اولین همایش ملی بهینه سازی و بهره وری
مصرف انرژی در صنایع غذایی و کشاورزی
۲۹-۳۰ اردیبهشت ۱۴۰۵

مدیریت پسماند و بازیافت انرژی درصنایع کشاورزی وغذایی

تینا خبری[۱*]، حنانه رضایی[۲]، پانیذ فرامرزی[۳]، بابک کرمی[۴]

۱: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی،دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد تهران شمال، تهران،ایران

Email:iranscience20@gmail.com

۲: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی،دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد تهران شمال، تهران،ایران

۳: دانشجوی کارشناسی گروه صنایع غذایی،دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد تهران شمال، تهران،ایران

۴: استاد یار گروه صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال،تهران ،ایران

چکیده

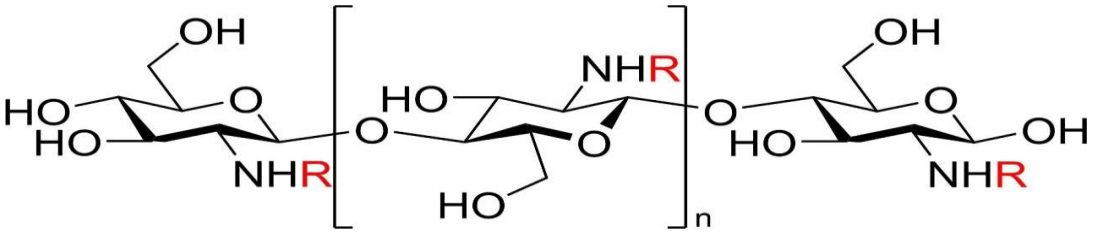
کیتین پس از سلولز، دومین پلی‌ساکارید طبیعی فراوان در طبیعت است. الیگومرهای با وزن مولکولی پایینِ محصول دِاستیلاسیون قلیاییِ آن، یعنی کیتواولیگوساکاریدها (Chitooligosaccharides; COS)، دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های زیستی بوده و چشم‌اندازهای کاربردی مهمی در صنایع غذایی، دارویی و سایر صنایع دارند. COS می‌توانند از طریق روش‌های فیزیکی، شیمیایی یا آنزیمی تولید شوند که هر یک مزایا و معایب خاص خود را دارند. فعالیت‌های زیستی COS تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها قرار می‌گیرد، اما سازوکارهای این تأثیرات به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. ازاین‌رو، این مقاله مروری به بررسی سنتز COS، فعالیت‌های زیستی آن‌ها از جمله فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت کاهنده کلسترول خون و افزایش جذب کلسیم و نیز سازوکارهای این فعالیت‌ها در ارتباط با وزن‌های مولکولی متفاوت و درجات مختلف پلیمریزاسیون می‌پردازد؛ همچنین کاربردهای آن‌ها در صنعت غذا مورد بحث قرار می‌گیرد. در نهایت، بر ضرورت شناسایی و مشخصه‌یابی جامع COS و روشن‌سازی سازوکارهای مولکولی آن‌ها تأکید شده است تا تجاری‌سازی و کاربرد گسترده‌تر COS در صنعت غذا بیش از پیش تسهیل شود.

کلمات کیدی: کیتین ،کیتواولیگوساکاریدها،دِاستیلاسیون قلیایی،پلی‌ساکاریدهای طبیعی

۱ .مقدمه

کیتین یک پلی‌ساکارید آمینه‌دار، نامحلول در آب و دارای بار مثبت است که عمدتاً از پوسته‌های انواع سخت‌پوستان دریایی و دیواره‌های سلولی قارچ‌ها به‌دست می‌آید؛ کیتین پس از سلولز، دومین پلیمر طبیعی فراوان در طبیعت محسوب می‌شود. کیتوسان می‌تواند از طریق دِاستیلاسیون (حذف گروه‌های استیل) کیتین تحت شرایط قلیایی تولید شود و یک بیوپلیمر غیرسمی است. کیتوسان یک پلی‌ساکارید خطیِ بازی است که از واحدهای-D گلوکزامین (GlcN) متصل به‌وسیله پیوندهای گلیکوزیدی β-1,4 تشکیل شده و مقدار کمی از-N استیل-D-گلوکزامین (GlcNAc) باقیمانده نیز در ساختار آن وجود دارد. نسبت این دو واحد ساختاری با عنوان «درجه دِاستیلاسیون (Degree of Deacetylation; DD) «بیان می‌شود GlcN .در pH خنثی یا فیزیولوژیک پروتونه می‌شود و در نتیجه، کیتوسان دارای بار مثبت کلی بوده و شامل گروه‌های متعدد +NH3– است .کیتوسان دارای فعالیت‌های زیستی متنوعی از جمله فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتوموری است. با این حال، کیتوسان به‌سختی در آب و در اغلب حلال‌های آلی حل می‌شود . که این ویژگی، اصلی‌ترین محدودیت کاربرد آن در صنایع غذایی، زیست‌پزشکی، کشاورزی و سایر حوزه‌ها به شمار می‌رود. افزون بر این، کیتوسانی که وزن مولکولی (Molecular Weight; MW) آن برابر یا بیشتر از ۲۲ کیلو دالتون باشد، به دلیل وزن مولکولی بالا، ساختار بلوری فشرده و نبود آنزیم‌هایی که قادر به تجزیه کیتوسان در دستگاه گوارش انسان باشند، از فراهمی زیستی روده‌ای بسیار پایینی در انسان برخوردار است. با این وجود، پیوندهای گلیکوزیدی موجود در کیتوسان نسبتاً ناپایدار هستند و می‌توانند به‌وسیله روش‌های فیزیکی، شیمیایی یا آنزیمی شکسته شوند تا کیتواولیگوساکاریدها (Chitooligosaccharides; COS)با درجه پلیمریزاسیون قابل‌کنترل تولید شوند .COS به‌عنوان الیگومر کیتوسان، عمدتاً از واحدهای GlcN تشکیل شده است که به‌وسیله پیوندهای گلیکوزیدی β-1,4 به یکدیگر متصل شده‌اند.ساختار شیمیایی آن در شکل ۱ نشان داده شده است COS تنها الیگوساکارید آمینه‌ای با بار مثبت، کاتیونی و بازی است که از یک منبع طبیعی به‌دست می‌آید و دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مفیدی از جمله غیرسمی بودن برای انسان، حلالیت بالای آبی، ویسکوزیته پایین، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری است .[1] در مقایسه با کیتین و کیتوسان، میانگین وزن مولکولی(MW) ، درجه پلیمریزاسیون (Degree of Polymerization; DP) و درجه استیلاسیون (Degree of Acetylation; DA)در COS نسبتاً پایین‌تر است .COS دارای سه گروه عاملی در موقعیت‌های) C-2 آمینو/استامیدو(، C-3(هیدروکسیل ثانویه) و C-6 (هیدروکسیل اولیه) است .به‌طور کلی، وزن مولکولی COS کمتر از ۳.۹ کیلو دالتون بوده و درجه پلیمریزاسیون آن در محدوده ۲ تا ۲۰ قرار دارد، اگرچه در برخی گزارش‌ها، کیتوسان‌هایی با وزن مولکولی و DP بالاتر نیز به‌عنوان COS نام‌گذاری شده‌اند. حلالیت پایین در آب، دلیل اصلی آن است که فعالیت‌های زیستی کیتین و کیتوسان در عمل به‌طور کامل قابل بهره‌برداری نیست .در مقابل، COS می‌تواند به‌طور کامل در آب حل شود و در برخی حلال‌های آلی مانند متانول و دی‌متیل‌سولفوکسید به‌طور جزئی حل‌پذیر است، اما در استون و اتانول نامحلول می‌باشد. علاوه بر این، حلالیت COS با DP و MW تغییر می‌کند. COS با DP برابر ۲ تا ۴ در متانول محلول است، اما زمانی که DP بزرگ‌تر از ۵ باشد، حلالیت آن کاهش می‌یابد. COS با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۱.۵ کیلو دالتون) دارای نیروهای بین‌مولکولی ضعیفی مانند نیروهای واندروالس است، بنابراین در بازه وسیعی از pH قابلیت حل شدن دارد. افزون بر این

موارد، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فعالیت‌های زیستی مختلف COS همچنین به درجه دِاستیلاسیون، توزیع وزن مولکولی (چندپراکنی یا Polydispersity; PD) و الگوی N-استیلاسیون (Pattern of Acetylation; PA) یا توالی آن نیز وابسته هستند.



شکل ۱. ساختار شیمیایی COS : ’R‘ می‌تواند بسته به درجه دی‌استیلاسیون (DD) یا هیدروژن (H) یا گروه استیل (CH3COO—) باشد. مقدار n = درجه پلیمریزاسیون 20–2 = (DP) است.

COSدارای فعالیت‌های زیستی گوناگونی است که از جمله آن‌ها می‌توان به فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، آنتی‌اکسیدانی، کاهنده کلسترول خون(hypocholesterolemic) ، ضدالتهابی، ضدتوموری، فعال‌سازی ایمنی گیاه و تقویت سیستم ایمنی اشاره کرد .[2] در مقایسه با کیتین و کیتوسان، حلالیت بالای COS در آب و ویسکوزیته پایین آن سبب می‌شود که این ترکیب بتواند فعالیت‌های زیستی خود را در محصولات غذایی و دارویی به‌مراتب مؤثرتر اعمال کند. نفوذپذیری بالای COS از غشای سلولی و فراهمی زیستی بالای آن در روده نیز ارزش کاربردی این ماده را افزایش می‌دهد [3] بر این اساس، COS در سال‌های اخیر توجه پژوهشی گسترده‌ای را به خود جلب کرده است، به‌ویژه در زمینه کاربرد آن در غذاهای تغذیه‌ای و عملکردی با هدف بهبود سلامت انسان. از آنجا که سازوکارهای زیستی عملکرد COS چندوجهی و چندسطحی هستند و شامل برهم‌کنش‌های پیچیده میان سلول‌ها، مولکول‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی می‌باشند، انجام پژوهش‌های عمیق و دقیق برای روشن‌سازی این سازوکارهای عملکردی ضروری است تا زمینه برای کاربرد عملی COS در صنعت غذا فراهم شود. بنابراین، این مقاله مروری به بررسی روش‌های آماده‌سازی COS، چندین فعالیت زیستی مهم و سازوکارهای مربوط به آن‌ها می‌پردازد و همچنین کاربردهای COS در صنعت غذا و روندهای بالقوه توسعه آن در آینده را معرفی می‌کند.

۲ .تهیه (Preparation) کیتواولیگوساکاریدها(COS)

محصولات آبزی، مانند صدف‌داران، یکی از منابع مهم تأمین پروتئین برای انسان به شمار می‌روند، اما حدود ۷۵٪ از وزن کل آن‌ها در طی فرایندهای صنعتی به محصولات جانبی (ضایعات) تبدیل می‌شود .در میان این ضایعات، پوسته‌های میگو و خرچنگ اقتصادی‌ترین و اصلی‌ترین منابع کیتین و کیتوسان محسوب می‌شوند. کیتوسان استخراج‌شده را می‌توان به‌وسیله روش‌های فیزیکی، شیمیایی یا آنزیمی تجزیه کرد تا کیتواولیگوساکاریدهای محلول در آب (COS) با وزن مولکولی پایین تولید شوند. هر یک از این سه روش تهیه، مزایا و معایب خاص خود را دارند و همچنین تأثیرات متفاوتی بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی COS از جمله وزن مولکولی (Molecular Weight; MW) و درجه پلیمریزاسیون (Degree of Polymerization; DP) اعمال می‌کنند. این مزایا و معایب هر یک از روش‌های تهیه در جدول ۱ به‌طور خلاصه ارائه شده‌اند.[1]

جدول ۱. مزایا و معایب روش‌های تهیه COS

Methods	Advantages	Disadvantages
Physical degradation	High purity, little pollution	High energy consumption, low productivity
Chemical degradation	Simple operation, low production cost	Complex products, toxic by-products, high pollution
Enzymic degradation	High specificity, high productivity, mild reaction, stable product quality	High production cost

۲.۱ .تخریب فیزیکی

روش‌های فیزیکی متعددی برای تهیه کیتواولیگوساکاریدها (COS) وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به تیمار فراصوتی (اولتراسونیک)، تابش فرابنفش و تابش مایکروویو اشاره کرد .[1] در فرآیند فراصوت، پیوندهای گلیکوزیدی کیتوسان کاملاً داستیله‌شده به‌صورت مکانیکی شکسته می‌شوند و COS با وزن‌های مولکولی (MW) و درجات پلیمریزاسیون (DP) متفاوت می‌توانند از طریق یک سازوکار تخریب دومرحله‌ای و بدون فعال‌سازی حرارتی تهیه شوند؛ در این روش، محصولی با بازده بالای کیتوتریوز با DP در محدوده ۲ تا ۱۱ حاصل می‌شود .با این حال، تیمار فراصوتی دارای مصرف انرژی بالایی است و ممکن است منجر به بروز واکنش‌های جانبی نیز شود، از جمله تولید رادیکال‌های آزاد یا اکسیدها. علاوه بر این، گرمای ایجادشده در اثر فرآیند فراصوت می‌تواند بر پایداری و فعالیت زیستی COS تأثیر منفی بگذارد. از سوی دیگر، تابش کیتوسان استخراج‌شده از میگو با پرتوهای گامای Co-60 موجب کاهش وزن مولکولی پلیمر می‌شود، در حالی که تأثیر چندانی بر ویژگی‌های شیمیایی آن ندارد. در سال‌های اخیر، فناوری کاویتاسیون هیدرودینامیکی برای تخریب پلیمرهای آلی به کار گرفته شده است. در مقایسه با سایر روش‌های فیزیکی، این فناوری دارای کارایی بالا و مصرف انرژی پایین‌تری است. در این روش، کیتوسان با استفاده از کاویتاسیون ایجادشده توسط یک دستگاه مبتنی بر توربین با موفقیت تخریب شد، به‌طوری که ویسکوزیته آن به میزان ۸۳.۶۵ درصد کاهش یافت، بدون

آن‌که تغییر قابل‌توجهی در ساختار شیمیایی آن مشاهده شود .اگرچه تهیه COS از طریق تخریب فیزیکی از آلودگی جلوگیری کرده و فرآیند خالص‌سازی را تسهیل می‌کند، اما در مقایسه با هیدرولیز شیمیایی یا آنزیمی، انرژی‌برتر بوده و بازده کمتری دارد[1].

۲.۲ .تخریب شیمیایی

تخریب شیمیایی متداول‌ترین روش سنتی برای تهیه COS محسوب می‌شود و معمولاً از طریق هیدرولیز اسیدی یا تخریب اکسیداتیو انجام می‌گیرد. اسیدهایی که برای هیدرولیز کیتوسان مناسب هستند شامل اسید کلریدریک، اسید سولفوریک، اسید فسفریک، اسید نیترو و اسید هیدروفلوئوریک می‌باشند[4] ، و غلظت اسید نقش تعیین‌کننده‌ای در سرعت دپلیمریزاسیون دارد. کیتوسان کاملاً-N داستیله‌شده با استفاده از اسید کلریدریک غلیظ دپلیمریزه شد و سپس COSبا محدوده DP برابر ۲ تا ۱۲ از طریق رسوب‌دهی انتخابی محصولات هیدرولیز به دست آمد. گرچه هیدرولیز با غلظت بالای اسید موجب نرخ بالای دپلیمریزاسیون می‌شود، اما مراحل خالص‌سازی پس از آن می‌تواند نسبتاً دشوار باشد. در مقابل، تیمار کیتوسان با اسید سولفوریک رقیق در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد منجر به تولید کیتوسانی با وزن مولکولی پایین و خلوص بالاتر از ۸۰ درصد شد. پراکسید هیدروژن، به‌عنوان یک عامل اکسیدکننده قوی، برای هیدرولیز کیتوسان در حضور کاتالیز همگن اسید فسفوتنگستیک مورد استفاده قرار گرفت و در این فرآیند، COSبا DP در محدوده ۲ تا ۹ و بازده ۹۲.۳ درصد حاصل شد .تخریب کیتوسان توسط پراکسید هیدروژن تحت تأثیر غلظت پراکسید هیدروژن و دمای واکنش قرار دارد؛ به‌طوری که تیمار کیتوسان با ۴ درصد پراکسید هیدروژن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت، منجر به تولید COS با بازده ۹۷.۵۷ درصد و وزن مولکولی ۴.۲ کیلو دالتون شد. علاوه بر این، ازن، سدیم پربورات و پرسولفات پتاسیم نیز می‌توانند برای تخریب اکسیداتیو کیتوسان مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه روش‌های شیمیایی از نظر عملیاتی نسبتاً ساده هستند، اما محصول نهایی دارای توزیع وزن مولکولی گسترده و ترکیب پیچیده‌ای است که نیازمند مراحل جداسازی و خالص‌سازی پرهزینه می‌باشد. افزون بر این، کیفیت COS ممکن است تحت تأثیر واکنش‌های شیمیایی شدید قرار گیرد؛ واکنش‌هایی که مصرف بالای مواد شیمیایی را به همراه داشته و ممکن است پسماندهای سمی تولید کنند که برای محیط‌زیست زیان‌بار هستند.[1]

۲.۳ .تخریب آنزیمی

در روش تخریب آنزیمی، از آنزیم‌ها برای شکستن انتخابی پیوند گلیکوزیدی β-1,4 در ساختار کیتوسان استفاده می‌شود که در نتیجه آن، کیتواولیگوساکاریدهایی (COS) با درجه پلیمریزاسیون (DP) و وزن مولکولی (MW) مشخص و قابل‌کنترل تولید می‌گردند. آنزیم‌هایی که معمولاً برای تهیه COS به کار می‌روند شامل آنزیم‌های اختصاصی مانند کیتوساناز (chitosanase) و کیتیناز (chitinase) و همچنین آنزیم‌های غیراختصاصی مانند سلولاز، لیپاز، آمیلاز، پروتئاز، لیزوزیم، همی‌سلولاز و پکتیناز هستند. ژن‌های کیتوساناز در موجودات زنده مختلفی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و برخی جانوران و گیاهان شناسایی شده‌اند؛ در این میان، گونه‌های Streptomyces و Bacillus منابع اصلی این ژن‌ها به شمار می‌روند و الگوی محصولات حاصل از فعالیت کیتوسانازها به منبع آنزیمی بستگی دارد. ژن کیتوساناز استخراج‌شده از Streptomyces albolongus ATCC 27414 در باکتری Escherichia coli بیان شد و مشخص گردید که این آنزیم از نوع اگزو-اکتیو (exo-acting) با وزن مولکولی ۲۹.۶ کیلو دالتون است و بیشترین فعالیت خود را در pH برابر ۸.۰ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد؛ محصولات اصلی حاصل از فعالیت این آنزیم شامل-D

گلوکزامین و کیتوبیوز بودند. همچنین، یک کیتوساناز اگزو-اکتیو دیگر از قارچ Gongronella butleri شناسایی شده است که قادر است نه‌تنها پیوند GlcN–GlcN در کیتوسان، بلکه پیوندهای GlcN–GlcNAc و GlcNAc–GlcN را نیز بشکند و کیتوبیوز را به‌عنوان محصول اصلی تولید کند.[5] از آنجا که در ساختار کیتوسان برخی جایگاه‌های برشی وجود دارند که نسبت به آنزیم‌های غیراختصاصی حساس هستند، هیدرولیز آنزیمی غیراختصاصی نیز می‌تواند برای تولید COS مورد استفاده قرار گیرد. برای مثال، از آنزیم پاپائین جهت هیدرولیز جزئی کیتوسان استفاده شد که منجر به تولید-N استیل‌گلوکزامین، -Dگلوکزامین و COS با درجه پلیمریزاسیون ۲ تا ۵ گردید .با این حال، از آنجا که کیتوسان بستر طبیعی این آنزیم‌های غیراختصاصی نیست، نبود ویژگی اختصاصی در آن‌ها منجر به بازده تخریب نسبتاً پایین و میزان تجزیه محدود می‌شود. برای افزایش کارایی، در بسیاری از مطالعات از ترکیب چند آنزیم غیراختصاصی به‌صورت هم‌زمان برای هیدرولیز کیتوسان و تولید COS استفاده شده است. به‌عنوان نمونه، با استفاده از مخلوطی از آمیلاز، سلولاز و پکتیناز تجاری، COSبا وزن مولکولی ۱۰۰۰ تا ۴۰۰۰ دالتون از طریق تخریب متقاطع انتخابی کیتوسان در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۵.۳ با بازدهی بیش از ۹۰ درصد به‌دست آمد .روش تخریب آنزیمی تأثیر بسیار کمی بر ساختار شیمیایی و فعالیت‌های زیستی COS دارد و شرایط واکنش در این روش ملایم، غیرسمی و قابل‌کنترل بوده و تقریباً هیچ واکنش جانبی قابل‌توجهی در آن رخ نمی‌دهد. علاوه بر این، در این روش نیازی به استفاده از معرف‌های شیمیایی نیست و در نتیجه آلودگی زیست‌محیطی به حداقل می‌رسد. با این حال، به دلیل هزینه بالای استخراج، خالص‌سازی و تغلیظ محصولات COS، صنعتی‌سازی این روش با دشواری‌هایی مواجه است [6]

۳. فعالیت‌های زیستی COS و سازوکارهای عملکرد آن‌ها

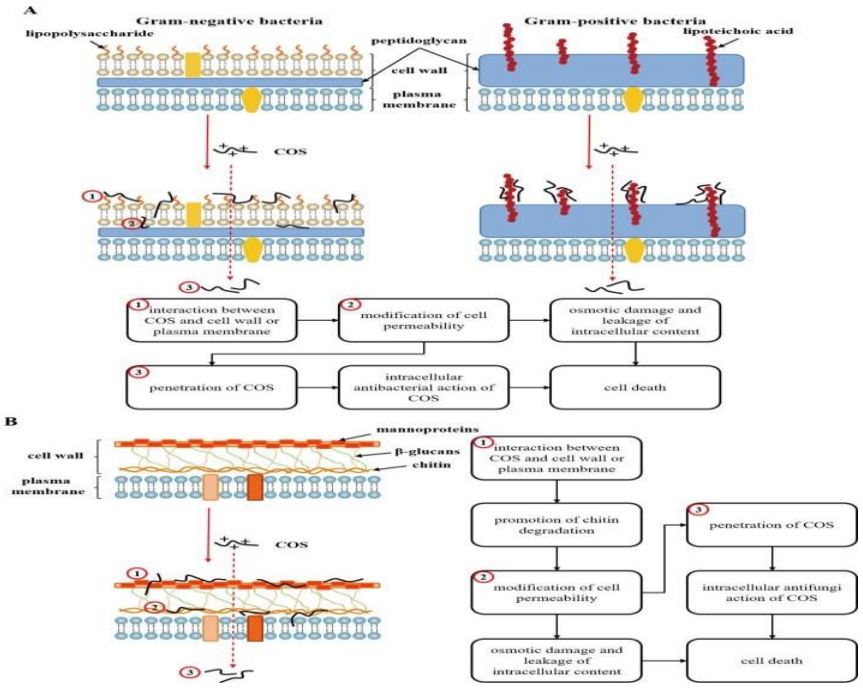
۳.۱ .فعالیت ضدمیکروبی و سازوکار اثر

فعالیت ضدمیکروبی با طیف وسیع کیتوسان و مشتقات آن نخستین‌بار در سال ۱۹۷۹ گزارش شد کیتواولیگوساکاریدها (COS) به‌عنوان محصولات دپلیمریزاسیون کیتوسان، همچنین دارای اثر مهاری بر دامنه گسترده‌ای از ریزسازواره‌ها از جمله *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* هستند .[7]فعالیت ضدقارچی COS علیه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus fumigatus* از طریق اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری (Minimum Inhibitory Concentration)و میزان مهار رشد میسلیوم مورد ارزیابی قرار گرفته است .[8] در مقایسه با ضدعفونی‌کننده‌های تجاری، COSفعالیت ضدمیکروبی بالایی با طیف اثر گسترده نشان می‌دهد و در عین حال سمیت کمی برای سلول‌های جانوری و گیاهی دارد. برای بهره‌برداری کامل از عملکرد ضدمیکروبی COS در صنایع غذایی، زیست‌پزشکی و کشاورزی، ضروری است که سازوکارهای اثر آن‌ها به‌طور جامع و دقیق روشن شوند. عملکرد ضدمیکروبی COS توسط وزن مولکولی(MW) ، درجه پلیمریزاسیون و درجه داستیلاسیون آن تعیین می‌شود که در میان این عوامل، وزن مولکولی بیشترین تأثیر را دارد .گزارش‌های پیشین نشان داده‌اند که فعالیت ضدباکتریایی کیتوسان با افزایش وزن مولکولی تا رسیدن به یک وزن مولکولی بحرانی برای فعالیت بالا (Critical Molecular Weight; CMW) افزایش می‌یابد؛ پس از آن، فعالیت نسبتاً ثابت می‌ماند، و نشان داده شده است که COS با وزن مولکولی بالاتر از فعالیت بیشتری برخوردارند. با این حال، در برخی موارد اثر ضدباکتریایی COS با وزن مولکولی پایین قوی‌تر گزارش شده است.[9] فعالیت ضدقارچی پلیمرهای کوچک کیتوسان علیه *Fusarium graminearum* بیشتر از پلیمرها و الیگومرهای بزرگ‌تر است، در حالی که ترکیب پلیمرهای کیتوسان و COS دارای یک اثر مهاری هم‌افزا و قوی بر جوانه‌زنی اسپورها و رشد قارچی می‌باشد [1]با وجود انجام مطالعات متعدد، تاکنون اجماع روشنی در مورد رابطه بین وزن مولکولی و فعالیت ضدمیکروبی وجود ندارد. کشف

برهم‌کنش‌های هم‌افزا میان کیتوسان و COS با وزن‌های مولکولی مختلف، پیچیدگی فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها را بیش از پیش افزایش داده است. افزون بر این، نبود شفافیت در تعریف و مشخصه‌یابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (از جمله وزن مولکولی، درجه دِاستیلاسیون و درجه پلیمریزاسیون) کیتوسان و COS مورد استفاده در مطالعات مختلف، درک کامل از ترکیب واقعی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند و به بروز نتایج متناقض میان پژوهش‌های گوناگون منجر می‌شود.[1]

۳.۱.۱ .سازوکار فعالیت ضدباکتریایی

حتی پس از سال‌ها پژوهش، سازوکار دقیق فعالیت ضدمیکروبی COS به‌طور کامل روشن نشده است، اما به نظر می‌رسد این فعالیت شامل ترکیبی از برهم‌زدن غشای سیتوپلاسمی، لیز شدن سلول و کی‌لیت‌سازی (chelation) کاتیون‌های فلزی کم‌مقدار باشد که در نهایت رشد طبیعی میکروارگانیسم‌ها را مختل می‌کند. فرضیه رایج و پذیرفته‌شده کنونی این است که از آنجا که COS در pH فیزیولوژیک دارای بار مثبت خالص است، می‌تواند به سطوح دیواره سلولی با بار منفی متصل شود و از طریق برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی، به دیواره سلولی و غشای سلولی آسیب وارد کند. این ویژگی‌ها موجب اختلال در ساختار، عملکرد و نفوذپذیری سلول شده، باعث نشت الکترولیت‌های درون‌سلولی، پروتئین‌ها و سایر اجزای سلولی می‌گردد و در نهایت منجر به لیز شدن و مرگ سلول‌ها می‌شود .از آنجا که چگالی بار مثبت COS با افزایش درجه دِاستیلاسیون (DD) افزایش می‌یابد، COSبا DD بالا برهم‌کنش قوی‌تری با اجزای دارای بار منفی دیواره سلولی باکتری‌ها برقرار می‌کند و در نتیجه، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری از خود نشان می‌دهد. برخی گزارش‌ها نشان می‌دهند که COS علیه باکتری‌های گرم‌منفی مؤثرتر است.زیرا وجود لیپوپلی‌ساکارید (LPS) بر سطح سلول باکتری‌های گرم‌منفی، بار منفی بالاتری به آن‌ها می‌بخشد. با این حال، گزارش‌های دیگری توضیح متفاوتی ارائه کرده‌اند و بیان می‌کنند که باکتری‌های گرم‌مثبت حساسیت بیشتری نسبت به COS دارند، زیرا ستون فقرات اسید تئی‌کوئیک (teichoic acid)در دیواره سلولی آن‌ها غنی از گروه‌های فسفات با بار منفی است. این توضیح اخیر با مشاهده‌ای پشتیبانی می‌شود که نشان می‌دهد تیمار با COS می‌تواند میکروارگانیسم‌ها را به ورود به یک حالت حدواسط نیمه‌کشنده (sublethal intermediate state)وادار کند[10] ، و این پدیده ممکن است با تفاوت در شرایط آزمایشی مانند دما و pH مرتبط باشد .COS قادر است از دیواره سلولی E. coli عبور کند، که این امر نشان می‌دهد ممکن است فعالیت ضدمیکروبی خود را درون سلول اعمال نماید.پس از ورود COS به داخل سلول، آبشاری از پاسخ‌های درون‌سلولی آغاز می‌شود که منجر به افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) می‌گردد؛ این گونه‌ها باعث آسیب‌های ساختاری شده، رونویسی DNA را مهار کرده و به DNA و پروتئین‌ها آسیب وارد می‌کنند. COS همچنین می‌تواند در فعال‌سازی پروتئاز آپوپتوتیک RecA نقش داشته باشد و از این طریق، آپوپتوز یا نکروز را القا کند افزون بر این، COS به‌صورت وابسته به دوز، سطح ATP را در باکتری‌ها کاهش می‌دهد؛ این اثر از طریق مهار سنتز ATP در هر دو باکتری E. coli و S. aureus اعمال می‌شود و در نتیجه، ظرفیت متابولیکی و عملکرد فیزیولوژیک طبیعی آن‌ها را مختل کرده و نهایتاً به مرگ سلولی منجر می‌گردد. سازوکارهای احتمالی زیربنایی فعالیت ضدباکتریایی COS در شکل A۲ نشان داده شده‌اند.[1]



شکل ۲. سازوکارهای زمینه‌ای عملکرد ضد میکروبیCOS

(A)مکانیزم فعالیت ضدباکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی: COS به اجزای دارای بار منفی روی سطح باکتری‌ها متصل می‌شود و باعث تغییر در نفوذپذیری سلول و نشت محتویات داخل سلولی می‌گردد که در نهایت منجر به لیز و مرگ سلولی می‌شود COS .همچنین قادر است دیواره سلولی باکتری‌ها را نفوذ کرده و وارد سلول شود، عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی سلول را مختل کند و در نهایت باعث مرگ باکتری شود. (B) مکانیزم فعالیت ضدقارچی: COS از طریق تعامل الکترواستاتیک به سطح سلول قارچ متصل می‌شود و تخریب کیتین داخل سلول را تحریک می‌کند، که باعث کاهش نفوذپذیری سلول و نشت محتویات داخل سلولی می‌شود. هنگامی که دیواره سلولی قارچ تضعیف شد، COS وارد سلول می‌شود و عملکردی مشابه با فعالیت ضدباکتریایی انجام می‌دهد، که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود.

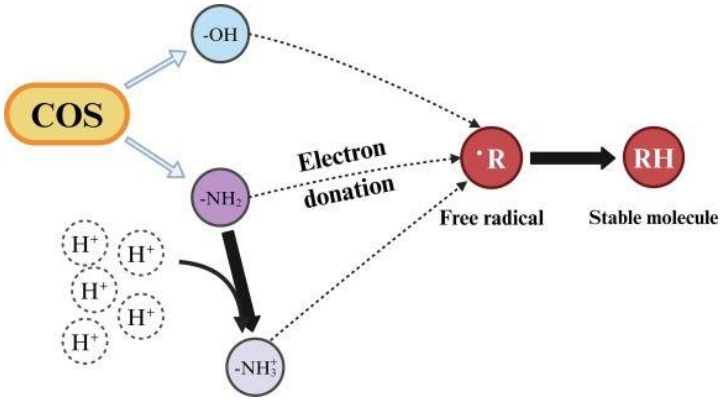
۳.۱.۲ .مکانیزم فعالیت ضدقارچی

مکانیزم ضدقارچی COS مشابه با باکتری‌ها است، به‌طوری که COS با هدف‌گیری مولکول‌های سطح سلول از طریق تعاملات الکترواستاتیک، دیواره و غشای سلولی را تخریب کرده و نشت محتویات سیتوپلاسمی را القا می‌کند. برای مثال، COSبا سلول‌های Candida albicans تعامل می‌کند و باعث تورم شدید و لیز دیواره سلولی می‌شود . درمان با COSهمچنین فعالیت کیتیناز قارچی را افزایش داده و سطح کیتین داخل سلولی را کاهش می‌دهد[11] که این امر تعادل بین تجزیه و سنتز را برهم می‌زند و منجر به تغییر شکل میسلیوم‌ها، تضعیف دیواره سلولی و نشت محتویات سلولی می‌شود. به روشی مشابه با باکتری‌ها، COSمی‌تواند دیواره و غشای سلول قارچ را نفوذ کرده و با بیومولکول‌های داخل سلولی تعامل

داشته باشد. هنگامی که COS وارد سلول‌های قارچ می‌شود، می‌تواند با DNA و یون‌های فلزی داخل سلول، عناصر کمیاب یا مواد مغذی ضروری تعامل کند و بر سنتز mRNA و پروتئین داخل سلولی اختلال ایجاد نماید . [1]مکانیزم‌های احتمالی عملکرد ضدقارچی COS در شکل ۲، بخشB ، نشان داده شده است.

۳.۲ .فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مکانیزم عملکرد

متابولیسم سلولی باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) و سایر رادیکال‌های آزاد می‌شود که می‌توانند به سلول‌ها و بافت‌ها آسیب زده و باعث بروز بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، آسیب ریه، پیری، آترواسکلروز، بیماری پارکینسون و آلزایمر گردند.آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند اثرات مضر رادیکال‌های آزاد را با قطع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو کاهش دهند. اگرچه بیشتر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند butylated hydroxyanisoleو butylated hydroxytoluene اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی دارند، ایمنی آن‌ها به‌عنوان افزودنی غذایی مورد سوال است. بنابراین توسعه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و غیرسمی بسیار مطلوب است.COS و مشتقات آن به‌دلیل قدرت بالای کاهش‌دهندگی کل، قادر به خنثی‌سازی رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید هستند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی COS با مطالعات in vitro و in vivo بر توانایی آن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد در مدل موش با رژیم غذایی پرچرب نشان داده شده است. به‌طور کلی پذیرفته شده است که وزن مولکولی (MW) کیتوسان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن را تعیین می‌کند؛ با کاهشMW ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کیتوسان COS/افزایش می‌یابد. برای مثال، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کیتوسان با MW بالا کمتر از کیتوسان با MW پایین است[1]، که آن نیز کمتر از COS است . با این حال، همه گزارش‌ها هم‌نظر نیستند؛ برای مثال، COSبا DP پایین ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال هیدروکسیل و توان کاهش‌دهندگی بهتری نسبت به DP بالاتر داشت، اما ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال سوپراکسید با افزایش DP افزایش یافته و دارای محدوده بهینه DP بسیار باریکی بود. هیدرولیزات‌های کیتوسان با MW بین ۱.۵ تا ۳۱ kDa همگی توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های ABTS و DPPH را داشتند، اما تغییرات MW تأثیر معنی‌داری بر آن‌ها نداشت .افزون بر این، COSبا MW متوسط ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت و تغییرات در درجه دِاستیلاسیون (DD) به نظر می‌رسد بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تأثیرگذار است؛ ظرفیت با افزایش DD افزایش می‌یابد. سازوکار مولکولی فعالیت خنثی‌سازی رادیکال COS هنوز به‌طور کامل مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد COS با اهدا اتم‌های هیدروژن به رادیکال‌های ناپایدار عمل کرده و آن‌ها را به محصولات پایدارتر تبدیل می‌کند. گروه‌های هیدروکسیل فراوان موجود در COS می‌توانند از طریق اهدا اتم هیدروژن با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند و گروه‌های آمین آزاد باقی‌مانده (–NH2) نیز می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و رادیکال‌های آزاد ماکرومولکولی پایدارتری تشکیل دهند. علاوه بر این، گروه‌های –NH2 می‌توانند در محلول پروتون بگیرند و گروه‌های آمونیوم (NH3+) تشکیل دهند و سپس از طریق واکنش‌های الحاقی با رادیکال‌های آزاد واکنش کنند. این مکانیزم‌ها نشان می‌دهند که تعداد و واکنش‌پذیری گروه‌های هیدروکسیل و آمین، تعیین‌کننده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی COS هستند (شکل ۳).[1]



شکل ۳. تصویر شماتیک از مکانیزم‌های آنتی‌اکسیدانی COS

COS از طریق گروه‌های هیدروکسیل و آمین خود با رادیکال‌های آزاد ناپایدار واکنش می‌دهد. علاوه بر این، گروه‌های آمین می‌توانند در محلول پروتون جذب کرده و گروه‌های آمونیوم (NH3+) تشکیل دهند، که سپس با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آن‌ها را به محصولات پایدار تبدیل می‌کنند.

کیتوسان دارای ساختار فشرده‌ای است، به دلیل پیوندهای هیدروژنی قوی درون مولکولی آن که واکنش‌پذیری گروه‌های عاملی هیدروکسیل و آمین آن را محدود می‌کند. در مقابل، COS دارای ساختار نسبتاً شل‌تری است، با طول زنجیره کوتاه‌تر و پیوندهای هیدروژنی درون‌مولکولی و بین‌مولکولی ضعیف‌تر، که منجر به در دسترس بودن بیشتر و واکنش‌پذیری بالاتر گروه‌های عاملی می‌شود. علاوه بر این، حلالیت بالاتر COS با MW پایین باعث افزایش دسترسی گروه‌های عاملی آن به محیط و در نتیجه واکنش‌پذیری بیشتر آن‌ها با رادیکال‌های آزاد می‌شود. همچنین، وجود گروه‌های آمین آزاد بیشتر در موقعیت C-2 در COS با DD بالا، تشکیل گروه‌های NH3+ را تسهیل می‌کند .تمام این عوامل از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر COS با MW پایین نسبت به COS با MW بالا و کیتوسان پشتیبانی می‌کنند. با این حال، افزایش غلظت گروه‌های واکنش‌پذیر قابل دسترس با افزایش غلظت COS لزوماً باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمی‌شود، زیرا ویسکوزیته بالاتر محلول ممکن است دسترسی گروه‌های هیدروکسیل و آمین را محدود کند و در نتیجه واکنش‌پذیری آن‌ها کاهش یابد [1]

۳.۳ .فعالیت ضدالتهابی و مکانیزم عملکرد

التهاب یک پاسخ طبیعی بیولوژیکی بدن به محرک‌های مختلف است، از جمله آسیب‌های فیزیولوژیکی و عفونت. فرآیندهای التهابی بیش از حد و طولانی‌مدت می‌توانند پیامدهای منفی برای سلامتی ایجاد کنند، از جمله آرتریت، دیابت، آترواسکلروز، آسم، بیماری‌های قلبی-عروقی، بیماری التهابی روده، بیماری‌های پوستی و سایر بیماری‌های فیزیولوژیکی پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها، از جمله موارد ذکر شده، با مشارکت LPS مرتبط است؛ LPS یک جزء دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است و از لیپیدها و پلی‌ساکاریدها تشکیل شده است. به عنوان یک اندوتوکسین، LPSمی‌تواند سلول‌های ماست، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها را در بدن از طریق سیستم سیگنالینگ سلولی فعال کند تا سنتز و ترشح انواع سیتوکین‌ها و واسطه‌های التهابی مانندTNF-α ، IL-1β، IL-4، IL-6، IL-8و IL-13 را تحریک کند، در حالی که ترشح بیش از حد این سیتوکین‌ها باعث تحریک التهاب می‌شود LPS .می‌تواند به گیرنده نوع Toll 4 (TLR4) متصل شود و

مسیرهای وابسته به Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) را فعال کند، که واسطه‌های پایین‌دستی آن می‌توانند ترنسلوکیشن Activator Protein 1 (AP-1) به هسته را تحریک نمایند. به‌طور جایگزین، LPSمی‌تواند Inhibitory kappa B (IκB)را تجزیه کند و باعث ترنسلوکیشن-Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells (NF-κB)به هسته شود. در نتیجه، رونویسی ژن‌های پروالتهابی القا می‌گردد.تعداد زیادی از مطالعات، فعالیت مهاری COS بر پاسخ‌های التهابی القا شده توسط LPS یا سایر محرک‌ها را در مدل‌های سلولی و حیوانی گزارش کرده‌اند. علاوه بر این، مکانیزم احتمالی عملکرد COS نیز پیشنهاد شده است .Vo et al .نشان دادند که بیان ژنیIL-1β ، IL-4، IL-6و TNF-α به طور قابل توجهی در سلول‌های RBL-2H3 که با ۱۰۰۰ µg/ml COS (1–3 kDa)درمان شده بودند، مهار شد. همچنین نشان داده شد که COS می‌تواند فعال‌سازی-Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK1/2)وp38 MAPK ، که واسطه‌های اصلی MAPK هستند، را به‌صورت وابسته به دوز مهار کند .به‌طور مشابه، درمان با COS منجر به کاهش فسفریلاسیون مولکول‌هایMAPK ، به ویژه-C-Jun N terminal kinase (JNK1/2)وp38 MAPK ، در میکروگلیاهای BV2 تحریک شده با LPS شد NF-κB .از دو زیرواحد p65 و p50 تشکیل شده است و LPS می‌تواند O-GlcNAcylation زیرواحد NF-κB/p65 را که توسط-O GlcNAc transferaseکاتالیز می‌شود، القا کند. این امر منجر به فعال‌سازی مسیر NF-κB می‌شود. در مدل‌های سلولی و موش، درمان با COS سطح O-GlcNAcylation زیرواحد NF-κB/p65 را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد و در نتیجه وقوع ترنسلوکیشن NF-κB به هسته کاهش می‌یابد علاوه بر این، نشان دادند که COS Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK)را در سینوویوسیت‌ها فعال می‌کند و بدین ترتیب بیان Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) و Cyclooxygenase 2 (COX-2) القا شده توسط TNF-α را مهار می‌نماید AMPK .همچنین التهاب واسطه‌شده توسط NF-κB را با سرکوب فسفریلاسیون IκB مهار می‌کند[12]

به طور خلاصه، دو مکانیزم اصلی برای فعالیت ضدالتهابی COS گزارش شده است:

۱ .COS .فعال‌سازی MAPK و NF-κB القا شده توسط LPS را مهار می‌کند و بدین ترتیب ترنسلوکیشن هسته‌ای AP-1 و NF-κB کاهش می‌یابد. ۲. فعال‌سازی AMPK توسط COS منجر به کاهش سیتوکین‌ها و واسطه‌های پروالتهابی و همچنین مهار NF-κB می‌شود

قابل توجه است که نشان داده شده فعالیت ضدالتهابی COS ارتباط نزدیکی با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن، به ویژه وزن مولکولی (MW) یا درجه پلیمریزاسیون (DP) دارد. Vo et al. دریافتند که از میان سه COS با محدوده‌های مختلف وزن مولکولی (۱–۳ kDa، ۳ kDa– 5 و ۵–۱۰ kDa)، COS با وزن مولکولی ۱–۳ kDa بیشترین اثر را در مهار ترشح سیتوکین‌ها از سلول‌های ماست دارد .علاوه بر این، فعالیت ضدالتهابی COS با وزن مولکولی پایین‌تر (<۱ kDa) نیز به اثبات رسیده است .به‌طور مشابه نیز مشاهده کردند که COS با DP کمتر از ۸، فعالیت ضدالتهابی برتری نسبت به COS با DP بالاتر نشان می‌دهد .این پدیده ممکن است به دلیل افزایش نفوذپذیری سلولی و توانایی بالاتر در تحویل پروتون توسط COS با MW پایین نسبت به همتایان با MW بالا باشد [1]

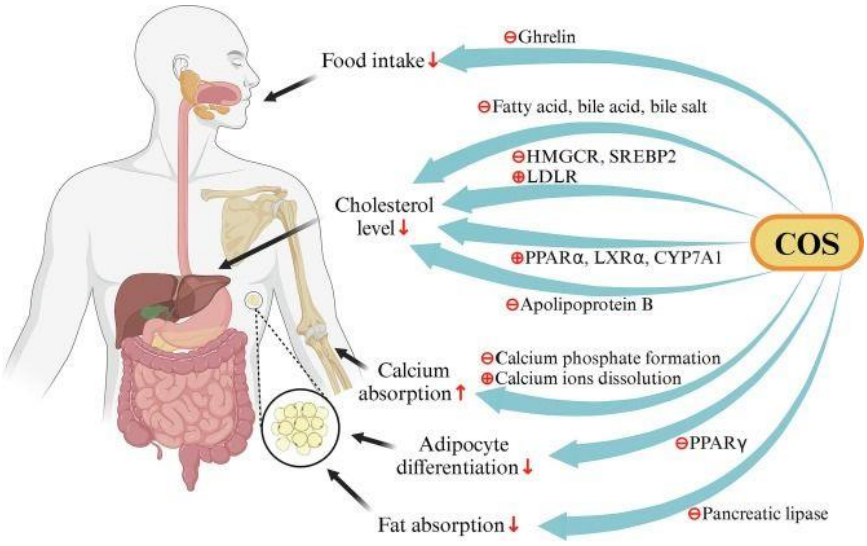
۳.۴ .فعالیت هیپوکلسترولمی و مکانیزم عملکرد

بیماری‌های قلبی عروقی (Cardiovascular Disease; CVD) یکی از علل اصلی مرگ و میر در میان ساکنان ایالات متحده هستند؛ نرخ مرگ و میر از سال ۲۰۱۵ تا ۲۰۲۰ افزایش یافته و در سال ۲۰۲۰، ۶۹۰،۸۸۲ مورد فوت ثبت

شده است .[13]سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization; WHO) گزارش داده است که سالانه حدود ۱۸,۰۰۰,۰۰۰ نفر بر اثر بیماری‌های قلبی عروقی فوت می‌کنند، که این بیماری‌ها را به یکی از علل اصلی مرگ در جهان تبدیل کرده است .[14]بیماری‌های قلبی عروقی معمولاً با کلسترول بالا (Hypercholesterolemia) و آترواسکلروز مرتبط هستند، بنابراین حفظ سطوح سالم کلسترول بخش مهمی از پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی محسوب می‌شود. با این حال، بیشتر داروهای موجود برای کاهش کلسترول دارای عوارض جانبی مزمن قابل توجه هستند، از جمله چاقی، مقاومت به انسولین و سایر اختلالات جدی عضلانی، متابولیک، کبدی و عصبی در صورت مصرف طولانی‌مدت . بنابراین، تحقیقات کنونی بر یافتن ماده‌های طبیعی تمرکز دارد که بتوانند سطوح کلسترول را کاهش دهند، با حداقل عوارض جانبی، و در پیشگیری و درمان مؤثر باشندCOS . و مشتقات آن قادر به کاهش سطح کلسترول در مدل‌های حیوانی مانند خوک‌ها، موش‌ها و رت‌ها هستند. برای مثال، در رت های چاق، COSبه طور مؤثری کلسترول کل سرم و کلسترول LDL را کاهش داده، تجمع چربی در کبد را کاهش داده و افزایش وزن را مهار در مدل موش شبه عاری از میکروب، درمان با COS باعث کاهش تری‌گلیسیرید سرمی، کلسترول کل و کلسترول LDL و افزایش کلسترول HDL شد، که منجر به مهار افزایش حجم آدیپوسیت‌ها و کاهش افزایش وزن بدن شد. همانند سایر فعالیت‌های زیستیCOS ، فعالیت هیپوکلسترولمی آن نیز به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن وابسته است. در مطالعه‌ای، رت‌ها با رژیم غذایی پرچرب حاوی کیتوسان با MW بالا (712.6 kDa) یا MW پایین (39.8 kDa) تغذیه شدند. اثر هیپوکلسترولمی کیتوسان با MW پایین در مهار افزایش وزن بدن و کاهش کلسترول سرم، کلسترول LDL و تری‌گلیسیرید کبدی، بهتر از کیتوسان با MW بالا بود. این اثرات COS ممکن است ناشی از افزایش فعالیت Lipoprotein Lipase در سرم و کبد باشد، که توسط کیتوسان با MW پایین القا می‌شود COS .با MW حتی پایین‌تر نیز اثرات مشابهی نشان داده است COS . با MW متوسط ≥ kDa۱.۰ ، افزایش وزن، کلسترول کل سرم و کلسترول LDL را به طور قابل توجهی کاهش داده و تجمع چربی در کبد را کاهش داد، مؤثرتر از COS باkDa MW ≤ 3.0 ، اگرچه مورد دوم کاهش چربی بدن بیشتری ایجاد کرد .اثر هیپوکلسترولمی کیتوسان با درجات مختلف Deacetylation (DD) نیز در شرایط in vivo بررسی شده است؛ اثر آن با افزایش DD کیتوسان افزایش می‌یابد. در رت‌هایی که بالاترین DD کیتوسان در رژیم غذایی آن‌ها وجود داشت، تری‌گلیسیرید سرمی، کلسترول کل و کلسترول LDL کاهش و کلسترول HDL افزایش یافت. توضیح احتمالی این است که کیتوسان با DD بالا دارای گروه‌های آمین آزاد بیشتری است، که منجر به بار مثبت بیشتر و تقویت تعاملات الکترواستاتیک با اسیدهای چرب و اسیدهای صفراوی دارای بار منفی در دستگاه گوارش می‌شود و به ترتیب جذب و بازجذب آن‌ها را کاهش می‌دهد. مکانیسم مشابهی نیز برای COS پیشنهاد شده است. علاوه بر اتصال به نمک‌های صفراوی از طریق تعاملات یونی، COSمی‌تواند از طریق تعاملات غیر یونی مانند پیوند هیدروژنی و تعاملات هیدروفوبیک نیز متصل شود و بازجذب را کاهش دهد .اختلال در گردش صفراوی روده-کبد (enterohepatic circulation) باعث کاهش کلسترول اندوژن و تغییر در متابولیسم کلسترول می‌شود COS .فعالیت پانکراس لیپاز را مهار کرده و در نتیجه جذب چربی را کاهش می‌دهد.اثر هیپوکلسترولمی COS از طریق انتقال میکروفلور مدفوع در موش‌ها مورد مطالعه قرار گرفت؛ مداخله COS باعث کاهش محتوای اسیدهای چرب آزاد و اسیدهای صفراوی در کولون شد. علاوه بر این، COS ترموژنز در بافت چربی قهوه‌ای و مسیر اکسیداسیون اسید چرب را که مبتنی بر گیرنده غشایی اسید صفراوی TGR5 است، فعال کرد؛ این اثرات در مجموع باعث کاهش سطح چربی بدن شدند بسیاری از مطالعات تلاش کرده‌اند تا مکانیزم کاهش کلسترول و چربی توسط COS را در سطح ژنتیکی توضیح دهند COS .ممکن است آدیپوژنز (Adipogenesis) را با کاهش بیان mRNAگیرنده فعال‌شونده تکثیرکننده پرکسیزوم (PPARγ) γ در بافت چربی سفید تنظیم کند PPARγ یک تنظیم‌کننده کلیدی عملکرد آدیپوسیت‌ها است که تمایز آدیپوسیت و ذخیره چربی را کنترل می‌کندCOS . متابولیسم

چربی را بهبود می‌بخشد و تبدیل کلسترول به اسیدهای صفراوی را از طریق افزایش بیان ژنی و فعالیتPPARα ، Liver X Receptor α (LXRα)و Cholesterol 7α-hydroxylase (CYP7A1) ترویج می‌کند. علاوه بر این، COSبیان ژنی و فعالیت ۳ Sterol-و-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) Responsive Element Binding Protein-2 (SREBP2)را کاهش می‌دهد و بیان Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR)را افزایش می‌دهد و در نتیجه سنتز کلسترول جدید (de novo cholesterol synthesis)کاهش می‌یابد.

Apolipoprotein B (apoB)نقش مهمی در سنتز Very Low-Density Lipoproteins (VLDL) در کبد دارد و Ghrelinیک هورمون پپتیدی است که اشتها را تحریک کرده و افزایش وزن را تسهیل می‌کند؛ بنابراین کاهش بیان هر دو ناشی از COS باعث کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید سرم می‌شود. علاوه بر این، COSبیان ژنی Mitochondrial Uncoupling Protein 1 (UCP1)، PR Domain-Containing Protein 16 (PRDM16) وPPARγ Coactivator-1α (PGC-1α)را افزایش می‌دهد، و به این ترتیب تبدیل بافت چربی سفید به بافت چربی قهوه‌ای و ترموژنز توسط بافت چربی قهوه‌ای را تسریع می‌کند که منجر به افزایش متابولیسم انرژی و استفاده از چربی می‌شود .مکانیزم‌های مرتبط با فعالیت هیپوکلسترولمی COS در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. مکانیزم‌های مرتبط با فعالیت‌های هیپوکلسترولمی و افزایش جذب کلسیم توسطCOS

COSبا کاهش سطحGhrelin ، میزان مصرف غذا را کاهش می‌دهد COS .همچنین عملکرد اسیدهای چرب، اسیدهای صفراوی و نمک‌های صفراوی و همچنین بیان ژنی و فعالیتHMGCR ، SREBP2وApolipoprotein Bرا مهار می‌کند. اثر COS بر افزایش بیان ژنی و فعالیتPPARα ، LXRα، CYP7A1وLDLR منجر به کاهش سطح کلسترول در بدن می‌شود. COS با سرکوب بیان PPARγ و مهار فعالیت پانکراس لیپاز به ترتیب، باعث کاهش تمایز آدیپوسیت‌ها و جذب چربی می‌شود. علاوه بر این، COSتشکیل کلسیم فسفات نامحلول را مهار کرده و حلالیت کلسیم در روده را افزایش می‌دهد و بدین ترتیب جذب کلسیم را بهبود می‌بخشد. علائم منفی (−) و مثبت (+) نشان‌دهنده مهار و فعال‌سازی توسط درمان با COS هستند.[1]

۳.۵ .افزایش جذب کلسیم و مکانیزم عملکرد

کلسیم یک مینرال ضروری برای سلامت انسان است؛ بیش از ۹۹٪ کلسیم بدن در استخوان‌ها قرار دارد.کلسیم جزء اصلی اسکلت و عامل اصلی تعیین‌کننده استحکام استخوان‌ها است؛ کمبود آن باعث ضعف استخوان‌ها می‌شود. کلسیم عمدتاً از طریق روده کوچک و کولون جذب می‌شود، که تقریباً ۹۰٪ و کمتر از ۱۰٪ کل کلسیم جذب‌شده را تشکیل می‌دهند؛ مقدار کمی کلسیم از طریق معده و روده بزرگ جذب می‌شود و کلسیم اضافی از طریق کلیه‌ها وارد ادرار می‌شود کلسیم همچنین برای انتقال سیگنال و تنظیم عملکردهای فیزیولوژیکی در چندین سیستم اندامی حیاتی است، بنابراین حفظ هموستازی کلسیم برای یکپارچگی استخوان، تعادل متابولیک و پیشگیری از بیماری‌های استخوان، فشار خون بالا، مقاومت به انسولین، چاقی و سندرم متابولیک ضروری است.پوکی استخوان یک بیماری متابولیک استخوان شایع در جمعیت سالمندان است که با کاهش محتوای کلسیم استخوان و ضعف استخوان‌ها مشخص می‌شود و عمدتاً ناشی از افزایش سرعت جذب استخوان و کمبود دریافت کلسیم است[15] مکمل‌های کلسیم برای پیشگیری و درمان پوکی استخوان استفاده شده‌اند؛ با این حال، زمانی که وارد دستگاه گوارش می‌شوند، کلسیم فسفات نامحلول و غیرقابل جذب تشکیل می‌دهند که باعث می‌شود مکمل کلسیم نسبتاً بی‌اثر باشد.[1] با این حال، مکمل کلسیم همراه با COS باعث کاهش محتوای کلسیم مدفوع و افزایش مقاومت به شکست استخوان فمور در رت‌ها می‌شود .این اثر عمدتاً به دلیل حلالیت بالای آب COS و وجود گروه‌های آمینو و هیدروکسیل متعدد در آن است که با یون‌های کلسیم از طریق تعاملات الکترواستاتیک کلات تشکیل می‌دهند، از تشکیل کلسیم فسفات جلوگیری کرده و جذب آن را افزایش می‌دهند (شکل ۴) .[16]قابل توجه است که COS تشکیل کلسیم فسفات را به تأخیر می‌اندازد اما از آن جلوگیری نمی‌کند. ظرفیت کلات‌سازی کلسیم توسط کیتوسان و COS با افزایش MW افزایش می‌یابد .با این حال، در بافر با pH خنثی، مهار تشکیل کلسیم فسفات توسط COS به غلظت COS وابسته بود، نه به MW آن. مهار توسط COS با MW پایین بهتر از COS با MWبالا بود زمانی که غلظت از ۲۰۰ mg/mL فراتر رفت. توضیح این تناقضات ظاهری ممکن است این باشد که COS با MW بالا، با حلالیت نسبتاً پایین و ویسکوزیته بالا، در غلظت‌های بالا پیوندهای بین‌مولکولی تشکیل می‌دهد که تعامل با یون‌های کلسیم را مسدود می‌کند.علاوه بر این، درمان با COS با MW پایین در رت‌های اوواری‌کتومی‌شده که رژیم غذایی کم کلسیم داشتند، منجر به افزایش نگهداری کلسیم، کل کلسیم فمور، چگالی معدنی استخوان و استحکام استخوان شد [1]

۴ .کاربردهای COS در صنعت غذا

با توجه به حلالیت بالای آب و ویسکوزیته پایین که کیتوسان فاقد آن است، COSکاربردهای متنوع و منحصر به فردی در صنعت غذا دارد.COS دارای فعالیت مهاری عالی علیه میکروارگانیسم‌های مضر است که معمولاً در مواد غذایی یافت می‌شوند و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی برجسته‌ای دارد که امکان استفاده از آن به عنوان نگهدارنده مواد غذایی و ماده بسته‌بندی را فراهم می‌کند COS .دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های اسیدلاکتیک مخرب در آبجو است، اما بر ویژگی‌های تخمیری مخمر آبجو تأثیری ندارد؛ بنابراین افزودن COS به ماءالشعیر (wort) در طول فرآیند تخمیر می‌تواند به طور مؤثر رشد Lactobacillus brevis را کنترل کند و در نتیجه بقای سلولی و عملکرد مخمر آبجو را بهبود دهدCOS می‌تواند برای افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی درونی آبجو استفاده شود که پایداری و طول عمر مفید آن را بهبود می‌بخشد.

در غلظت‌های ۰.۰۰۱–۰.۰۱٪، COSاز تشکیل طعم‌های نامطلوب جلوگیری کرده و توانایی حذف رادیکال‌های آزاد در آبجو را در طول فرآیند پیری شتاب‌دار افزایش می‌دهد و به حفظ طعم آبجو کمک می‌کند.خواص تشکیل فیلم کیتوسان می‌تواند برای پوشش سطح میوه‌ها و سبزیجات تازه استفاده شود و فیلمی با مقاومت در برابر آب، نفوذپذیری گاز و خواص ضدباکتریایی ایجاد کند که طول عمر مفید آن‌ها را افزایش می‌دهد. ترکیب COS در فیلم‌های کیتوسان خنثی‌شده یا حرارت‌دیده به ویژگی‌هایی منجر شد که حلالیت کاهش‌یافته و فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تر داشتند، به دلیل تقویت گروه‌های فعال عملکردی بیشتر.علاوه بر این، COSمی‌تواند از طریق تعامل الکترواستاتیک با شبکه آلبومین سرم گاوی (BSA) متصل شود و روی سطح مواد مختلف بسته‌بندی اسپری شود و به این ترتیب یک ماده بسته‌بندی ضدباکتریای نوآورانه ایجاد کند که زمان فاسد شدن توت‌فرنگی را تقریباً سه برابر افزایش دادCOS می‌تواند برای نگهداری آبمیوه‌ها مؤثر باشد؛ به عنوان مثال، ۴ گرم بر لیتر COS طول عمر مفید آب سیب در دمای ۳۷°C را از ۹ روز به ۷۰ روز افزایش داد COS .همچنین می‌تواند محصولات مبتنی بر آرد را از طریق فعالیت ضد میکروبی حفظ کند و به طور مؤثر طول عمر نودل‌های تازه مرطوب را در دمای ۴°C افزایش داده و از افزایش اسیدیته جلوگیری کند .افزودن COS باعث افزایش محتوای رطوبت، نرخ تورم و جذب روغن محصولات آرد اکسترود شده شده و سختی آن‌ها را کاهش می‌دهدCOS همچنین در غذاهای عملکردی (Functional Foods)کاربرد دارد و می‌تواند حیاتی بودن پروبیوتیک‌ها را حفظ کرده، باکتری‌های بیماری‌زای روده را مهار کند و تکثیر میکروارگانیسم‌های مفید روده را تحریک کند، که آن را به یک پری‌بیوتیک امیدوارکننده تبدیل می‌کند COS .رشد Bifidobacteriumو Lactobacillus را تحریک کرده و به طور مؤثر تعداد E. coli مدفوع را کاهش. COS که در نانوبلورها (Nanoparticles) محصور شده و به ماست اضافه شده است، دارای اثر پری‌بیوتیک بود؛ محصورسازی باعث افزایش پایداری COS در ماست و کاهش اثرات منفی COS آزاد بر رنگ و طعم در طول ذخیره‌سازی شد و امکان ایجاد محصولات ماست عملکردی نوآورانه را فراهم کرد.[17] به دلیل فعالیت ضدالتهابیCOS ، ممکن است در کاهش التهاب روده و بهبود سلامت روده مفید باشد و بدین ترتیب جذب مواد مغذی را افزایش دهد COS .همچنین می‌تواند به عنوان عامل تقویت‌کننده کلسیم مؤثر استفاده شود، که می‌تواند به آبمیوه‌ها یا غذاهای غنی از کلسیم اضافه شود تا زیست‌دسترس‌پذیری کلسیم را در بیماران با دیس‌پپسی یا عدم تحمل لاکتوز بهبود بخشد و جایگزین مکمل‌های کلسیم مبتنی بر لبنیات شود. مصرف خوراکی COS دارای اثر هیپوکلسترولمی است؛ افراد مورد آزمایش که دو بار در روز پیش از غذا آب حاوی COS می‌نوشیدند، از کاهش کلسترول کل سرم و کلسترول LDL بهره‌مند شدند[1].

۵ .نتیجه‌گیری

کیتوآلیگوساکاریدها (Chitooligosaccharides, COS) که محصول تجزیه پلیمری کیتوسان هستند، می‌توانند از طریق هیدرولیز فیزیکی، شیمیایی یا آنزیمی تولید شوند؛ هر یک از این روش‌ها مزایا و معایب خاص خود را دارند، اما تهیه COS از طریق هیدرولیز آنزیمی از نظر محیط‌زیستی دوستانه‌تر و اختصاصی‌تر است. اگر هزینه تولید هیدرولیز آنزیمی قابل کنترل باشد، انتظار می‌رود که در آینده روش اصلی تهیه COS شود. COS دارای انواع فعالیت‌های بیولوژیکی مفید و افق‌های کاربردی گسترده در صنعت غذا است، به دلیل عدم سمیت، حلالیت بالای آب و ویسکوزیته پایین در محلول. کیتوسان به عنوان افزودنی غذایی در کره جنوبی و ژاپن تأیید شده است؛ سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) کیتوسان را به عنوان به طور کلی ایمن شناخته شده (GRAS) تصویب کرده و اثرات کیتوسان بر حفظ سطح-LDL کلسترول توسط آژانس ایمنی غذایی اروپا (EFSA) بازبینی شده است. با این حال، استفاده از COS به عنوان افزودنی غذایی هنوز برای بسیاری از سازمان‌های نظارتی یک موضوع چالشی و بحث‌برانگیز است. علاوه بر این، فعالیت‌های زیستی انواع مختلف COS

به شدت به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها مانند وزن مولکولی(MW) ، درجه دی‌استیلاسیون (DD) و درجه پلیمریزاسیون (DP) وابسته است. این پیچیدگی باعث شده است که مکانیزم‌های مولکولی و جزئیات اکثر فعالیت‌های زیستی COSبه‌طور کامل روشن نشود. بدون درک جامع از مکانیزم‌های فعالیت زیستیCOS ، پیش‌بینی اثرات آن در کاربردهای عملی و پیامدهای فیزیولوژیکی دشوار است و بنابراین ایمنی محصولات هنوز تضمین نمی‌شود. علاوه بر این، این پیچیدگی‌ها تأثیرات منفی بر تولید صنعتی دارند، از جمله مشکلاتی مانند: سختی در طراحی و فرمول‌بندی محصولات برای عملکرد کامل، کیفیت نامتجانس محصول و هزینه بالای تولید. مقررات‌گذاران و مصرف‌کنندگان احتمالاً تمایل بیشتری به پذیرش محصولات عملکردی جدید خواهند داشت اگر این محصولات با شواهد علمی مکانیزمی به خوبی پشتیبانی شوند.بنابراین، برای ترویج بیشتر تجاری‌سازی COS و کاربرد آن در صنعت غذا، ضروری است که COS به‌طور جامع شناسایی و ویژگی‌یابی شود، ایمنی آن ارزیابی گردد و مکانیزم‌های مولکولی فعالیت‌های زیستی آن روشن شود.

۶. منابع :

1: Ziyun Fang, Wenjie Cong, Hualan Zhou, Jianguo Zhang, Mingxuan Wang

Institute of Food Science and Engineering, School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China Received 18 March 2024, Revised 28 April 2024, Accepted 28 April 2024, Available online 1 May 2024, Version of Record 1 May 2024

2: M. Naveed, L. Phil, M. Sohail, M. Hasnat, M.M.F.A. Baig, A.U. Ihsan, Q.-G. ZhouChitosan oligosaccharide (COS): An overviewInternational Journal of Biological Macromolecules, 129 (2019), pp. 827-843, 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192

3: F. Liaqat, R. EltemChitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive reviewCarbohydrate Polymers, 184 (2018), pp. 243-259, 10.1016/j.carbpol.2017.12.067

4: G. Lodhi, Y.S. Kim, J.W. Hwang, S.K. Kim, Y.J. Jeon, J.Y. Je, P.J. Park Chitooligosaccharide and its derivatives: Preparation and biological applications BioMed Research International, 2014 (2014), Article 654913, 10.1155/2014/654913

5: K. Seki, Y. Nishiyama, M. Mitsutomi Characterization of a novel exo-chitosanase, an exo-chitobiohydrolase, from Gongronella butleri Journal of Bioscience and Bioengineering, 127 (4) (2019), pp. 425-429, 10.1016/j.jbiosc.2018.09.009

6: H. Sun, L. Gao, C. Xue, X. Mao Marine-polysaccharide degrading enzymes: Status and prospects Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19 (6) (2020), pp. 2767-2796, 10.1111/1541-4337.12630

7: L. Meng, J. Ma, C. Liu, X. Mao, J. Li The microbial stress responses of Escherichia coli and Staphylococcus aureus induced by chitooligosaccharide Carbohydrate Polymers, 287 (2022), Article 119325, 10.1016/j.carbpol.2022.119325

8: Y. Ke, B. Ding, M. Zhang, T. Dong, Y. Fu, Q. Lv, X. Wang Study on inhibitory activity and mechanism of chitosan oligosaccharides on Aspergillus Flavus and Aspergillus Fumigatus Carbohydrate Polymers, 275 (2022), Article 118673, 10.1016/j.carbpol.2021.118673

9: H.K. No, N. Young Park, S. Ho Lee, S.P. Meyers Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights International Journal of Food Microbiology, 74 (1) (2002), pp. 65-72, 10.1016/S0168-1605(01)00717-6

10: L. Meng, J. Ma, C. Liu, X. Mao, J. Li The microbial stress responses of Escherichia coli and Staphylococcus aureus induced by chitooligosaccharide Carbohydrate Polymers, 287 (2022), Article 119325, 10.1016/j.carbpol.2022.119325

11: Q. Yang, J. Wang, P. Zhang, S. Xie, X. Yuan, X. Hou, Y. Du In vitro and in vivo antifungal activity and preliminary mechanism of cembratrien-diols against Botrytis cinerea Industrial Crops and Products, 154 (2020), Article 112745, 10.1016/j.indcrop.2020.112745

12:W. Kunanusornchai, B. Witoonpanich, T. Tawonsawatruk, R. Pichyangkura, V. Chatsudthipong, C. Muanprasat Chitosan oligosaccharide suppresses synovial inflammation via AMPK activation: An *in vitro* and *in vivo* study

Pharmacological Research, 113 (2016), pp. 458-467, 10.1016/j.phrs.2016.09.016

13: F.B. Ahmad, R.N. Anderson The leading causes of death in the US for 2020 JAMA, 325 (18) (2021), pp. 1829-1830, 10.1001/jama.2021.5469

14: A. Negm El-Dein, G. Daba, F.A. Mostafa, T.N. Soliman, G.A. Awad, M.A.M. Farid Utilization of autochthonous lactic acid bacteria attaining safety attributes, probiotic properties, and hypocholesterolemic potential in the production of a functional set yogurt Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 43 (2022), Article 102448, 10.1016/j.bcab.2022.102448

15: C. Muanprasat, V. Chatsudthipong Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications

Pharmacology & Therapeutics, 170 (2017), pp. 80-97, 10.1016/j.pharmthera.2016.10.013

16: W. Xia, P. Liu, J. Zhang, J. Chen Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides

Food Hydrocolloids, 25 (2) (2011), pp. 170-179, 10.1016/j.foodhyd.2010.03.003

17: S.A. Ismail, H.S. El-Sayed, B. Fayed Production of prebiotic chitooligosaccharide and its nano/microencapsulation for the production of functional yoghurt

Carbohydrate Polymers, 234 (2020), Article 115941, 10.1016/j.carbpol.2020.115941