مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بررسی کاربرد پرتوی گاما در استخراج پلیمر زیست تخریب‌پذیر کیتوزان از کیتین و کاربرد آن بعنوان آفت‌کش زیستی (مقاله مروری)

حمیده قراملکی*- فریور حریری - محسن صفی خانی- هادی لایقتر
آذربایجانشرقی–بناب– مجتمع پژوهشی شمالغرب کشور
تلفن: ۳-۰۴۱۳۷۷۸۰۲۰۱ فکس: ۰۴۱۳۷۷۸۰۲۰۵، *hgharamaleki@bnrc.ir

چکیده: قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌هایی که در مرحله بعد از برداشت در گیاهان رشد می‌کنند، منجر به کاهش کیفیت و کمیت آنها می‌شوند. یکی از راه حل‌های این مشکل در حال حاضر استفاده از آفت‌کش‌هاست، که دارای اثرات منفی برای گیاهان و سلامت انسان هستند. به همین دلیل وجود یک روش جایگزین ایمن‌تر به منظورکنترل فرسایش بعد از برداشت محصولات کشاورزی ضروری است. در طبیعت دومین پلیمر زیست تجدیدپذیر کیتین و مشتقش کیتوزان است که درکنترل فرسایش بعد از برداشت میوه‌ها استفاده شده است. کیتوزان دارای طیف وسیعی از کاربردهای بالقوه در زمینه‌های مختلف علوم شیمی، سیستم‌های بیولوژیکی، علوم غذایی، داروئی و صنایع پزشکی است. کیتوزان بخاطر خصوصیات شکل دهنده–فیلم، عملکرد ضدمیکروبی، فقدان توکسیسیتی، زیست‌تخریب‌پذیری و خصوصیات بیوشیمیایی یکی از پوشش‌های خوراکی ایمن برای حفظ انواع مختلف غذاهاست. پوشش‌های کیتوزان تاریخ مصرف میوه‌ها و سبزیجات را با کاهش سرعت تنفس و کاهش از دست رفتن آب میوه‌ها افزایش می‌دهند. هدف از این مقاله، مروری بر نقش پرتوی گاما در استخراج کیتوزان از کیتین و کاربرد آن بعنوان آفت‌کش زیستی بعد از برداشت محصولات کشاورزی به منظور افزایش تاریخ مصرف آنها می‌باشد.

واژگان کلیدی: پرتوی گاما، کیتوزان، کیتین، آفت‌کش زیستی.

Study application of Gamma irradiation in extraction of chitosan biodegradable polymer from chitin and application it as Bio-pesticide

Hamideh Gharamaleki *, Farivar Hariri, Mohsen Safikhani, Hadi Layeghtar
East Azarbayjan- Bonab- West north research center
*hgharamaleki@bnrc.ir

Abstract: Fungi and microorganisms that in post harvesting period grow in plants, leading to decline in their quality and quantity. One of the solutions to this problem in the present is the use of pesticides, which has negative consequences for plants and human health. For this reason, there is a safer alternative to control erosion after harvest is essential. In nature the second of bio- renewable polymer is chitin and its derivatives that are used for control erosion after post-harvest for fruits. Chitosan has a wide range of potential applications in various fields of chemical, biological systems, food science, pharmaceutical and medical industries. Because of the forms-film properties, antimicrobial actions, lack of toxicity, biodegradability and biochemical characteristics chitosan is one of safe edible coatings for maintain different types of foods. Chitosan coatings increasing shelf life of fruits and vegetables through reducing their respiratory rate and juices. The aim of this article is review on role of gamma irradiation in extraction chitosan from chitin and its use as a bio-pesticide after harvesting agricultural products for increase of their shelf life.

Keywords: Gamma ray, Chitosan, Chitin, Bio-pesticide

۱-مقدمه

بیماری‌های پارازیتی با تهاجم میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شوند. محیط گرمسیری در فصل گرم و مرطوب برای گسترش پارازیت‌ها خصوصاً قارچ و باکتری مناسب است. این ارگانیسم‌ها وارد مرحله خواب به فرم‌های مقاوم مختلف (کلامیدواسپور، ائوسپور، سیست و ...) در طی دوره‌های خشک می‌شوند. موقعی که شرایط دوباره مساعد شد پارازیت دوباره فعالیتش را از سر می‌گیرد و به فراوانی اسپور تولید می‌کند. آسیب‌های بعد از برداشت اساساً از زخم‌هایی گسترش می‌یابند که قبل از برداشت همچنین در طول و بعد از برداشت رخ می‌دهد. زمانی که اسپورهای قارچی به داخل این زخم‌ها رسوب می‌کنند بسرعت فرسایش میوه رخ می‌دهد. آفت‌کش‌ها دارای اثرات منفی هستند که می‌توانند خطراتی برای گیاهان و سلامت انسان‌ها داشته باشند، همچنین آفت‌کش‌ها علاوه بر کنترل آفت‌ها به میکروارگانیسم‌های سودمندی که در اکوسیستم مقاومند نیز آسیب می‌رسانند [۱]. بیشتر استراتژی‌های جایگزین آفت‌کش‌ها شامل کنترل بیولوژیکی با میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، کاربرد ترکیبات زیست‌فعال گیاهی، نگهداری در یخچال، تیمار حرارتی، فشار بالا و ذخیره در اتمسفر تغییریافته برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت در میوه‌ها و مهار رشد پاتوژن‌ها استفاده شده‌اند. از طرفی تمام این روش‌ها نمی‌توانند بیماری‌های بعد از برداشت را بطور موثری مانند قارچ‌کش‌های سنتتیک کنترل کنند و برخی از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مانند آسیب در خصوصیات کیفی محصولات غذایی، خصوصاً مواد غذایی ناپایدار در حرارت و خصوصیات حسی آنها هستند. کیتوزان از داستیلاسیون کیتین به روش‌های مختلفی تهیه می‌شود که یکی از این روش‌ها امکان استفاده از پرتوی گاما می‌باشد. کیتین و کیتوزان بعنوان آفت‌کش زیستی از سوی آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)[۱] و بعنوان افزودنی غذایی بوسیله سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)[۲] پذیرفته شده‌اند. کیتوزان برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت بیشتر میوه‌ها مانند گلابی، توت‌فرنگی، انگور، گوجه‌فرنگی، مرکبات استفاده شده است [۲].

۲-مواد و روش کار

این مقاله با هدف حل نمودن بخشی از مشکلاتی که در مرحله بعد از برداشت میوه‌ها و سبزیجات با آن روبرو هستیم و بصورت ارائه یکی از کابردهای جدید پرتودهی به منظور استفاده بهینه از مواد اولیه در دسترس پوسته سخت‌پوستان و با استفاده از جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز آنها و سپس ساختن بحثی برای توصیه بهتر نوشته شده است.

۳-روش‌های استخراج کیتوزان از کیتین

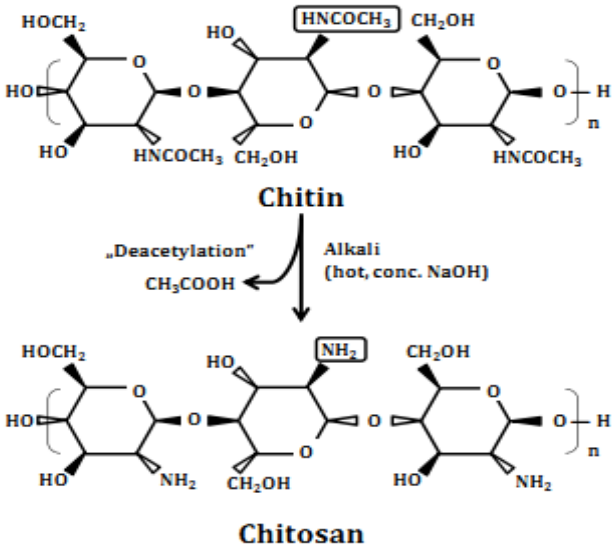
پوسته سخت‌پوستان مانند خرچنگ، میگو، دوکفه‌ایها، مرجان‌ها، عروس‌دریایی و لابسترها اساساً از مخلوطی از کیتین و پروتئین ساخته شده‌اند که بوسیله نمک‌های معدنی سخت شده‌اند [۳]. کیتین بعد از سلولز فراوانترین پلیمر در طبیعت می‌باشد.

[۱] Environmental Protection Agency (EPA)

[۲] Food and Drug Administration (FDA)

تولید صنعتی کیتین شامل چهار مرحله: Demineralization(DM), Deproteinization(DP)، Discoloration(DC), Deacetylation(DA) است. علیرغم گسترش فراوان کیتین در طبیعت، خرچنگ و میگو به عنوان منابع تجاری این ماده مطرح شده‌اند [۴]. برخی از ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی کیتین و کیتوزان عبارتند از:

دسترسی آسان، قابلیت زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی، ایمن، غیرسمی و غیرآلرژیک بودن، چسبندگی خوب، ابر جاذب بودن، خاصیت ضدویروسی و ضدباکتریایی، داشتن خصوصیات انبساط و کشیدگی شدید، عدم حلالیت در آب، خاصیت ژله‌ای شدن، قدرت بالا در جذب مواد رنگی، پلیمر طبیعی، بند آورنده خون [شکل ۱] [۳].



شکل ۱: ساختار شیمیایی کیتوزان و تشکیل آن از کیتین

کیتوزان پلی‌ساکاریدی کاتیونی طبیعی است که با ترکیب پلی (α-۲-آمینو-۲- دی اکسی - β گلوکان) از داستیلاسیون قلیایی کیتین با نام شیمیایی پلی (N-β - استیل گلوکز امین) به ۳ روش شیمیایی، آنزیمی و پرتودهی تهیه می‌شود:

۳-۱ روش شیمیایی: در این روش از اسیدهای مختلف مانند اسید هیدروکلریک، اسید نیتروز، اسید فسفریک و فلوریدهیدروژن برای بدست آوردن اولیگومرکیتوزان به روش دپلیمریزاسیون استفاده می‌شود. تیمار شیمیایی روش بسیار متداول و سریع برای بدست آوردن اولیگومرکیتوزان است، اما این روش دارای قیمت بالا، راندومان محصول کم و مواد زائد اسیدی مانند HCL و... است [۵].

۳-۲ روش آنزیمی: در این روش کیتوزان با وزن مولکولی پایین و حلالیت بالا بوسیله کیتیناز، کیتوزاناز،گلوکاناز، لیپاز و برخی از پروتئازها تولید می‌شود. روش آنزیمی برتر از روش شیمیایی است زیرا دوره هیدرولیز می‌تواند به آسانی

کنترل شود و همچنین تغییرات شیمیایی محصول تولید شده کمتر می‌شود. اما سرعت روش آنزیمی در استخراج کیتین خیلی آهسته است و اولیگومرهای بلندتری بدست نمی‌آید [۵]

۳-۳ پرتودهی: پرتودهی می‌تواند روش مفیدی برای تجزیه پلیمرهای مختلف باشد. اخیراً اثرات پرتودهی روی کربوهیدراتهایی مانند کیتوزان، آلژینات سدیم، سلولاز، پکتین به منظور افزایش استفاده مجدد این منابع زیستی و کاهش آلودگی محیطی بررسی شده است. Lim et al اثرات پرتوی گاما را روی فیبرها و فیلم‌های کیتوزان بررسی کرده و مشاهده کردند که وزن مولکولی و میانگین ویسکوزیته پلیمر با افزایش دز پرتودهی کاهش یافت [۴]. این فرآیند تحت تابش گاما تا دز ۲۰kGy در محلول آبی هیدروکسید سدیم (٪۶۰w/w-٪۴۰) در دمای ۱۰۰-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه نیز انجام می‌گیرد. درجه داستیلاسیون در این فرآیند بالاتر از فرآیند بدون تابش می باشد. جدول ۱ درجات داستیلاسیون کیتین تابش داده شده و تابش داده نشده در دزهای تابشی مختلف و شرایط داستیلاسیون آورده شده است. همانطورکه از جدول بر می‌آید درجه داستیلاسیون برای کیتین بدون تابش‌دهی کمترین مقدار را داشته و درجه داستیلاسیون در دز تابشی ۲۰kGy و ٪۶۰ NaOH در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۶۰ دقیقه بیشترین مقدار را خواهد داشت که به عنوان شرایط بهینه معرفی شده است [۶].

جدول ۱:تغییرات درجه داستیلاسیون با تابش

Dose	40% NaOH 60 °C 60 min		40% NaOH 100 °C 60 min		60% NaOH 60 °C 60 min		60% NaOH 100 °C 60 min	
	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV	Mean ± SD	CV
0.0	38 ± 10.5	0.27	72 ± 4.9	0.07	50 ± 8.5	0.16	77 ± 3.5	0.04
1.5	44 ± 7.0	0.16	76 ± 5.0	0.07	52 ± 11.3	0.21	79 ± 2.1	0.03
6.0	52 ± 6.8	0.13	80 ± 2.12	0.03	59 ± 3.5	0.06	86 ± 16	0.02
10.0	55 ± 5.9	0.10	79 ± 5.65	0.07	62 ± 22	0.29	86 ± 4.2	0.05
20.0	60 ± 11.7	0.18	82 ± 6.3	0.08	62 ± 0.7	0.01	90 ± 2.1	0.02

CV: Coefficient of variation.
SD: Standard deviation.

همچنین EL-Nesr et al در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که پرتودهی پودر پوسته میگو به منظور استخراج کیتین با ۲۵kGy زمان Deproteinization، Demineralisation و Deacetyliation را طبق جدول ۲ کاهش می‌دهد و نیز نشان دادند که کیتوزان‌های بدست آمده از نمونه‌های پرتودهی شده دارای حلالیت بیشتر، درجه داستیلاسیون(DDA) [۱] و وزن مولکولی پایینی هستند [۷].

[۱] Degree of Deacetylation (DDA)

جدول ۲: تاثیر دز پرتودهی روی زمان Deproteinization، Demineralisation و Deacetyliation در پودر پوسته میگو

دز (kGy)	دپروتئینه کردن (ساعت)	دمینرالیزاسیون (ساعت)	زمان داستیلاسیون
۰	۶	۱۰	۸
۲۰	۴	۳	۳
۲۵	۲	۲	۲

٤- تاثیر پوشش کیتوزان در کاهش بیماری‌های بعد از برداشت

براساس تحقیقات Zivanovic پوشش توت‌فرنگی، زغال‌اخته و انگور بوسیله کیتوزان میزان قارچ‌ها را در طول ۱۸ روز ذخیره در دمای $4\ ^oC$ در مقایسه با انواع بدون پوشش کاهش داده بود. آنالیز اتیلن کاهش در سنتز اتیلن را بعلت پوشش‌های کیتوزان نشان داده است. Hewajulige et al در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که کیتوزان در غلظت ٪۱ استحکام میوه‌ها را پس از رسیدگی و دوره نگهداری آنها را به ۱۴ روز در دمای $13/5\ ^oC$ افزایش داده است. Cheah et al در سال ۱۹۹۶ مشاهده کردند پوشش کیتوزان وقوع بیماری سخت شدن ریشه (Sclerotinia rot) بوسیله *clerotinia sclerotiorum* را از ٪۸۰ به ٪۲۰ کاهش داده است. همچنین Du et al در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که کیتوزان بطور معنی‌داری رشد *B.cinerea* را در محیط کشت مصنوعی مهار می‌کند. EL Ghaouth et al در سال ۱۹۹۲ توضیح دادند که ٪۰/۶ کیتوزان رشد رادیکالی *B.cinerea* و *Rhizopus stolonife* را به ترتیب ٪۹۵/۵ و ٪۷۱/۵ مهار می‌کند. همچنین آنها گزارش کردند پوشش کیتوزان میزان از دست رفتن آب خیار و فلفل را کاهش می‌دهد [۱]. گزارش شده است که کیتوزان با وزن مولکولی پایین (LMWC) [۱] بیماری‌های بعد از برداشت را در مرکبات کنترل می‌کند. نتایج دلالت می‌کند که LMWC بطور معنی‌داری فرسایش مرکبات را که بوسیله *Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Botrydiplodion lecanidion and Botrytis cinerea* ایجاد می‌شود بعد از ۱۴ روز ذخیره در $25\ ^oC$ مهار می‌کند. در حالی که کیتوزان با وزن مولکولی پایین بطور موثری در استحکام، میزان مواد جامد محلول، اسیدیته، میزان اسید اسکوربیک و میزان آب مرکبات بعد از ۵۶ روز ذخیره در $15\ ^oC$ تاثیر می‌گذارد. بعلاوه میوه‌هایی که کیتوزان روی آنها اسپری شده بود سفت‌تر و رسیدگی در آنها سرعت آهسته‌تری داشت [۲]. علاوه بر کاربردهای ذکر شده گزارشات زیادی در مورد کاربرد ترکیب کیتوزان با سایر ترکیبات ضدقارچی وجود دارد. Yu et al مشاهده کردند که کیتوزان بصورت ترکیب با Cryptococcus laurentii می‌تواند بطور موثری فساد قارچی ایجاد شده در سیب

[۱] Low Molecular Weight Chitosan (LMWC)

بوسیله *Penicillium expansum* را بعد از ۷ روز انکوباسیون در دمای ۲۰°C مهار کند. نتایج مشابه موقع استفاده از پوشش کیتوزان با کلسیم برای افزایش تاریخ مصرف توت‌فرنگی‌ها و کیتوزان با اتانول روی مهار رشد کپکهای ایجاد شده بوسیله *Botrytis cinerea* در انگور پس از برداشت محصول مشاهده شده است [۲].

۵- مکانیسم عملکرد ضدمیکروبی کیتوزان

بعلت بار مثبت روی C_2 مونومرگلوکزامین زیر pH، کیتوزان محلول‌تر بوده و دارای فعالیت آنتی‌میکروبی بهتری از کیتین است. مکانیسم کامل عملکرد ضدمیکروبی کیتوزان هنوز بطور ناقص است اما مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است:

۵-۱ تاثیر مستقیم کیتوزان روی پاتوژن‌های قارچی

مطالعات متعدد قبلی نشان داده‌اند که کیتوزان می‌تواند بطور مستقیم جوانه‌زنی اسپور، طویل شدن جوانه و رشد میسل پاتوژن‌هایی مانند *Botrytis cinerea*، *Fusarium solani*، *Rhizopus stolonifer*، *Penicillium* و *Sclerotium rolfsii* را مهار کند. Liu et al گزارش کردند که کیتوزان بطور کامل جوانه‌زنی اسپور *P.expansum* را در ۰/۵٪ و *B.cinerea* را در ۱٪ و بطور مشخصی طویل شدن جوانه هر دو پاتوژن را در غلظت بیشتر از ۰/۰۱٪ با آسیب غشاء پلاسمایی مهار کند. دلیل ویژگی ضدمیکروبی کیتوزان بحث‌انگیز مانده است. دو فرضیه در این رابطه وجود دارد: ۱) کیتوزان پلی‌کاتیونی بارهای منفی غشاء سلول را مصرف می‌کند و نفوذپذیری سلول را تغییر می‌دهد، این فعل و انفعال منجر به خروج الکترولیت‌ها و ترکیبات پروتئینازی می‌شود؛ ۲) کیتوزان وارد سلول‌های قارچی شده و مواد غذایی ضروری را جذب می‌کند که این امر سنتز mRNA و پروتئین قارچ‌ها را مهار یا آهسته می‌کند [۲].

۵-۲ القاء مقاومت در برابر بیماری در میوه‌ها

روش عملکرد کیتوزان القاء سیستم‌های پاسخ دفاع طبیعی در گیاهان تیمار شده است. پلی- D-گلوکزآمین به جایگاههای رسپتور قارچ متصل می‌شود و حمله به اسپورهای قارچ را تقلید می‌کند. این امر منجر به آغاز فرستادن سیگنال‌هایی به هسته گیاه و بنابراین شروع سیگنال‌هایی می‌شود که پاسخ‌های چندگانه ژنتیکی و بیولوژیکی شامل تولید فیتوآلکسین‌ها (ترکیبات ضدمیکروب تولید شده در گیاه) با هدف مهار عفونت را القاء می‌کند، این امر پیشنهاد می‌کند موقعی که مقاومت گیاهان خصوصاً در غیاب فشار آفت القاء می‌شود، اغلب یک سازگاری گیاهی در ارتباط با پاسخ وجود دارد، که تغییرات فیزیولوژی، بیوشیمیایی و فراساختاری اتفاق افتاده امکان ایجاد تغییراتی در منابع گیاهی اختصاصی را پیشنهاد می‌دهند [۱]. مشخص شده است که کیتوزان می‌تواند مقاومت در میزبان را با افزایش فعالیتهای چندین آنزیم مربوط به سیستم دفاعی مانند کیتیناز و β-۱-۳- گلوکاناز در نارنجی‌ها، توت‌فرنگی‌ها و تمشک‌ها و فعالیت فنیل‌الانین آمونیا-لیز در توت‌فرنگی‌ها و انگورهای خوراکی القاء کند. نتایج مشابه بوسیله Meng et al در گلابی دیده شده است. کیتوزان بعنوان یک برانگیزاننده

پاسخ‌های دفاعی در گیاهان با فعال کردن اعمال ژنهای مربوط به پاتوژنزیس Pathogenesis-related (PR) مانند کیتیناز، کیتوزوناز، β –گلوکاناز، لیگنین و کالوس شناخته می‌شود [۲].

نتیجه‌گیری

کیتوزان بعنوان محصولی که از پوسته خرچنگ‌ها و میگوها بوسیله فرآوری پرتوی بدست می‌آید برای حفظ محصولات کشاورزی مفید است. نقش کیتوزان نه فقط بعنوان پوشش در میوه‌ها و سبزیجات بلکه همچنین بعنوان افزاینده سیستم دفاعی گیاه قابل توجه می‌باشد. به همین دلیل کیتوزان دارای پتانسیلی برای استفاده گسترده‌تر بعنوان یک آفت‌کش زیستی در مرحله بعد از برداشت در محصولات کشاورزی است.

مراجع

[1] S. D. Yanti, P. T. Nugroho, R. Aprisa and E. Mulyan, “The Potential of chitosan as alternative bio pesticide for postharvest plants”, Asian Journal of Food and Agro-Industry. Special Issue, 241-248 (2009).

[2] H. Zhang, R. Li and W. Liu, “Effects of Chitin and Its Derivative Chitosan on Postharvest Decay of Fruits: A Review”, Int.J.Mol.Sci.12, 917-934 (2011).

[3] E.A. El-hefian, M.M. Nasef and A.H. Yahaya, “Chitosan Physical Forms: A Short Review”, Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 5(5), 670-677 (2011).

[4] Erizal and Thamrin Wikanta, “Synthesis of Polyethylene Oxide –Chitosan Hydrogel prepared by Gamma Radiation Technique”, Indo J Chem. 11 (1),16-20 (2011).

[5] W.S. Choi, K.J. Ahn, D.W. Lee, M.W. Byun, “Preparation of chitosan oligomers by irradiation. Polymer Degradation and Stability”,78, 533-538 (2002).

[6] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, R.Gurny ,”Structure and Interactions in Chitosan Hydrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical Applications”, European Journal of Pharmaceutics and Bio pharmaceutics. 57,35-52 (2004).

[7] E. M. El-Nesr, A. I. Raafat, Sh. M. Nasef, E. A. Soliman and E. A. Hegazy, “Chitin and Chitosan Extracted from Irradiated and non-Irradiated Shrimp Wastes (Comparatives Analysis Study)”, Arab Journal of Nuclear Science and Application. 46 (1), 53-66 (2013).