۰۰ میلی لیتر محلول شوینده خنثی اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای جوش حرارت داده شد. سپس محلول حاصله با مکش دستگاه، صاف شد. مواد جامد روی کروسیبل‌ها با مقدار کمی آب داغ شستشو داده شد و سپس در آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، خشک گردید.

برای محاسبه مقدار ADF، از محلول شوینده اسیدی استفاده شد. مقدار ۱۰۰ گرم ستیل تری متیل آمونیوم بروماید در ۲/۵ لیتر محلول اسید سولفوریک با غلظت ۱ مولار کاملاً حل و به حجم ۵ لیتر رسانده شد. در ادامه، باقی مانده حاصل از فیبر نامحلول در شوینده خنثی در دستگاه فایبرتک قرار داده شد و به آن ۱۰۰ میلی لیتر محلول شوینده اسیدی اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای جوش، حرارت داده شد. سپس محلول حاصله با مکش دستگاه، صاف شد. مواد جامد روی کروسیبل‌ها با مقدار کمی آب داغ، شستشو داده شد و سپس در آون ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، خشک گردید. جهت تعیین مقدار کیتین از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{کیتین}\% = (P3-P1)/(P2-P1) \times 100$$

که در این رابطه P1 وزن کروسیبل، P2 وزن نمونه اولیه و P3 وزن نمونه بعد از شستشو در شوینده اسیدی است.

ب) روش خالص‌سازی شمیایی: برای انجام خالص‌سازی شیمیایی از روش پائولینو با انجام اصلاحاتی استفاده شد (Paulino و همکاران، ۲۰۰۶). مقدار ۳ گرم از هر نمونه در ۵ تکرار، توزین شد و سپس به منظور حذف مواد معدنی (خاکستر)، به هر نمونه مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محلول سه مولار اسید کلریدریک اضافه و در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۸۰ دقیقه، همزده شد. محلول به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی، صاف شده و رسوبات روی کاغذ صافی تا خنثی شدن محلول زیر کاغذ صافی، با آب مقطر شستشو داده و سپس در آون ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، خشک شد. به منظور حذف پروتئین و چربی، رسوب به دست آمده درون بالن شیشه‌ای قرار داده شد و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول سود ۲ مولار اضافه شد و در دمای ۹۰ سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت، حرارت داده شد. محلول به دست آمده مجدداً صاف و رسوبات روی کاغذ صافی تا خنثی شدن محلول زیرکاغذ صافی، با آب مقطر شستشو داده شد. نمونه روی کاغذ صافی بعد از خشک شدن در آون، توزین شد. برای محاسبه درصد کیتین از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{کیتین}\% = (W2/W1) \times 100$$

که در این رابطه W2 وزن نمونه بعد از جداسازی شیمیایی و W1 وزن اولیه نمونه است.

محصول به دست آمده کیتین در روش خالص‌سازی شیمیایی، تقریباً به رنگ سفید مرمری بود و بجز لاشه زنبور عسل، عمدتاً نیازی به مرحله رنگ‌زدایی نداشت.

داده‌های حاصل از دو روش آزمایشگاهی، در نرم‌افزار Excel ثبت و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل شدند(SPSS، ۱۹۹۵). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش تجزیه واریانس دو طرفه استفاده شد که در آن، روش استخراج و نوع نمونه از عوامل اصلی بودند.

[1] Neutral Detergent Fiber (NDF)
[2] Acid Detergent Fiber (ADF)
[3] ethylene-di-amine-tetra-acetic acid

نتایج

مقادیر ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام و چربی خام برای پنج گونه مورد آزمایش و نیز اعداد گزارش شده در مقالات جهت مقایسه در جدول ۱ آورده شده است. برای تعیین درصد پروتئین اصلاح شده، با توجه به مقدار کیتین به دست آمده برای هرنمونه، مقدار نیتروژن مربوط به ساختار کیتینی محاسبه شد و بعد از تبدیل به هم ارز پروتئینی، مقدار عددی آن از مقدار پروتئین خام کم شد.

جدول ۱- مقادیر ماده خشک، پروتئین و چربی حشرات به دست آمده از آزمایش و گزارش شده در مقالات

نمونه حشره	ماده خشک	خاکستر	درصد چربی (در ماده خشک)	درصد پروتئین خام (در ماده خشک)	درصد پروتئین اصلاح شده (در ماده خشک)	مرجع
میل‌ورم	۹۳/۸	۳/۷	۳۳/۸	۴۹/۴۵	۴۵/۹۲	–
میل ورم گزارش شده	۶۴	۳/۰ – ۴/۵	۲۵ – ۴۳	۴۵ – ۶۰	–	Khan، ۲۰۱۸
جیرجیرک	۹۰/۰	۴/۷	۲۹/۷	۵۶/۴۲	۵۳/۰۶	–
جیرجیرک گزارش شده	۶۸	۳ – ۶/۵	۵ – ۲۰	۵۰ – ۶۵	–	Makkar و همکاران ۲۰۱۴
زنبور عسل	۹۴	۱۲/۶	۵/۷	۴۸/۵	۴۳/۳۰	–
زنبور عسل گزارش شده	۶۵	۱۱/۵	۶/۹	۵۱	–	Ghosh و همکاران، ۲۰۱۶
کرم ابریشم واریته ۳۱	۲۲/۴۳	۴/۱۰	۱۴	۸۲/۵	۷۹/۰۸	–
کرم ابریشم واریته ۵۱	۲۵/۴۹	۴/۱۵	۱۰/۷	۸۰/۵۳	۷۸/۴۰	–
کرم ابریشم واریته ۱۰۷	۲۳/۵۰	۴/۲۰	۱۰/۶	۸۲/۷۷	۸۰/۱۴	–
کرم ابریشم گزارش شده	۶۵-۷۰	۴/۰	۱۱ – ۲۰	۷۱/۹	–	Khan، ۲۰۱۸

میانگین مقادیر کیتین اندازه‌گیری شده و انحراف معیار مقادیر کیتین روش خالص‌سازی شیمیایی و روش ADF برای شش نمونه حشره مورد آزمایش، در جدول ۲ نشان داده شده است.

در این جدول، درصد کیتین استخراج شده با استفاده از روش خالص‌سازی شیمیایی در بازه کمتر و بین ۴/۹۳ تا ۱۲/۰۵ (به ترتیب برای نمونه کرم ابریشم واریته ۳۱ و زنبور عسل) به دست آمد اما در روش تعیین مقدار کیتین بر اساس فیبر نامحلول در شوینده اسیدی، نتایج به دست آمده برای درصد کیتین در بازه بیشتر و بین ۱۲/۶ (برای میل‌ورم) تا ۲۳/۴۰ (برای کرم ابریشم واریته ۳۱) به دست آمد.

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار مقادیر کیتین برای دو روش مورد استفاده و نیز مقایسه نتایج دو روش برای نمونه حشرات مورد آزمایش

نمونه حشره	درصد کیتین با روش خالص-سازی شیمیایی	انحراف معیار	درصد کیتین با روش فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)	انحراف معیار
میل‌ورم	۸/۱۸	۰/۲۵۹	۶/۱۲	۰/۱۷۷
جیرجیرک	۷/۷۹	۰/۱۰۷	۱۰/۲۵	۰/۰۷۱
زنبور عسل	۱۲/۰۵	۰/۰۷۱	۱۳/۶۲	۰/۸۸۴
کرم ابریشم واریته ۳۱	۷/۹۲	۰/۰۵۸	۲۳/۴۰	۰/۱۴۱
کرم ابریشم واریته ۵۱	۴/۹۳	۰/۰۹۱	۲۲/۰۰	۰/۲۸۳
کرم ابریشم واریته ۱۰۷	۶/۰۸	۰/۱۱۶	۲۲/۶۰	۰/۱۴۱

نتایج تجزیه واریانس دو طرفه نشان دادند که اختلاف نتایج بدست آمده از روش‌های به کار رفته برای تعیین مقدار کیتین از هر نمونه، معنی‌دار است ($P=۰/۰۰۱$). و بنابراین استفاده از هر یک از روش‌های به کار رفته برای تعیین میزان کیتین، اعداد متفاوتی به دست خواهدآمد.

بحث

استفاده از حشرات در تغذیه دام و طیور به منظور تامین نیاز پروتئینی و انرژی در سال‌های اخیر مورد توجه ویژه قرار گرفته است و گزارش شده است که نسبت به نوع دام، حشرات می‌توانند جایگزین بین ۲۵ تا ۱۰۰ درصد کنجاله سویا یا پودر ماهی در جیره شوند(Makkar و همکاران ۲۰۱۶). مقادیر چربی در آنها بین ۳۰ تا ۴۰ درصد (ماده خشک) و مقدار پروتئین ۴۲ تا ۶۳ درصد (ماده خشک) نسبت به کنجاله سویا یا پودر ماهی گزارش شده است و به جزء کرم ابریشم، حشرات از نظر مقدار متیونین و لیزین فقیر هستند و استفاده از آنها در جیره باید همراه با مکمل های اسیدآمینه باشد.(Makkar و همکاران، ۲۰۱۴).

در جدول ۱ مقادیر ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام و چربی خام برای نمونه‌های مورد آزمایش گزارش شده است برای مقایسه گزارشات سایر مقالات نیز ارائه شده است. تفاوت در مقدار ماده خشک نمونه‌های آزمایش با مقادیر گزارش شده در مقالات به دلیل مرحله جمع آوری نمونه و دریافت آنها بود و برای مثال نمونه زنبور عسل، از لاشه خشک شده زنبور عسل در کندو استفاده شد و یا نمونه‌های میل‌ورم و جیرجیرک برای نمونه‌های بالغ که تا حدی خشک شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت.

طبق نتایج حاصل شده بیشترین مقدار پروتئین خام به کرم ابریشم (۸۲ درصد) و کمترین مقدار در زنبور عسل (۴۸/۵درصد) مشاهده شد. همچنین در مورد چربی خام بیشترین مقدار چربی در نمونه میل‌ورم (۳۳/۸) و کمترین مقدار در زنبور عسل (۵/۷) به دست آمد. در اندازه‌گیری پروتئین باید دقت داشت که وجود کیتین همراه با نمونه سبب می‌شود تا میزان پروتئین خام گزارش شده برای حشره، بیشتر از مقدار پروتئین حقیقی نمونه باشد زیرا در ساختار کیتین نیتروژن غیر پروتئینی وجود دارد (شکل ۱) که در محاسبه پروتئین وارد می‌شود. این امر به ویژه در مواردی که میزان کیتین موجود در اسکلت حشره، بالا باشد سبب بروز خطا در محاسبه پروتئین خام و در نتیجه خطا در تنظیم جیره، خواهد شد (Finke، ۲۰۰۷).

فرمول خام یک منومر کیتین $C_8H_{13}NO_5$ با وزن ۲۰۳ g/mol است و هر واحد آن یک اتم نیتروژن دارد، بنابراین برای تعیین مقدار دقیق پروتئین نمونه‌ها، مقدار نیتروژن کیتین محاسبه و بعد از تبدیل آن به هم ارز پروتئینی، مقدار به دست آمده از پروتئین خام کم شده و به عنوان پروتئین اصلاح شده در جدول۱ گزارش شده است.

مشکلی که در اندازه‌گیری کیتین وجود دارد این است که این ماده هم دارای ساختار زنجیره بلند پلیمری بوده و آبگریز می‌باشد

و در حلال‌های قطبی مانند آب و حلال‌های غیر قطبی مانند هگزان، حل نمی‌شود بنابراین جداسازی آن از بافت نمونه دشوار است (Huang و همکاران، ۲۰۱۵). جهت تعیین مقدار دقیق کیتین از روش‌های خاص مانند NMR حالت جامد[4] استفاده می‌شود (Kramer و همکاران، ۱۹۹۵) که تجهیزات مورد نیاز آن به آسانی در دسترس نیست. در برخی گزارشات نیز از روش آنزیمی برای شکستن گروه استیل موجود در ساختار کیتین و اندازه‌گیری مقدار استیل آزاد شده از ترکیب و ارتباط دادن آن با مقدار کیتین نمونه، بهره گرفته‌اند (Hahn و همکاران، ۲۰۱۸) که این روش نیز به دلیل نیاز به وجود کیت آزمون آنزیمی خاص هزینه‌بر بوده و همیشه میسر نمی‌باشد.

در پژوهش حاضر، هر دو روش خالص‌سازی شیمیایی و اندازه‌گیری فیبر مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات به دست آمده با استفاده از روش ADF، مقدار کیتین را برای اغلب نمونه‌ها و بخصوص برای سه واریته کرم ابریشم، بیشتر از روش خالص - سازی شیمیایی نشان می‌دهد که صحت روش ADF را برای تعیین مقدار کیتین با چالش مواجه می‌کند. برخی از پژوهشگران نیز اعتقاد دارند که استفاده از روش تعیین ADF سبب بیش برآورد[5] مقدار کیتین در نمونه حشرات می‌شود (Hahn و همکاران، ۲۰۱۸).

یکی از دلایل احتمالی بیش برآورد مقدار کیتین حشرات در روش ADF آن است که در این روش، اتصال محکم بین اجزای پروتئینی و زنجیره کیتین ممکن است تا مرحله آخر استخراج، همچنان وجود داشته باشد ولی در روش خالص سازی شیمیایی، استفاده از محیط قلیایی سبب هیدرولیز شدن ساختارهای پروتئینی می‌شود (Campana-Filho و همکاران، ۲۰۰۷).

گزارش‌های منتشر شده در مورد اندازه‌گیری مقدار کیتین در حشرات جهت انطباق داده‌ها، اندک است. در پژوهشی، مقدار کیتین موجود در کرم ابریشم بین ۲/۶ تا ۴/۳ درصد بر اساس ماده خشک گزارش شد (Paulino و همکاران، ۲۰۰۶) که از اسید کلریدریک یک مولار در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و از سود یک مولار در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، استفاده شده است که شرایط سختی محسوب می‌شوند و می‌توانند تا حدی سبب از بین رفتن کیتین و کاهش نسبی مقدار آن در نمونه شوند. در مقایسه بین نتایج گزارش شده توسط سایر محققین با نتایج حاصل از پژوهش حاضر، اعداد به دست آمده از روش خالص‌سازی شیمیایی (بین ۴ تا ۷ درصد کیتین برای سه نمونه کرم ابریشم) بسیار نزدیک‌تر از نتایجی هستند که از روش فیبر (بین ۲۲ تا ۲۳ درصد کیتین برای سه نمونه کرم ابریشم) به دست آمده‌اند و این اختلاف زیاد، استفاده از روش فیبر نامحلول در شوینده اسیدی را برای تعیین مقدار کیتین موجود در حشرات، زیر سوال قرار می‌دهد.

در مطالعه دیگری مقدار کیتین موجود در لاشه زنبور عسل، ۱۸ درصد تعیین شد(Draczynski، ۲۰۰۸). در این اندازه‌گیری نیز از اسید کلریدریک یک مولار (دمای محیط به مدت یک ساعت) و سود یک مولار (دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های متغیر) به ترتیب جهت حذف مواد معدنی و پروتئینی استفاده شده بود و راحت‌تر بودن نسبی شرایط هضم، ممکن است علت بالاتر بودن درصد کیتین در این پژوهش نسبت به مطالعه حاضر باشد.

در پژوهش Kovaleva و همکاران (۲۰۱۶)، تغییراتی در روش شیمیایی برای جدا سازی کیتین از زنبور عسل و سوسک حمام اعمال شد به این ترتیب که ابتدا نمونه‌ها با سود هشت درصد و سپس با اسید کلریدریک ۶/۷ درصد واکنش داده و برای اندازه-گیری و تعیین ساختار محصول به دست آمده، از نوعی اسپکتروفتومتری موسوم به FTIR[6] و تجهیزات تجزیه عنصری[7] (CHN analyzer) استفاده شد. بر اساس نتایج این پژوهش، درصد کیتین بر اساس ماده خشک در لاشه زنبور عسل، ۲۲ و در سوسک حمام، ۳۸ درصد تعیین گردید.

در مطالعه‌ای دیگر، برای استحصال کیتین از ۱۰۰ گرم نمونه میل-ورم، از ۵۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک دو نرمال (دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت) و ۵۰۰ میلی‌لیتر سود ۱/۲۵ نرمال (دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت)، استفاده شد (Song و همکاران، ۲۰۱۸). در ادامه، اجزای کیتینی به دست آمده به مدت سه ساعت و در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در

[4] Solid Nuclear Magnetic Resonance
[5] Overestimation
[6] Fourier Transform Infra-Red
[7] Carbon, Hydrogen and Nitrogen Analyzer

محلول‌های ۴۰ و ۵۰ درصد وزنی سود، حرارت داده شدند. میانگین مقدار کیتین موجود در نمونه میل‌ورم، ۴/۹ درصد تعیین شد. در صورت کسر مقدار پروتئین متصل به ADF از کل ADF استحصال شده، مقدار کیتین موجود در میل ورم را ۴/۶۲ درصد به دست می‌آید(Bovera و همکاران ۲۰۱۵).

نکته قابل توجه در پژوهش حاضر، کمتر شدن مقدار اندازه‌گیری شده کیتین میل‌ورم در روش ADF (۶/۱۲ درصد) نسبت به روش خالص سازی شیمیایی (۸/۱۸ درصد) بود که با بیش برآورد مقدار کیتین در روش ADF که در سایر نمونه‌های حشرات مشاهده شد ، مغایرت داشت.

طبق اطلاعات جدول ۱ مشاهده می‌شود که نمونه میل ورم دارای بیشترین مقدار چربی در بین تمام نمونه‌ها است (۳۳/۸ درصد در ماده خشک) و در نتیجه هنگام استفاده از روش شیمیایی، احتمالاً تمام چربی نمونه به صورت کامل هیدرولیز نشده است و مقداری از آن همراه با کیتین باقی مانده است که این امر سبب بیش برآورد مقدار کیتین با روش شیمیایی شده است اما در روش ADF به دلیل شستشوی نمونه با استون، چربی آن خارج گردیده است.

در پژوهشی تازه‌تر، برای استحصال کیتین نمونه جیرجیرک، از اسید کلریدریک یک مولار، سود یک مولار و نیز محلول کربنات سدیم ۰/۴ درصد برای حذف مواد معدنی، پروتئین، چربی و رنگدانه‌ها استفاده شد (Hirsch و همکاران، ۲۰۱۹). در پژوهش مذکور مقدار کیتین موجود در نمونه جیرجیرک، حدود هفت درصد تعیین شد که با نتیجه به دست آمده از روش خالص‌سازی شیمیایی، مشابهت دارد.

نکته حائز اهمیت آن است که اگر چه ساختار شیمیایی کیتین، ساختار ثابتی است (شکل ۱) اما در طبیعت به شکل خالص وجود ندارد و بر اساس اینکه زنجیر پلیمری کیتین با چه اجزای دیگری اتصال یا برهمکنش داشته باشند، شکل‌های مختلفی از کیتین مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج پژوهشگران، بین شکل طبیعی کیتین سخت پوستان آبزی و حشرات، تفاوت وجود دارد. در سخت پوستان آبزی مانند میگو و خرچنگ، اسکلت خارجی شامل کیتینی است که در ماتریکسی از پروتئین و مواد معدنی (عمدتاً کلسیم) قرار گرفته است (Johnson and Peniston ، ۱۹۸۲) ولی در حشرات، پوسته خارجی شامل کیتینی است که در ماتریکسی از پروتئین، لیپید و مواد دیگر قرار دارد و مقدار مواد معدنی مانند کلسیم در آن، اغلب اندک است (Tomberlin و همکاران، ۲۰۰۲). این یافته‌ها مؤید آن است که بین روش اندازه-گیری کیتین در حشرات و آبزیان، تفاوت وجود دارد و باید در کنار گزارش مقدار کیتین، روش اندازه گیری آن نیز مد نظر باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به تفاوت در ساختار اسکلت خارجی سخت پوستان دریایی و حشرات، روش‌های تعیین مقدار کیتین در آنها نیز متفاوت است. برای انواع سخت پوستان، استفاده از روش فیبر نامحلول در شوینده اسیدی می‌تواند جهت تخمین مناسب مقدار کیتین، مورد استفاده قرار گیرد ولی برای حشرات، این روش از دقت کافی برخوردار نیست و اغلب اعدادی بیشتر از مقدار واقعی را به دست می‌دهد که علت آن میتواند اتصال بافت کیتین با گروه‌های پروتئینی مختلف باشد که به راحتی از رشته پلیمری کیتین جدا نمی‌شوند. در عوض، استفاده از روش شیمیایی و خالص‌سازی کیتین از پوسته حشرات و سپس تعیین میزان درصد آن، روش کم هزینه‌تر، موثرتر و دقیق‌تری برای تعیین میزان کیتین در این گونه از موجودات است.

با توجه به همراه بودن همیشگی کیتین با حشرات، تعیین مقدار آن جهت بررسی اثرات مثبت یا منفی آن ضروری است. از طرفی افزایش استفاده از حشرات در جیره غذایی دام و طیور به عنوان منبع مناسب تأمین پروتئین در حال افزایش است و احتمال استفاده از گونه‌های جدیدتری از حشرات نیز وجود دارد و نیاز است تا یک روش قابل اطمینان برای اندازه‌گیری کیتین استفاده شود که در این راستا، روش خالص‌سازی شیمیایی جهت تعیین میزان کیتین، پیشنهاد می‌شود. همچنین به دلیل اینکه بخشی از نیتروژن استفاده شده در تعیین میزان پروتئین خام، از منبع کیتین تأمین شده است، پیشنهاد می‌شود با تعیین میزان کیتین و مقدار نیتروژن همراه با آن، این عدد از نیتروژن کل کسر شود تا مقدار پروتئین نمونه‌ها با دقت بیشتری محاسبه گردد.

منابع

علیزاده قمصری، ا.ح. (۱۳۹۹). اثرات پودر لارو سوسک شب‌زی (میل‌ورم) بر عملکرد و پاسخ‌های ایمنی جوجه‌های گوشتی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

هاشمی، س.م. (۱۳۹۹). مطالعه تولید پروتئین حشرات بر روی کود مرغ و زباله‌های آلی با استفاده از مگس خانگی. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قم.

AOAC, (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

Barker, D., Fitzpatrick, M.P. and Dierenfeld, E.S. (1998). Nutrient composition of selected whole invertebrates. *Zoo Biology*. 17: 123-134.

Bovera, F., Piccolo, G., Gasco, L., Marono, S., Loponte, R., Vassalotti, G. *et al*. (2015). Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *British Poultry Science*. 56: 569-575.

Campana-Filho, S.P., Britto, D., Curti, E., Abreu, F.R., Cardoso, M.B., Battisti, M.V. *et al*. (2007). Extraction, structures and properties of α- and β-chitin. *Quimica Nova*. 30: 644-650.

De Marco, M., Martinez, S., Hernandez, F., Madrid, J., Gai, F., Belforti, M. *et al*. (2015). Nutritional value of two insect larval meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*) for broiler chickens: Apparent nutrient digestibility, apparent ileal amino acid digestibility and apparent metabolizable energy. *Animal Feed Science and Technology*. 209: 211-218.

Draczynski, Z. (2008). Honey bee corpses as an available source of chitin. *Journal of Applied Polymer Science*. 109: 1974-1981.

Finke, M.D. (2002). Complete nutrient composition of selected invertebrates commonly fed to insectivores. *Zoo Biology*. 21: 269-285.

Finke, M.D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*. 26: 105-115.

Ghosh, S., Jung, C. and Meyer-Rochow, V.B. (2016). Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, *Apis mellifera ligustica* as a sustainable food source. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 19: 487-495.

Hahn, T., Roth, A., Febel, E., Fijalkowska, M., Schmitt, E., Arsiwalla, T. *et al*. (2018). New methods for high accuracy insect chitin measurement. *Journal of the Science of food and Agriculture*. 98: 5069-5073.

Hirsch, A., Cho, Y., Kim, Y.H.B. and Jones, O.G. (2019). Contributions of protein and milled chitin extracted from domestic cricket powder to emulsion stabilization. *Current Research in Food Science*. 1: 17-23.

Hossain, S. and Blair, R. (2007). Chitin utilization by broilers and its effects on body composition and blood metabolites. *British Poultry Science*. 48: 33-38.

Huang, Y., He, M., Lu, A., Zhou, W., Stoyanov, S.D., Pelan, E.G. *et al*. (2015). Hydrophobic modification of chitin whisker and its potential application in structuring oil. *Langmuir*. 31: 1641-1648.

Jeon, Y., Shahidi, F. and Kim, S. (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*. 16: 159-176.

Johnson, E.L. and Peniston, Q.P. (1982). Utilization of shell waste for chitin and chitosan production. 514-522. In: Martin, R.E., Flick, G.H., Hebard, C.E. and Ward, D.R. (eds.) *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. AVI Publishing Co. Westport, CT, USA.

Kaya, M., Baran, T. and Karaarslan, M. (2015). A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp. *Natural Product Research*. 29: 1477.1480.

Khan, S., Khan, R. U., Alam, W.A. and Sultan, A. (2018). Evaluating the nutritive profile of three insect meals and their effects to replace soya bean in broiler diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.*102: 662–668.

Khan, S.H. (2018). Recent advances in role of insects as alternative protein source in poultry nutrition. *Journal of Applied Animal Research.* 46: 1144-1157.

Khempaka, S., Chitsatchapong, C., and Molee, W. (2011). Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*. 20:1–11.

Kovaleva, E., Pestov, A., Stepanova, D. and Molochnikov, L. (2016). Characterization of chitin and its complexes extracted from natural raw sources. In: AIP Conference Proceedings. 1772. DOI: 10.1063/1.4964577.

Kramer, K.J., Hopkins, T.L. and Schaefer, J. (1995). Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25: 1067-1080.

Kroeckel, S., Harjes, A.G.E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A. *et al*. (2012). When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute – growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364/365: 345–352.

Kumar, M.N.V.R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 46: 1-27.

Li, G., Du, Y., Tao, Y., Liu, Y., Li, S., Hu, X. *et al*. (2010). Dilute solution properties of four natural chitin in NaOH/urea aqueous system. *Carbohydrate Polymers*. 80: 970-976.

Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P., (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal Feed Science and Technol*. 197: 1–33.

Moula, N., Detilleux, J. (2019). A meta-analysis of the effects of insects in feed on poultry growth performances. *Animals* 9, 1–13.

Moura, C.M., Moura, J.M., Soares, N.M. and Pinto, L.A.A. (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 50: 351-355.

No, H.K. and Meyers, S.P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan-a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 4: 27-52.

Paulino, A.T., Simionato, J.I., Garcia, J.C. and Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. *Carbohydrate Polymers*. 64: 98-103.

Piccin, J.S., Vieira, M.L.G., Goncalves, J.O., Dotto, G.L. and Pinto, L.A.A. (2009). Adsorption of FD&C Red No. 40 by chitosan: Isotherms analysis. *Journal of Food Engineering*. 95: 16-20.

Salter, A.M. (2019). Insect Protein: A Sustainable and Healthy Alternative to Animal Protein? *Journal of Nutrition.* 149: 545-546.

Sánchez-Muros, M.J., Barroso, F.G. and Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*. 65:16–27.

Shahidi, F., Arachchi, J.K. and Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 37-51.

Song, Y., Kim, M., Moon, C., Seo, D., Han, Y.S., Jo, Y.H. *et al*. (2018). Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm and *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*. 48: 227-233.

SPSS Inc. (1999). SPSS for windows (Release 10.0) Standard Version. SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11 th floor Chicago, Ilinois 60606, USA.

Tomberlin, J.K., Sheppard, D.C. and Joyce, J.A. (2002). Selected life-history traits of the black soldier flies (*Diperta stratiomyidae*) reared on three artificial diets. *Annals of the Entomological Society of America.* 95: 379-386.

Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *The Annual Review of Entomology*. 58: 121–130.

Van Soest, P.J., Roberson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.

Weska, R.F., Moura, J.M., Batista, L.M., Rizzi, J. and Pinto, L.A. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 80: 749-753.