



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

افزایش زیست تخریب پذیری پلیمرهای کیتوسانی

با استفاده از موتانت های پرتو دیده قارچی

سمیرا شهبازی^۱، مهدیه سادات قاسمی^۲، حامد عسکری^۱، الهه کوثری^۲، علی عموزاده^۲

۱- گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی

۲- گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی، دانشگاه امیرکبیر

نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

چکیده: مواد زیست تخریب پذیر در مقایسه با پلاستیک های رایج، علاوه بر کاهش مصرف انرژی در فرآیند تولید، به دلیل تجدید پذیر بالا به عنوان جایگزین مناسب پلاستیک های رایج مطرح شده اند. در تحقیق حاضر به سنتز و بررسی زیست تخریب پذیری پلی آمید-ایمید بر پایه ی کیتوزان پرداخته شده است. میزان تخریب پذیری این پلیمر با استفاده از دو گونه از قارچ تریکودرما (*T. viride* و *T. harzianum*) و موتانت های پرتو دیده ان مورد بررسی قرار گرفته است. خصوصیات ساختار شیمیایی پلیمرها با استفاده از FT-IR، XRD و SEM بررسی شد. وزن مولکولی آنزیم های کیتیناز تولیدی با استفاده از آزمون SDS-PAGE تعیین شد. در گونه *T. viride* جدایه های موتانت *T. v M1*، *T. v M5*، *T. v M4* و *T. v* بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. در گونه *T. harzianum* جدایه های موتانت *T. h M6*، *T. h M8*، *T. h M11*، *M15* و *T. h* بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. نتایج آزمون SDS-PAGE دلالت بر حضور آنزیم های کیتیناز و کیتوزاناز در جدایه های مختلف را داشت. بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه *T. h M15* و *T. v M19* مشاهده شد که دارای بالاترین مقادیر آنزیم های اندوکیتینازی (۴۲ و ۳۱ KDa) و آنزیم β -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase (۷۳ KDa) بود. نتایج این مطالعه به روشنی نشان می دهد که القای موتاسیون با پرتوگاما در قارچ تریکودرما منجر به بهبود تولید آنزیم های کیتیناز در قارچ تریکودرما می شود. اندازه گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از پلیمر پلی آمید-ایمید بر پایه کیتوزان مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبسترای کیتینی نشان داد

کلمات کلیدی: پلیمرهای زیست تخریب پذیر، آنزیم کیتیناز، موتاسیون، تریکودرما.

Increased biodegradation chitosinic polymers

using irradiated fungal mutants

Ghasemi, M¹, S. Shahbazi*², H. Askari², E. Kousari¹, A. Amouzadeh¹

Department of Chemical Engineering, Faculty of Technology, University of Amir Kabir

Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.

sshahbazi@nrcam.org

Abstract: Biodegradable polymers in compared to conventional plastics need much less energy consumption in production process, in addition have high renewability and have been proposed as suitable alternative conventional plastics. In this study, biodegradation of chitosanic poly amid-imid polymers



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

have been synthesis. Also, the degradation of these polymers by using two species of *Trichoderma* (*T. harzianum* and *T. viride*) and irradiated mutants that have been studied. Chemical structure and polymers properties were examined using FT-IR, XRD and SEM. The molecular weight of chitinolytic enzymes production were determined using SDS-PAGE. *T. viride* mutants of *T. v* M19, *T. v* M1, *T. v* M5, *T. v* M4 and *T. v* M6 maintained higher ability to chitinase enzyme activity, respectively. *T. harzianum* mutants of *T. h* M15, *T. h* M11, *T. h* M8 and *T. h* M6 maintained higher ability to chitinase enzyme activity, respectively. The highest chitinase enzyme production was observed in *T. v* M19 and *T. h* M15, that containing of large amount of Endo chitinase (42 KDa and 31 KDa) and β -1,4-N acethyl glucoseaminidase (73 KDa). The study clearly showed the possibility of improving the chitinase production of *Trichoderma* through mutation with γ -radiation. Measurement of enzyme activity using polyamide-Amyd polymer-based substrate chitin chitosan higher levels of activity than indicated.

Keyword: biodegradation, *T. harzianum*, *T. viride*, Chitinase, chitosinic polymers.

مقدمه:

تصور جهان پیشرفته‌ی کنونی بدون وجود مواد پلیمری مشکل می‌باشد. امروزه پلیمرها جزئی از زندگی ما شده‌اند و در ساخت اشیای مختلف از وسایل زندگی و مصرف عمومی گرفته تا ابزار دقیق و پیچیده‌ی پزشکی و علمی به کار می‌روند [1]. پلیمرها و مواد زیست تخریب پذیر در مقایسه با پلاستیک‌های موجود نه تنها در فرآیند تولید، انرژی کمتری مصرف می‌نمایند بلکه به دلیل مواد مصرفی تجدید پذیر از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. لذا پلیمرهای زیست تخریب پذیر به عنوان جایگزین مناسب پلاستیک‌های رایج مطرح گردید [2]. پلیمرهای زیست تخریب پذیر، در اثر تخریب پلیمر با حل شدن، هیدرولیز و یا تخریب آنزیمی، به موادی ساده‌تر و کم ضررتر تبدیل می‌شود. در تحقیق حاضر به سنتز و بررسی زیست تخریب پذیری پلی آمید-ایمید بر پایه‌ی کیتوسان پرداخته می‌شود [3].

کیتوزان کوپلیمری از گلوکز آمین و N-استیل گلوکز آمین است. ماده اولیه تولید کیتوزان، کیتین می‌باشد. بیوپلیمرهای کیتین و سلولز، فراوان ترین ترکیبات آلی موجود در طبیعت هستند که سالانه حدود ۱۰۱۱ تن از این مواد در طبیعت تولید می‌گردند. با وجود تولید سالانه کلان آن و سهولت دسترسی، کیتین به عنوان یک منبع زیست توده دست نخورده باقی مانده است. با این حال قرن ۲۱ را می‌توان قرن استفاده از کیتین به عنوان یک ماده فوق العاده محسوب گردد، زیرا کیتین و مشتقات آن پتانسیل بالایی برای استفاده در بسیاری از زمینه‌ها از قبیل پزشکی، داروسازی، آرایشی، علوم و تکنولوژی زیستی، صنایع غذایی، کشاورزی و حفظ



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

محیط زیست دارا می باشد. علاوه بر ساختار پلی ساکاریدی منحصر به فرد آن، حضور گروه های آمینی اندک (% ۱۵-۵) در کیتین، امتیازات عالی را برای عملکرد های بیولوژیک و برای برهمکنش های بهبودی و اصلاحی آن فراهم کرده است. بیوپلیمر کیتین از سازگاری مناسبی با بافت های زنده برخوردار است و ماده ای غیر سمی و تجزیه پذیر در طبیعت می باشد. البته حلالیت آن کم است و واکنش پذیری ضعیفی دارد. کیتوزان یک کوپلیمر از ۲-Amino-2-deoxy-D-glucose (glucosamine) و ۲-Acetamido-2-deoxy-D-glucose (deoxy-D-glucose(N-acetyl glucosamine)) است که بوسیله N- در استیلاسیون کیتین تهیه می شود (19). این امر در شرایط مختلف دما (۸۰ تا ۱۴۰°C) و زمان (تا ۱۰ ساعت) با استفاده از محلول های هیدروکسید سدیم و پتاسیم غلیظ (۳۰ تا ۶۰ درصد w/v) انجام می گیرد. غلظت قلیا و زمان و دمای فرآیند به علت تأثیرات آن بر درجه استیله شدن، وزن مولکولی و توزیع وزن مولکولی بعلاوه توزیع واحدهای در استیله در طول زنجیره پلی ساکارید باید دقیقاً کنترل شود. درجه استیلاسیون کیتین، بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، زیست تجزیه پذیری و فعالیت های ایمونولوژیکی کیتوزان تولیدی تاثیر می گذارد. (**Error! Reference source not found.**) غالباً کیتوزان را به عنوان ماده کیتینی با درصد استیلاسیون بالای ۵۰٪ می شناسند. کیتوزان های تجاری معمولاً درصد استیلاسیون بیش از ۷۰٪ و وزن مولکولی بین ۱۰ هزار تا ۱/۲ میلیون دالتون دارند. کیتوزان در pH کمتر از ۶ به صورت پلی کاتیونیک می باشد و به سهولت با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین ها، پلی ساکاریدهای آنیونی، اسید های چرب و فسفو لیپیدها واکنش می دهد. این مسئله می تواند ساختار و بافت و خواص رئولوژیک محصولات غذایی را که کیتوزان در تولید آنها بکار می رود، تحت تاثیر قرار دهد. به دلیل وجود گروه های آمینی در ساختمان کیتوزان، این ماده در محیط های اسیدی از حلالیت بهتری برخوردار است و گروه های آمینی باعث پروتونه شدن کیتوزان می شوند و در نتیجه کیتوزان یک پلیمر با بار مثبت می باشد. درجه استیلاسیون که نسبت گروه های استیل گلوکز آمین به گروه های آمین موجود در ساختار کیتوزان را نشان می دهد، عامل مهمی در میزان حلالیت و سایر خواص کیتوزان محسوب می شود. خصوصیات منحصر به فرد کیتین و مشتقات آن کاربردهای صنعتی بسیاری را مانند تهیه فیبرهای خوراکی، بانداژها، مواد آرایشی و بهداشتی تأمین می کند.

پلی آمید-ایمیدهای آروماتیک پلیمرهای تراکمی با کارایی بالا هستند که از واکنش بین یک دی انیدرید و دی آمین های آروماتیک حاصل می شوند که در زنجیر پلیمری اتصالات آمید-ایمید به صورت متناوب قرار گرفته اند. پلی آمید-ایمیدها دسته ای از کوپلی ایمیدها هستند که خواص بینابینی پلی آمیدها و پلی ایمیدها را دارند، از نظر خواص گرمایی بیشتر شبیه به پلی ایمیدها هستند اما در مقایسه با پلی آمید و پلی ایمید خواص بهتری دارند [4]. پلی آمید-ایمیدها گروهی از پلیمرها می باشند که به دلیل پایداری گرمایی بالا، مقاومت مکانیکی عالی، خواص دی الکتریک مطلوب و مقاومت در برابر حلال های شیمیایی روز به روز بر دامنه ی



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

کاربرد صنعتی آنها افزوده می‌شود [5]. علت بروز این خواص منحصر به فرد، وجود حلقه‌های آروماتیک ایمیدی پایدار می‌باشد. این پلیمرها قبل از ذوب شدن تجزیه شده و از طرفی در حلال‌های آلی معمول حل نمی‌شوند و به همین دلیل محدودیتی در کاربرد آنها وجود دارد [6]. ساخت پلی آمید-ایمید از جمله روش‌هایی است که توانسته با وارد کردن قطعات قابل انعطاف در زنجیر اصلی خواص پلی ایمیدها را بهبود ببخشند. به دلیل استفاده از آمینو اسید و همچنین کیتوسان در ساختار پلیمر مورد نظر - که هر دو در گروه پلیمرهای و مواد زیست تخریب پذیر و زیست سازگار می‌باشند - انتظار می‌رود پلیمر حاصله نیز زیست تخریب پذیر بوده [7] و برای افزایش میزان زیست تخریب پذیری بر قدرت هضم زیستی یکی از مهم‌ترین قارچ‌های کیتینولیتیک موجود در اکوسیستم یعنی قارچ تریکودرما تمرکز شده است. در تحقیق حاضر به سنتز و بررسی زیست تخریب پذیری پلی آمید-ایمید بر پایه ی کیتوزان با این قارچ پرداخته شده است. میزان تخریب پذیری این پلیمر با استفاده از موتانت های پرتو دیده دو گونه از قارچ تریکودرما (T. harzianum و T. viride) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

تهیه ی منومر اسیدی بر پایه ی آسپارتیک اسید (a):

۲/۴ میلی مول آسپارتیک اسید (۰/۳۲ گرم) با ۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه ی سانتی گراد هم خورده و پس از افزودن ۱ میلی مول (۰/۳۵۸ گرم) دی انیدرید به مخلوط واکنش، رفلاکس با دمای ۹۰ درجه ی سانتی گراد آغاز گردید (شکل ۱). و سپس طی زمان ۱۲ ساعت دما تا ۱۲۰ درجه ی سانتی گراد افزایش داده شد و همزمان گاز نیتروژن به مخلوط واکنش وارد گردید. پس از کامل شدن واکنش و توقف رفلاکس، پس از تبخیر بیش از نیمی از حلال، مخلوط واکنش به ۲۰ میلی لیتر مخلوط ۱:۳ آب مقطر- اتانول اضافه گردید و بعد از ۳۶ ساعت استراحت محلول، رسوب های شیری رنگ ظاهر گردید و چندین بار با آب مقطر شستشو و در دمای اتاق خشک گردید.

گرافت کیتوسان به منومر اسیدی (b):

۰/۵۸۶ گرم کیتوسان همراه با ۰/۶۴۵ گرم منومر تترا اسید را در ۵۰ میلی لیتر بافر MES به مدت یک ساعت در دستگاه سونیکیت قرار داده و پس از پایان این مدت، مخلوط واکنش به یک بالن سه دهانه منتقل گردید، در این مرحله ۰/۴۳۲ گرم EDC و ۰/۵ گرم NHS را تدریجا و به مدت ۲۰ دقیقه به مخلوط واکنش اضافه کرده و همزمان نیز گاز نیتروژن به داخل بالن دمیده شد. سپس محتویات بالن به بشر ۱۰۰ میلی لیتر منتقل و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق در حمام سونیکیت قرار داده شد.



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

سپس مخلوط واکنش در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی و برای مدت ۴۸ ساعت با دور همزن ثابت، هم خورد. بعد از پایان این مدت رسوبات حاصله توسط سینتر گلاس فیلتر، و چندین بار با اسید استیک ۰/۱ مولار شستشو و در دمای اتاق خشک گردید.

تهیه ی پلیمر بر پایه ی کیتوسان (C):

سیستم انجام واکنش تحت جو نیتروژن تعیین گردید. ۱.۶ گرم از محصول تولید شده در مرحله ی قبل (b) وزن کرده و در یک بالن دو دهانه ی ۱۰۰ میلی لیتری مجهز به همزن مغناطیسی در ۱۰ گرم از مایع یونی حل شد. سپس ۱.۱۶ گرم از دی آمین بنزیدین به بالن اضافه گردید و پس از چند دقیقه هم خوردن و همگن شدن محلول، ۱ میلی لیتر تری فنیل فسفیت را که نقش کاتالیزوری دارد را به مخلوط واکنش اضافه شد و پس از سیر شدن محفظه ی واکنش با گاز نیتروژن، دمای واکنش به آرامی تا ۱۲۰ درجه ی سانتیگراد بالا برده شد و برای ۱۲ ساعت در این دما همزده شد. پس از ۱۲ ساعت مخلوط قهوه ای تیره رنگ همگنی حاصل شد که پس از سرد شدن در دمای اتاق در ۵۰۰ میلی لیتر متانول رسوب دادیم. رسوبهای زرد مایل به قهوه ای ته نشین شده در ته ظرف که نشان دهنده ی پلیمر سنتز شده می باشد (شکل ۱).



مجموعه مقالات

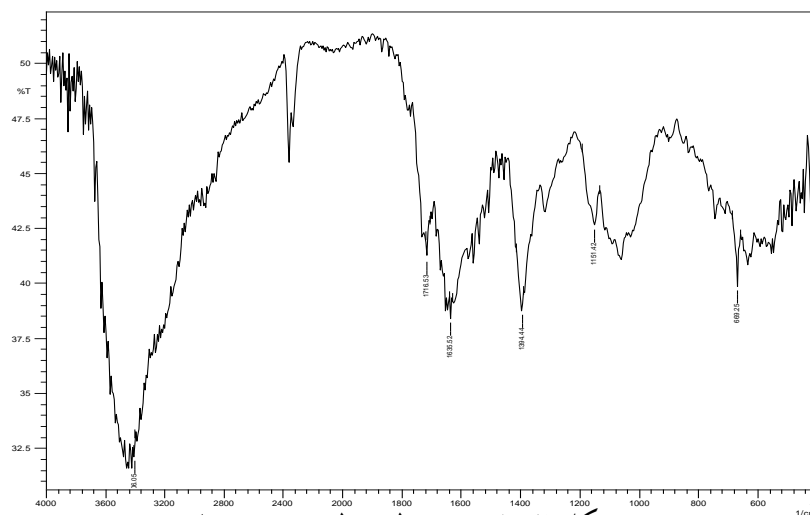
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

نتایج و بحث:

نتایج مربوط به تایید ساختار در شکل ۱ موجود می باشد.

نتایج مربوط به طیف IR: 669.25 cm^{-1} ، مربوط به ارتعاش کششی گروه C-H آروماتیک ها می باشد، پیک در ناحیه 1151 cm^{-1} مربوط به گروه سولفون O=S=O، 1635 cm^{-1} مربوط به کربونیل گروه اسیدی و 1716 cm^{-1} مربوط به گروه کربونیل داخل حلقه و پیک موجود در 3406 cm^{-1} مربوط به O-H گروه اسیدی می باشد.



شکل ۲. نتایج مربوط به طیف سنجی پلیمر سنتز شده

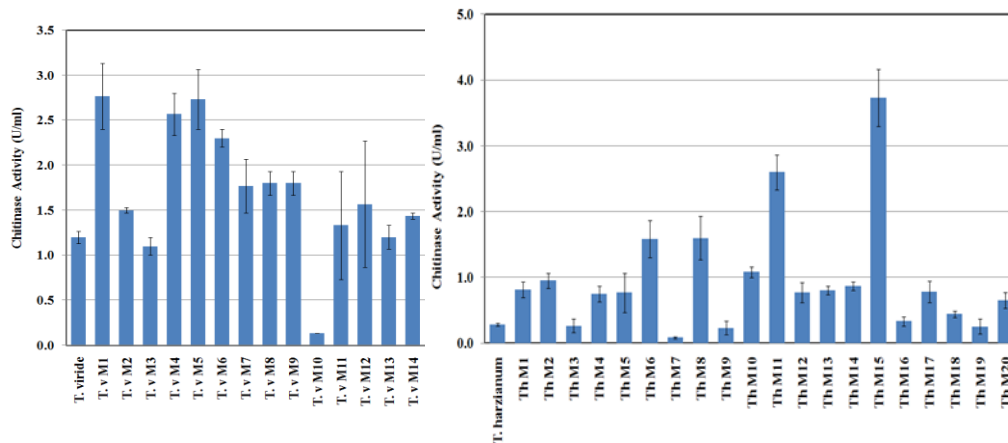
در گونه *T. viride* جدایه های موتانت *T. v M1*، *T. v M5*، *T. v M4* و *T. v M6* بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. در گونه *T. harzianum* جدایه های موتانت *T. h M15*، *T. h M11*، *T. h M8* و *T. h M6* بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. نتایج آزمون SDS-PAGE دلالت بر حضور آنزیم های کیتیناز و کیتوزاناز در جدایه های مختلف را داشت. بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه *T. v M19* و *T. h M15* مشاهده شد که دارای بالاترین مقادیر آنزیم های اندوکیتینازی (۴۲ و ۳۱ KDa) و آنزیم β -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase (۷۳ KDa) بود.



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)



شکل ۳. مقایسه میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن

نتایج این مطالعه به روشنی نشان می دهد که القای موتاسیون با پرتو گاما در قارچ تریکودرما منجر به بهبود تولید آنزیم های کیتیناز در قارچ تریکودرما می شود. اندازه گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از پلیمر پلی آمید-ایمید بر پایه کیتوزان مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبسترای کیتینی نشان داد.

References

- [1] Eubeler JP, Bernhard M, Zok S, Knepper TP. Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. Trends Anal. Chem. 2009;28:1057-1072.
- [2] Funabashi M, Ninomiya F, Kunioka M. Biodegradability evaluation of polymers by ISO 14855-2. Int. J. Mol. Sci. 2009;10:3635-3654.
- [3] Arvanitoyannis I, Nikolaou E, Yamamoto N. Novel biodegradable copolyamides based on adipic acid, bis(p-aminocyclohexyl) methane and several α -amino acids: synthesis, characterization and study of their degradability for food packaging applications: 4. Polymer. 1994;35:4678-4689.
- [4] Vert M. Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. Biomacromolecules. 2005;6: 538-546.



مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

[5] Sun H, Meng F, Dias AA, Hendriks M, Feijen J, Zhong Z. α -amino acid containing degradable polymers as functional biomaterials: rational design, synthetic pathway, and

biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2011;12: 1937–1955.

[6] Li J, Kong M, Cheng XJ, Li JJ, Liu WF, Chen XG. A facile method for preparing biodegradable chitosan derivatives with low grafting degree of poly(lactic acid). *Int. J.*

Biol. Macromol. 2011;49:1937–1021.

[7] Okamura A, Hirai T, Tanihara M, Yamaoka T. Synthesis and properties of novel biodegradable polyamides containing α -amino acids. *Polymer*. 2002;43:3549–3554.