

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشکده مهندسی کشاورزی
رشته مهندسی کشاورزی گرایش علوم و صنایع غذایی
پایان نامه کارشناسی ارشد

جداسازی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از
صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی

نگارنده:

حمیده مولائی

استاد راهنما:

دکتر کامبیز جهان بین

شهریور ۱۳۹۵

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده کشاورزی
گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم حمیده مولائی به شماره دانشجویی: ۹۳۱۶۷۸۴

تحت عنوان: جداسازی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد
ارزیابی و با درجه مورد پذیرش قرار گرفت.

امضاء	اساتید مشاور	امضاء	اساتید راهنما
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی : دکتر کامبیز جهان بین
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی :

امضاء	نماینده تحصیلات تکمیلی	امضاء	اساتید داور
	نام و نام خانوادگی :		نام و نام خانوادگی : دکتر احمد رجائی نجف آبادی
			نام و نام خانوادگی : دکتر حمیدرضا صمدلویی

تقدیم بہ:

پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم کہ پیوستہ جرعہ نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آہنا بودہ ام و ہموارہ چراغ وجودشان
روغنکراہ من در مسیر پرفراز و نشیب زندگی بودہ است.

مشکرو قدردانی:

شکریان نثار ازدمنان که، همتیان، تحسید و به طریق علم و دانش، نمودمان کرد.

بامشکر از استاد فرهیخته جناب آقای دکتر کامبیز جهان مین که در کمال سعہ صدر، با حسن خلق و فروتنی، از بیچ کلمی در این عرصہ بہ اینجانب دینغ نمودند و زحمت را ہنمایی این رسالہ را بر عہدہ گرفتند.

ہمچنین از استادان کرامتہر جناب آقای دکتر احمد رجائی و جناب آقای دکتر حمید رضا صد لویی کہ زحمت داوری این رسالہ را متقبل شدند؛ کمال مشکرو قدردانی را دارم.

تعهد نامه

اینجانب حمیده مولائی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی-علوم و صنایع غذایی دانشکده مهندسی کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه " جداسازی و تعیین ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی " تحت راهنمایی دکتر کامبیز جهان بین متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا «Shahroud University of Technology» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

امضای دانشجو

تاریخ / ۱۳۹۵

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده:

پلی ساکارید محلول در آب جدیدی با وزن مولکولی $10^6 \times 4/86$ و چرخش نوری ویژه $+31/5^\circ$ از صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی توسط استخراج با آب داغ 75°C استحصال شد و خالص سازی پلی ساکارید خام به ترتیب با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل - سلولز و سفاکريل S-400 انجام گرفت. راندمان تولید پلی ساکارید خام و خالص به ترتیب $8/21\%$ و $1/34\%$ ، و مقدار قند کل پلی ساکارید خالص تعیین شده توسط روش فنل - اسید سولفوریک $97/6\%$ بود. نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص نشان داد که این ترکیب از واحدهای مونومری رامنوز، آرابینوز، زایلوز، اسید گلوکورونیک و گالاکتوز به ترتیب با نسبت های مولی $1/0$ ، $20/3$ ، $4/9$ و $3/1$ تشکیل شده است و مقدار اسید اورونیک موجود در پلی ساکارید خالص حدود 6% می باشد. ساختار پلی ساکارید خالص با استفاده از ترکیبی از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، طیف سنج مادون قرمز، طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای و تعیین درجه چرخش نوری بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که پلی ساکارید غالب محلول در آب حاصل از صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی یک آرابینوگالاکتان بسیار پر شاخه با یک اسکلت اصلی متشکل از واحدهای β -D-Galp با اتصالات $(1 \rightarrow 3, 6)$ و مونومرهای α -L-Araf با اتصالات $(1 \rightarrow 3)$ است و زنجیرهای جانبی $(1 \rightarrow 3)$ - α -L-Araf- $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-Xylp- $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-Galp- α -L-Rhap- $(1 \rightarrow 6)$ - β -D-Galp- $(1 \rightarrow 6)$ و $(1 \rightarrow 3)$ - β -D-GlcAp- $(1 \rightarrow 6)$ - β -D-Galp- $(1 \rightarrow 6)$ و 6 واحدهای قندی β -D-Galp به زنجیر اصلی متصل شده اند.

کلمات کلیدی: صمغ تراوشی از درخت بادام کوهی، پلی ساکارید، استخراج، خالص سازی، تعیین ساختار.

فهرست مطالب:

۲.....	مقدمه و هدف
۶.....	۱ کلیات تحقیق.....
۶.....	۱-۱ کربوهیدرات ها.....
۷.....	۲-۱ مونوساکاریدها.....
۹.....	۱-۲-۱ روش های مختلف نمایش ساختمان مونوساکاریدها.....
۹.....	۱-۲-۱-۱ ساختار خطی فیشر.....
۱۰.....	۲-۱-۲-۱ ساختار حلقوی هاورث.....
۱۱.....	۳-۱-۲-۱ ساختار میلر.....
۱۱.....	۴-۱-۲-۱ ساختار کانفورماسیونی مونوساکاریدها.....
۱۴.....	۲-۲-۱ ایزومری در قندها.....
۲۰.....	۳-۲-۱ تعیین ساختار کانفورماسیونی پایدار مونوساکاریدها.....
۲۳.....	۴-۲-۱ واکنش ها و مشتقات مهم مونوساکاریدها.....
۲۳.....	۱-۴-۲-۱ واکنش های احیاء.....
۲۴.....	۲-۴-۲-۱ واکنش های اکسیداسیون.....
۲۵.....	۳-۴-۲-۱ قندهای دئوکسی و آمین دار.....
۲۶.....	۴-۴-۲-۱ اتر و استرهای قندی.....
۲۷.....	۳-۱ دی و آلیگو ساکاریدها.....
۲۷.....	۱-۳-۱ پیوند های گلیکوزیدی.....
۲۸.....	۲-۳-۱ دی ساکاریدها.....
۲۹.....	۱-۲-۳-۱ ساختار کانفورماسیونی دی ساکاریدها.....
۳۱.....	۳-۳-۱ سایر آلیگو ساکاریدها.....
۳۱.....	۴-۱ پلی ساکاریدها.....
۳۱.....	۱-۴-۱ تعریف و نامگذاری پلی ساکاریدها.....
۳۲.....	۲-۴-۱ طبقه بندی پلی ساکاریدها.....
۳۳.....	۱-۲-۴-۱ منشاء.....
۳۳.....	۲-۲-۴-۱ نوع واحد تشکیل دهنده.....
۳۳.....	۱-۲-۲-۴-۱ همو گلیکان ها.....
۳۳.....	۲-۲-۲-۴-۱ هتروگلیکان ها.....
۳۴.....	۳-۲-۴-۱ ساختار شیمیایی.....
۳۵.....	۴-۲-۴-۱ بار یونی.....

- ۳۵.....۵-۲-۴-۱ الگوی ساختاری مونومرها در یک توالی.....
- ۳۶.....۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی پلی ساکاریدها.....
- ۳۸.....۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی زنجیرهای هموپلی ساکاریدی.....
- ۳۸.....۱-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی روبان مانند.....
- ۴۰.....۲-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی مارپیچ تو خالی.....
- ۴۱.....۳-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی آریب مانند (منحنی).....
- ۴۲.....۴-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی لولا مانند (بند بند با حرکت آزاد).....
- ۴۲.....۲-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی زنجیرهای هتروپلی ساکاریدی.....
- ۴۳.....۱-۲-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی هتروگلیکان های نوع تناوبی (دوره ای).....
- ۴۴.....۲-۲-۳-۴-۱ ساختارهای کانفورماسیونی هترو گلیکان های نوع منقطع.....
- ۴۴.....۳-۲-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی هترو گلیکان های نوع نامتناوب.....
- ۴۵.....۳-۳-۴-۱ نقش ساختار کانفورماسیونی پلی ساکاریدها در تعیین عملکرد آنها.....
- ۴۶.....۴-۴-۱ خاصیت و موارد کاربرد پلی ساکاریدها.....
- ۴۶.....۱-۴-۴-۱ خواص مرتبط با ساختار پلی ساکاریدها.....
- ۴۶.....۱-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای کاملاً خطی.....
- ۴۷.....۲-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای منشعب.....
- ۴۷.....۳-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای خطی منشعب.....
- ۴۸.....۴-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای حاوی گروه کربوکسیل.....
- ۴۸.....۵-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای حاوی گروه های به شدت اسیدی.....
- ۴۹.....۲-۴-۴-۱ هیدروکلئیدها و خواص عملکردی آنها.....
- ۵۳.....۵-۴-۱ استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها.....
- ۵۳.....۱-۵-۴-۱ استخراج پلی ساکاریدها.....
- ۵۴.....۱-۱-۵-۴-۱ عوامل مؤثر بر میزان حلالیت پلی ساکاریدها.....
- ۵۵.....۲-۵-۴-۱ خالص کردن پلی ساکاریدها.....
- ۵۵.....۱-۲-۵-۴-۱ حذف ناخالصی های پروتئینی.....
- ۵۶.....۲-۲-۵-۴-۱ خالص کردن پلی ساکاریدها با روش های آنزیمی.....
- ۵۷.....۳-۲-۵-۴-۱ خالص کردن پلی ساکاریدها با استفاده از روش های کروماتوگرافی.....
- ۵۸.....۱-۳-۲-۵-۴-۱ کروماتوگرافی گازی (GC).....
- ۵۹.....۲-۳-۲-۵-۴-۱ کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC).....
- ۶۰.....۳-۳-۲-۵-۴-۱ کروماتوگرافی ستونی.....
- ۶۱.....۴-۳-۲-۵-۴-۱ کروماتوگرافی تبادل یونی.....
- ۶۴.....۴-۲-۵-۴-۱ معیارهای خلوص پلی ساکاریدها.....
- ۶۴.....۶-۴-۱ ترسیب پلی ساکاریدها.....

- ۷-۴-۱ شناخت و تشخیص ساختار شیمیایی و مولکولی پلی ساکاریدها..... ۶۵
- ۱-۷-۴-۱ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های شیمیایی..... ۶۶
- ۱-۱-۷-۴-۱ تعیین وزن مولکولی..... ۶۶
- ۲-۱-۷-۴-۱ تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکاریدها..... ۶۹
- ۳-۱-۷-۴-۱ تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی..... ۷۰
- ۱-۳-۱-۷-۴-۱ متیلاسیون..... ۷۰
- ۲-۳-۱-۷-۴-۱ هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)..... ۷۳
- ۳-۳-۱-۷-۴-۱ اکسیداسیون..... ۷۴
- ۱-۳-۳-۱-۷-۴-۱ اکسایش پریدات و تجزیه اسمیت..... ۷۴
- ۲-۳-۳-۱-۷-۴-۱ اکسایش با تری اکسید گرومیوم..... ۷۶
- ۲-۷-۴-۱ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های آنزیمی..... ۷۷
- ۳-۷-۴-۱ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های طیف سنجی..... ۷۸
- ۱-۳-۷-۴-۱ طیف سنجی فرابنفش و مرئی..... ۷۸
- ۲-۳-۷-۴-۱ طیف سنجی مادون قرمز (IR)..... ۸۱
- ۳-۳-۷-۴-۱ طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR)..... ۸۳
- ۴-۳-۷-۴-۱ درجه چرخش نوری (پلاریمتری)..... ۸۶
- ۵-۱ معرفی گیاه (درخت بادام کوهی *AMYGDALUS SCOPARIA SPACH*)..... ۸۷
- ۱-۵-۱ خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه..... ۸۷
- ۲-۵-۱ مشخصات ظاهری گیاه..... ۸۸
- ۳-۵-۱ ترکیبات شیمیایی گیاه..... ۹۰
- ۴-۵-۱ موارد مصرف و کاربردهای صمغ زرد..... ۹۰
- ۲ بررسی منابع..... ۹۴
- ۱-۲ استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها..... ۹۴
- ۲-۲ شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها..... ۹۸
- ۳ مواد و روش ها..... ۱۰۴
- ۱-۳ مواد اولیه و محلول های شیمیایی..... ۱۰۴
- ۱-۱-۳ جمع آوری صمغ تراوش شده از درخت بادام کوهی (*Amygdalus scoparia*)..... ۱۰۴
- ۲-۱-۳ مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده..... ۱۰۴
- ۲-۳ دستگاه های مورد استفاده..... ۱۰۵
- ۳-۳ روش کار..... ۱۰۶

۱-۳-۳	استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب.....	۱۰۶
۱-۱-۳-۳	استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه.....	۱۰۶
۲-۱-۳-۳	جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب.....	۱۰۶
۲-۳-۳	خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب.....	۱۰۷
۱-۲-۳-۳	نحوه آماده سازی ستون کروماتوگرافی حاوی DEAE – سلولز.....	۱۰۹
۳-۳-۳	شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب.....	۱۰۹
۱-۳-۳-۳	تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب.....	۱۱۰
۲-۳-۳-۳	طیف سنج مادون قرمز.....	۱۱۰
۳-۳-۳-۳	تعیین درجه چرخش نوری.....	۱۱۱
۴-۳-۳-۳	جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش.....	۱۱۱
۵-۳-۳-۳	تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید.....	۱۱۲
۶-۳-۳-۳	هیدرولیز اسیدی ملایم.....	۱۱۳
۷-۳-۳-۳	اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت.....	۱۱۴
۸-۳-۳-۳	متیلاسیون.....	۱۱۴
۹-۳-۳-۳	طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای.....	۱۱۶
۴	بحث و نتایج.....	۱۱۸
۱-۴	استخراج، خالص سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید.....	۱۱۸
۱-۱-۴	استخراج و خالص سازی.....	۱۱۸
۲-۱-۴	تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص.....	۱۱۹
۲-۴	تعیین ساختار.....	۱۲۰
۱-۲-۴	تعیین درجه چرخش نوری.....	۱۲۰
۲-۲-۴	تعیین قند کل و شناسایی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص.....	۱۲۰
۳-۲-۴	طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص.....	۱۲۲
۴-۲-۴	اکسیداسیون پریدات و تجزیه اسمیت.....	۱۲۴
۵-۲-۴	متیله کردن.....	۱۲۵
۶-۲-۴	هیدرولیز ناقص اسیدی.....	۱۲۷
۷-۲-۴	طیف رزونانس مغناطیس هسته های پروتون و کربن.....	۱۲۸
	ABSTRACT.....	۱۴۴

فهرست شکل‌ها

- شکل (۱-۱): ساختار خطی گلیسر آلدئید و دی هیدروکسی استن..... ۹
- شکل (۲-۱): ساختار حلقه‌های شش ضلعی پیران و پنج ضلعی فوران..... ۱۰
- شکل (۳-۱): ساختار کانفورماسیونی، ساختار میلز و ساختار هاورث..... ۱۱
- شکل (۴-۱): ساختار کانفورماسیونی پاکت و مارپیچ شکل..... ۱۲
- شکل (۵-۱): نحوه نمایش ساختار کانفورماسیونی..... ۱۳
- شکل (۶-۱): ساختار کانفورماسیونی امکان پذیر برای اشکال صندلی، قایقی، نیمه صندلی و اُریب..... ۱۴
- شکل (۷-۱): ایزومرهای حلقه آلفا-د- گلوکو فورانوز، آلفا-د- گلوکو پیرانوز..... ۱۵
- شکل (۸-۱): ساختار د- و ال- گلیسر آلدئید..... ۱۶
- شکل (۹-۱): تشکیل همی استال، استال، همی کتال و کتال..... ۱۹
- شکل (۱۰-۱): جهت گیری محوری (a) و استوایی (e) استخلاف های هر اتم کربن..... ۲۲
- شکل (۱۱-۱): ساختار کانفورماسیونی مطلوب بتا-د- گلوکز..... ۲۲
- شکل (۱۲-۱): ساختار اسید گلوکونیک، اسید گلوکورونیک و اسید گلوکاریک..... ۲۵
- شکل (۱۳-۱): تصویری از پیوند گلیکوزیدی..... ۲۷
- شکل (۱۴-۱): دی ساکاریدهای احیاء کننده مالتوز و غیر احیاء کننده ترهالوز..... ۲۹
- شکل (۱۵-۱): دی ساکاریدهای ناهمگن ساکارز و همگن ترهالوز..... ۲۹
- شکل (۱۶-۱): زوایای چرخشی حول پیوند گلیکوزیدی..... ۳۰
- شکل (۱۷-۱): تشکیل زاویه چرخشی بزرگ (w) حول پیوند گلیکوزیدی..... ۳۰
- شکل (۱۸-۱): تصویر شماتیکی از ساختار کانفورماسیونی مارپیچی شکل..... ۳۸
- شکل (۱۹-۱): ساختار کانفورماسیونی روبان مانند و مارپیچ تو خالی..... ۳۸
- شکل (۲۰-۱): ساختار و شکل کانفورماسیونی روبان مانند..... ۳۹
- شکل (۲۱-۱): ساختار کانفورماسیونی مدل جعبه تخم مرغی..... ۴۰
- شکل (۲۲-۱): ساختار و شکل کانفورماسیونی مارپیچ تو خالی..... ۴۰
- شکل (۲۳-۱): ساختار کانفورماسیونی مارپیچ تو پُر، مارپیچ دوبل و سوبل و مارپیچ چین خورده..... ۴۱

- شکل (۱-۲۴): ساختار و شکل کانفورماسیونی آریب مانند..... ۴۲
- شکل (۱-۲۵): ساختار کانفورماسیونی لولا مانند..... ۴۲
- شکل (۱-۲۶): ساختار کانفورماسیونی مارپیچ دو رشته ای یوتا کاراگینان..... ۴۳
- شکل (۱-۲۷): نحوه ژلاتینه شدن کاپا کاراگینان در محلول های آبی..... ۴۴
- شکل (۱-۲۸): حجم مؤثر ساختار خطی، خطی منشعب و منشعب..... ۴۸
- شکل (۱-۲۹): نحوه تثبیت سیستم های امولسیونی توسط فعالیت سطحی هیدروکلونیدها..... ۵۲
- شکل (۱-۳۰): تصویری از قسمت های اصلی یک دستگاه کروماتوگرافی گازی..... ۵۹
- شکل (۱-۳۱): تصویری کلی از یک سیستم HPLC..... ۶۰
- شکل (۱-۳۲): ساختمان یک ستون کروماتوگرافی و مواد جذب شده روی آن..... ۶۱
- شکل (۱-۳۳): ستون تبادل کننده کاتیونی..... ۶۲
- شکل (۱-۳۴): ستون تبادل کننده آنیونی..... ۶۲
- شکل (۱-۳۵): اُکسیداسیون ویسیل گلیکول ها با اسید پریدیک..... ۷۵
- شکل (۱-۳۶): فرآیند کوانتایی..... ۷۹
- شکل (۱-۳۷): پیک های حداکثری جذب برای هگروها و پنتوزها در آزمون فنول - اسید سولفوریک..... ۸۱
- شکل (۱-۳۸): رابطه ناحیه مادون قرمز با سایر نواحی موجود در طیف الکترومغناطیس..... ۸۲
- شکل (۱-۳۹): گشتاور مغناطیسی اسپین ها در حالت معمول..... ۸۴
- شکل (۱-۴۰): تصاویری از نوع شاخه، برگ، گل و میوه درخت بادام کوهی..... ۸۹
- شکل (۱-۴۱): درجه بندی صمغ زرد بر اساس رنگ..... ۹۰
- شکل (۳-۱): قطعات سفید رنگ صمغ زرد..... ۱۰۴
- شکل (۴-۱): پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی..... ۱۱۸
- شکل (۴-۲): منحنی پلی ساکارید خالص حاصل از جمع آوری فراکشنها پس از شستشو با ستون سفاکريل ۴۰۰-S..... ۱۱۹
- شکل (۴-۳): کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا..... ۱۱۹

- شکل (۴-۴): طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص (A) و پلی ساکارید خالص احیاء شده (B)..... ۱۲۱
- شکل (۵-۴): طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی..... ۱۲۳
- شکل (۶-۴): طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی..... ۱۲۹
- شکل (۷-۴): طیف NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی..... ۱۳۰
- شکل (۸-۴): ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی..... ۱۳۲

فهرست جدول‌ها

- جدول (۱-۱): مونوساکاریدهای حاوی ایزومر عاملی ۱۵
- جدول (۲-۱): چرخش ویژه $^{20}\text{D}[\alpha]$ فرم ال و د تعدادی از قندها ۱۸
- جدول (۳-۱): چرخش ویژه $^{20}\text{D}[\alpha]$ تعدادی از قندها ۲۰
- جدول (۴-۱): طبقه بندی پلی ساکاریدها با توجه به توالی واحدهای قندی در زنجیر ۳۶
- جدول (۵-۱): طبقه بندی منابع مهم هیدروکلئیدها ۵۰
- جدول (۱-۴): نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی ۱۲۵
- جدول (۲-۴): نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده ۱۲۶
- جدول (۳-۴): نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی ساکارید خالص ۱۲۷
- جدول (۴-۴): مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی ۱۲۹
- جدول (۵-۴): مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی ۱۳۱



مقدمه و هدف

مقدمه و هدف

کربوهیدرات ها فراوانترین مولکول های زیستی روی زمین هستند. کربوهیدرات ها که اغلب به صورت پلی ساکارید در طبیعت یافت می شوند علاوه بر اینکه به عنوان منبع تأمین انرژی برای رشد گیاهان و سایر سلول های غیر فوتوسنتزی به حساب می آیند، در دیواره سلولی باکتری ها، گیاهان و بافت های پیوندی حیوانات به عنوان عناصر حفاظتی و ساختاری کاربرد دارند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

بعلاوه پلی ساکاریدها خاصیت دارویی دارند و می توانند به عنوان ضد اکسنده های طبیعی بدون داشتن عوارض جانبی ضد اکسنده های مصنوعی برای مبارزه با رادیکال های آزاد در بدن مورد استفاده قرار گیرند. همچنین این مواد می توانند مانند آنتی بیوتیک ها باعث تنظیم سیستم ایمنی بدن شوند (Bagchi et al., 2016).

تنوع شرایط جغرافیایی در ایران اقلیم متنوعی را بوجود آورده است بطوریکه سالانه اختلاف حداقل و حداکثر دما در شبانه روز به بیش از 40°C در سطح کشور می رسد و باعث پرورش گیاهانی گوناگون با سرشت های اکولوژیک بسیار متفاوت در پهنه کشور ایران می شود. این گیاهان شامل گیاهان مناطق خشک و نیمه خشک، گیاهان صحرایی و شنی، نیمه استوایی، سرد سیری و مرطوب هستند (جهان بین، ۱۳۹۰). در کشور ایران تا کنون حدود ۷۰۰۰ گونه گیاهی گزارش شده که از این تعداد حدود ۱۷۲۷ گونه آن انحصاری است (عباسی و همکاران، ۱۳۹۱).

با پیشرفت علم و توجه مردم جهان به اثرات زیانبار استفاده از ترکیبات شیمیایی و مواد سنتزی، دنیا مجدداً به استفاده از فرآورده های گیاهی و طبیعی رو آورده و با سرعت بسیاری در این مقوله در حال گام برداشتن است. تمایل مردم جهان برای مصرف محصولات گیاهی در سالهای اخیر بسیار چشمگیر بوده است بطوریکه در سال ۲۰۰۰ مبادله مالی گیاهان دارویی در جهان حدود ۲۰ میلیارد دلار گزارش شد و به پیش بینی (سازمان بهداشت جهانی)^۱، این رقم در سال ۲۰۵۰ به ۵۰ میلیارد دلار

^۱ World Health Organization (WHO)

هم خواهد رسید. مطابق آخرین گزارشات این سازمان، حدود ۸۰٪ جمعیت دنیا مصرف کننده محصولات گیاهی هستند (خانوی و همکاران، ۱۳۸۹).

باید به این نکته توجه داشت که بهره برداری و استفاده از گیاهان دارویی به نحوی که در ممالک اروپایی و آمریکائی معمول است هنوز در کشور ما مورد توجه قرار نگرفته و اکثر مردم از گیاهان مهمی که دارای جنبه دارویی و صنعتی هستند بی اطلاع و به خواص آنها واقف نیستند. از مجموع ۱۷۰۰ گونه دارویی و صنعتی شناخته شده در کشور، حدود ۲۰۰ الی ۳۰۰ گونه مورد بهره برداری قرار می گیرند و سایر گونه ها به علت عدم شناخت کافی به دلایل گوناگونی از بین می روند بدون آنکه کوچکترین استفاده از این سرمایه بی کران خدادادی صورت پذیرد (عماد، ۱۳۷۹).

صمغ و رزین طبیعی یکی از ترکیبات اولیه مورد نیاز صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، آرایشی بهداشتی و ... است که از گونه های مختلف گیاهی مانند سوزنی برگان، مرکبات، نارون، سنجد، انواع بادام، زردآلو، پسته جنگلی یا بنه تهیه می شود (دهقانی و همکاران، ۱۳۸۵). بر اساس آمار (سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد)^۱ در سال ۲۰۰۸ ایران در تولید صمغ های طبیعی رتبه چهارم جهان را داشته است (خالصی و همکاران، ۱۳۹۱).

صمغ های ترشخی درختان جزء ابتدایی ترین و قدیمی ترین صمغ ها به شمار می روند و به آسانی در دسترس بشر قرار دارند. نکته قابل توجه در مورد این هیدروکلوئیدها توانایی آنها در تولید محلول هایی با ویسکوزیته بالا در غلظت های پایین است و همین خاصیت منحصر به فرد موجب شده است که صمغ های نامبرده علی رغم رقابت با سایر هیدروکلوئیدها در صنایع گوناگون بخصوص صنایع غذایی به عنوان عوامل قوام دهنده، عوامل ایجاد ژل، امولسیفایر، عوامل تثبیت کننده سیستم های ناهمگن، جایگزین چربی، عوامل زلال کننده، عوامل مهار تبلور و عوامل حفظ و نگهداری مواد حساس مورد استفاده قرار گیرند (Li et al., 2016).

^۱ Food and Agriculture Organization (FAO)

امروزه محققان تلاش می کنند تا منابع جدیدی از هیدروکلوئیدها را با خواص عملکردی مطلوب به بخش صنعت معرفی کنند. درخت بادام کوهی با نام علمی آمیگدالوس اسکوپاریا اسپچ^۱ درختچه ای است که تنه آن صمغی تراوش می کند که در کنار جنبه های دارویی دارای ارزش صنعتی زیادی است. این صمغ، زدو^۲، صمغ فارسی یا صمغ شیرازی نام دارد. این درختچه متعلق به خانواده گلسرخیان^۳ است و در ایران بطور وحشی و خودرو در مناطق خشک و نیمه خشک ایرانی-تورانی و زاگرس می روید. درختچه ها همچنین در برابر شرایط نامساعد محیطی، کم آبی و نوسانات شدید دما و انواع اقلیم مختلف مقاوم هستند و به خوبی رشد و گسترش می یابند (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۲).

بعلت بومی بودن بادام کوهی، انجام هرگونه مطالعه در مورد آن از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است. در کشور ایران کم و بیش تحقیقاتی در زمینه کاربردهای صمغ زدو در صنایع گوناگون از جمله صنایع غذایی، دارویی و ... صورت گرفته است (خرّمی و همکاران، ۱۳۸۹، Golkar et al., 2015, Hashtjin & Abbasi, 2013, Abbasi & Mohamadi, 2013, Fadavi et al., 2014, Jafari et al., 2013) اما تحقیق جدی بر روی ویژگی های عملکردی پلی ساکارید غالب محلول در آب آن انجام نشده است و این امر میسر نخواهد شد مگر اینکه ترکیب و ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب آن مشخص شود زیرا ویژگی کلیدی پلی ساکاریدها که به آنها اجازه داشتن عملکردهای متعدد را می دهد مستقیماً با ساختار آنها در ارتباط است.

افزون بر این با توجه به اینکه سالیانه مبالغ زیادی صرف واردات صمغ های تجاری به کشور می شود طی این پژوهش سعی شده است با بررسی و شناخت ساختار پلی ساکارید غالب محلول در آب صمغ زدو و حدس زدن در مورد ویژگی های عملکردی آن به عنوان یک صمغ بومی و ناشناخته، صمغ مذکور را به عنوان جایگزینی مناسب برای صمغ های گران قیمت وارداتی پیشنهاد کرد.

^۱ *Amygdalus scoparia spach*

^۲ Zedo

^۳ Rosaceae

فصل اول:

کلیات تحقیق

۱ کلیات تحقیق

۱-۱ کربوهیدرات ها

کربوهیدرات ها فراوانترین مولکول های زیستی روی زمین هستند. فرآیند فتوسنتز سالانه بیش از ۱۰۰ میلیارد تُن CO_2 و H_2O را به گلوکز و سایر محصولات گیاهی تبدیل می کند (Yalpani, 1988).



پلیمرهای کربوهیدرات به طور گسترده در بافت های حیوانی و گیاهی یافت می شوند و وظایف زیر را بر عهده دارند:

- ذخایر انرژی (مانند نشاسته، فروکتان و گلیکوژن).
- اجزای ساختاری (مانند سلولز، کیتین، زایلان ها و مانان ها).
- عناصر حفاظتی (پلی ساکاریدهای دیواره سلولی برخی گیاهان به عنوان آنتی بیوتیک های گیاهی محسوب می شوند مانند فیتوآلکسین ها^۱).
- شناساگرهای سطح سلول (مانند آلیگوساکاریدهای متصل به پروتئین ها (گلیکوپروتئین ها) یا چربی ها (گلیکولیپیدها) که از آنها تحت عنوان مولکول های هیبرید گلیکوکونژوگه یاد می شود).
- عوامل انتقال اطلاعات (مانند اسیدهای نوکلئیک).
- ضد اکسنده های طبیعی به علت جلوگیری از اثرات سوء رادیکال های آزاد (Cui, 2005).

بعلاوه تنوع زیاد و تطابق پذیری کربوهیدرات ها منجر به توجه روزافزون بخش صنعت به این ترکیبات شده است و نقش مهمی را در تولید و توسعه محصولات جدید اعم از فرآورده های غذایی، مواد افزودنی بیولوژیکی، مواد دارویی، منسوجات و مواد بسته بندی زیست تخریب پذیر ایفا می کنند

^۱ Phytoalexins

(Yalpani, 1988).

نام کربوهیدرات ها یا کربن های هیدراته از ترکیب شیمیایی آنها که شامل عناصر کربن، هیدروژن و اکسیژن است نشأت می گیرد. نسبت هیدروژن به اکسیژن در مولکول های این دسته از ترکیبات شیمیایی مشابه با نسبت این عناصر در مولکول آب (به ترتیب ۲ به ۱) است.

از این رو فرمول عمومی که برای کربوهیدرات ها ارائه می شود $C_x(H_2O)_y$ است. لازم به ذکر است که فرمول عمومی مذکور در همه موارد ترکیب حقیقی کربوهیدرات ها را نشان نمی دهد بطوریکه لاکتوز یا قند شیر که عضو گروه کربوهیدرات ها به شمار می آید دارای فرمول بسته $C_{12}(H_2O)_{11}$ است. البته ممکن است برخی از مواد مانند اسید لاکتیک در زمره کربوهیدرات ها محسوب نشوند اما دارای فرمول بسته مشابه با این ترکیبات باشند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

رُبت^۱ در سال ۱۹۹۸ تعریف متفاوتی در مورد کربوهیدرات ها ارائه داد که طبق این تعریف کربوهیدرات ها شامل پلی هیدروکسی آلدئیدها یا پلی هیدروکسی کتون ها و یا ترکیبات مشتق شده از آنها هستند (Robyt, 1998).

کربوهیدرات ها شامل طیف گسترده ای از مولکول ها هستند. این ترکیبات را می توان بر اساس تعداد واحدهای قندی تشکیل دهنده آنها به سه گروه اصلی مونوساکاریدها، آلیگوساکاریدها و پلی ساکاریدها طبقه بندی کرد.

۲-۱ مونوساکاریدها

کلمه ساکارید از لغت یونانی ساخاران^۲ به معنای قند گرفته شده است. در واقع مونوساکاریدها مونومرهای طبیعی هستند که در اثر هیدرولیز نمی توانند به قندهای ساده تر از خود تبدیل شوند. این ترکیبات بی رنگ به آسانی متبلور می شوند و به دلیل وجود تعداد زیادی گروههای هیدروکسیل در

^۱ Robyt

^۲ Sakcharon

ساختارشان به راحتی در آب محلول و در حلال های غیر قطبی نا محلول هستند.

مونوساکاریدها از لحاظ ساختار شیمیایی، پلی الکل هایی هستند که یکی از عوامل الکلی آنها به عامل آلدئید یا کتون تبدیل شده است. به عبارت دیگر تمام کربن های زنجیر کربنی غیر منشعب مونوساکاریدها دارای عامل هیدروکسیل (OH) هستند، به استثناء یکی از اتم های کربن که با پیوند دو گانه به اتم اکسیژن اتصال یافته و ایجاد گروه کربونیل می کند.

اگر گروه کربونیل در قسمت انتهایی زنجیره کربنی قرار گیرد (کربن شماره ۱)، این ترکیب پلی هیدروکسی آلدئید (آلدوز) و اگر بر روی کربن شماره ۲ قرار گیرد پلی هیدروکسی کتون (کتوز) نامیده می شود (جعفر نژاد، ۱۳۹۰). از این رو برای آلدوزها و کتوزها به ترتیب کربن های شماره ۱ و ۲ مراکز فعال و واکنش پذیر این مولکول ها محسوب می شوند و از آنها تحت عنوان کربن های آنومریک^۱ یاد می شود (Wrolstad, 2012).

مونوساکاریدها دارای نامی عمومی با ریشه های تاریخی در علم شیمی، پزشکی و صنعتی هستند مانند گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، ریبوز و بعلاوه هر کدام از مونوساکاریدها با توجه به تعداد کربنی که در ساختار زنجیر کربنی خود دارند (که به طور معمول بین ۳-۷ کربن است) با استفاده از لفظ "اوز"^۲ طبقه بندی می شوند. بنابراین مونوساکاریدهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ کربنه را به ترتیب تریوز، تتروز، پنتوز، هگزوز و هپتوز می نامند. برای هر یک از این توالی های کربنی یک فرم آلدوز و کتوز می تواند وجود داشته باشد، از این رو برای نامگذاری مونوساکاریدهای مربوط به گروه آلدوز از پیشوند "آلدو" در ابتدای این نام ها استفاده می شود مثل آلدوپیرانوز و برای نامگذاری مونوساکاریدهای مربوط به گروه کتوز نیز پسوند (اولوز)^۳ به کار گرفته می شود مانند هگزولوز (Cui, 2005). در صورتیکه مونوساکارید

^۱ Anomeric

^۲ Ose

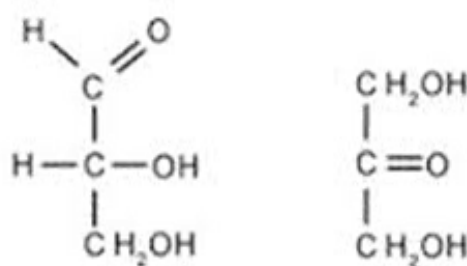
^۳ Ulose

شامل دو گروه آلدئیدی باشد (دی آلدوز)^۱، دو گروه کتون (دی اولوز)^۲ و اگر شامل یک گروه آلدئید و یک گروه کتون باشند (اوسولوز)^۳ نامیده می شود (Belitz et al, 2009).

۱-۲-۱ روش های مختلف نمایش ساختمان مونوساکاریدها

۱-۱-۲-۱ ساختار خطی فیشر^۴

اشکال ساختاری گوناگونی جهت نمایش ساختار مونوساکاریدها در دسترس است. سیستمی که بطور معمول برای نمایش ساختار این ترکیبات مورد استفاده قرار می گیرد، فرم خطی فیشر است که نام این روش از شهرت دانشمند معروف ابداع کننده آن، امیل فیشر^۵ (۱۸۵۲-۱۹۱۹) گرفته شده است. در واقع ساختار مولکول های قند با استفاده از فرم خطی فیشر بدون هیچ ابهامی قابل نمایش هستند و از این حیث که کدی (D و L) را برای جهت گیری استخلاف های هیدروژن و هیدروکسیل در اتم های کربن همجوار فراهم می سازد مفید است. ساده ترین فرم خطی مونوساکاریدها مربوط می شود به ترکیبات سه کربنه گلیسرآلدئید و دی هیدروکسی استن (شکل ۱-۱) که به ترتیب آلدوتریوز و تریولوز نام دارند (Stick, 2001).



شکل (۱-۱): ساختار خطی گلیسر آلدئید (چپ) و دی هیدروکسی استن (راست) (Cui, 2005).

^۱ Dialdose

^۲ Diulose

^۳ Osulose

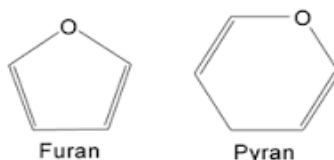
^۴ Fischer

^۵ Emil Fischer

۲-۱-۲-۱ ساختار حلقوی هاورث^۱

علت اینکه واکنش های شیمیایی قندها توسط ساختار خطی فیشر قابل توجه نیست بعد از ابداع این روش، ساختار حلقوی هاورث توسط والتر نورمن هاورث^۲ در سال ۱۹۲۶ با هدف ارائه دیدگاه فضائی و دقیق تر از مولکول های مونوساکاریدی پیشنهاد شد. در محیط های آبی تمام مونوساکاریدهایی که در ساختار خود ۴ تا ۷ اتم کربن دارند از شکل خطی به شکل حلقه های هتروسیکلیک (نامتناجس) در می آیند.

ساختار حلقوی مونوساکاریدها به علت شباهتی که به حلقه شش ضلعی (پیران) و یا حلقه پنج ضلعی (فوران) دارند (شکل ۱-۲)، به ترتیب پیرانوز^۳ و فورانوز^۴ نامیده می شوند. لازم به ذکر است که آلدوزها به علت ایجاد پل اکسیژنی بین گروه کربونیل و گروه هیدروکسیل اتم کربن شماره ۴، افزون بر ساختار پیرانوز قادر به تشکیل فرم حلقوی فورانوز هستند. با این حال حلقه های ۶ اتمی آلدوپیرانوز بسیار پایدارتر از حلقه های آلدوفورانوز هستند و در حالت محلول فرم حلقوی آلدوپیرانوز غالب است (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).



شکل (۱-۲): ساختار حلقه های شش ضلعی پیران (راست) و پنج ضلعی فوران (چپ) (Cui, 2005).

اغلب واحدهای مونوساکاریدی سازنده زنجیرهای پلی ساکاریدی در طبیعت، دارای ساختار حلقه ای ۶ ضلعی پیرانوز هستند (شکل ۱-۳)، در حالیکه در پلی ساکاریدهای میکروبی غالباً ساختار حلقه ای ۷ ضلعی قابل مشاهده است. ساختارهای خطی شکل در سیستم های بیولوژیکی دارای اهمیت کمتری هستند، در حالیکه حلقه های ۵ ضلعی فورانوز از نظر بیولوژیکی اهمیت زیادی دارند زیرا

^۱ Haworth

^۲ Walter Norman Haworth

^۳ Pyranose

^۴ Furanose

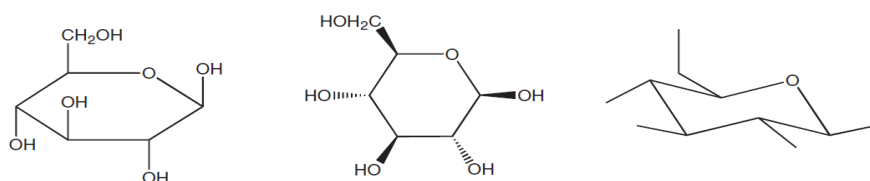
واحدهای ساختاری اسیدهای نوکلئیک را (بتا- D-ریبوز در RNA و ۲-دئوکسی-بتا- D-ریبوز در DNA) تشکیل می دهند (Lapasin & Pricl, 1995).

۳-۱-۲-۱ ساختار میل^۱

این ساختار تصویر هوایی از مونوساکاریدها را همراه با گروه های هیدروکسیل متصل به آنها (شکل ۳-۱) به نمایش می گذارد (Wrolstad, 2012).

۴-۱-۲-۱ ساختار کانفورماسیونی مونوساکاریدها

ساختارهای سه بُعدی مربوط به واحدهای مونوساکاریدی در تعیین ویژگی های زیستی و عملکردی برخی از پلی ساکاریدها مهم محسوب می شوند. با وجود اینکه ساختارهای فیشر و هاورث قادر به نمایش برخی از آرایش های فضائی گروه های متصل به اتم های کربن موجود در ساختار مونوساکاریدها هستند، اما نمی توانند اشکال واقعی و زوایای پیوندی این مولکول ها را به تصویر بکشند (DeMan, 1999). در سال ۱۹۰۰ هسل^۲ حین انجام مطالعات خود بر روی پرتوهای الکترونی انکسار یافته از ساختار سیکلو هگزانی آلدوزها در فاز گازی، متوجه شد که این ترکیبات دارای شکل کانفورماسیونی غیر مسطح شبیه به صندلی هستند (Hassel & Ottar, 1947). چرخش حول پیوندهای سیگما بین اتم های کربن - کربن و کربن - اکسیژن در ساختار حلقه ای مونوساکاریدها که منجر به ایجاد اشکال متعددی از فرم حلقه شده و موقعیت نسبی گروه های هیدروکسیل و اتم هیدروژن متصل به حلقه نسبت به یکدیگر (شکل ۳-۱)، کانفورماسیون نامیده می شود (Cui, 2005).



شکل (۳-۱): ساختار کانفورماسیونی (راست)، ساختار میل^۱ (وسط) و ساختار هاورث (چپ) (Cui, 2005).

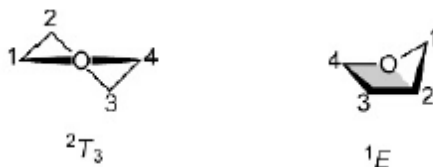
^۱ Mills

^۲ Hassel

حلقه های پیرانوز و فورانوز می توانند به صورت تعدادی از ایزومرهای کانفورماسیونی با پایداری ترمودینامیکی متفاوت وجود داشته باشند.

ب) کانفورماسیون حلقه فورانوز:

کانفورماسیون های رایج برای حلقه های فورانوز، اشکال پاکت^۱ و مارپیچ^۲ هستند که به ترتیب آنها را با علائم اختصاری E و T نمایش می دهند. ۱۰ نوع شکل کانفورماسیونی برای هر یک از این دو شکل امکان پذیر است که ۲ نوع آن در شکل ۴-۱ به تصویر کشیده شده است (Cui, 2005).



شکل (۴-۱): ساختار کانفورماسیونی پاکت شکل (راست) و مارپیچ شکل (چپ) (Cui, 2005).

الف) کانفورماسیون حلقه پیرانوز:

اشکال کانفورماسیونی شناخته شده حلقه پیرانوز شامل اشکال صندلی^۳، قایق^۴، نیمه صندلی^۵ و آریب^۶ هستند که به ترتیب با علامت های اختصاری C, B, H و S نمایش داده می شوند. برای طراحی اشکال کانفورماسیونی مختلف ایزومری چند قانون کلی را باید در نظر گرفت که عبارتند از:

(۱) حرف اول نام لاتین اشکال مختلف کانفورماسیونی، به عنوان علائم اختصاری برای نمایش این اشکال به کار برده می شوند. برای مثال علائم اختصاری C یا B به ترتیب برای نشان دادن کانفورماسیون های صندلی و قایق مورد استفاده قرار می گیرند.

(۲) سطح اصلی اشکال کانفورماسیونی مثل شکل صندلی، به صورت یک شکل هندسی چهار وجهی

^۱ Envelope

^۲ Twist

^۳ Chair

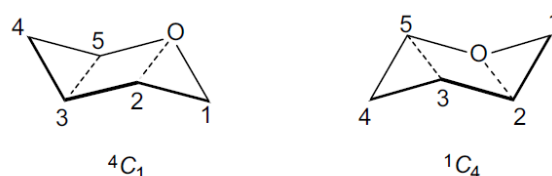
^۴ Boat

^۵ Half Chair

^۶ Skew

نمایش داده می شود که اتم های کربن و اکسیژن در قسمت گوشه های آن قرار می گیرند (شکل ۱-۵).

۳) شماره اتم هایی که به صورت برجسته در سمت بالای سطح ساختارهای کانفورماسیونی قرار می گیرند را در قسمت بالای علامت اختصاری آنها و به صورت پیشوند می نویسند و شماره اتم هایی که در سمت پایین سطح کانفورماسیونی قرار دارند را به صورت زیر نویس و بعد از علامت اختصاری آنها نمایش می دهند (Schwarz, 1973).



شکل (۱-۵): نحوه نمایش ساختار کانفورماسیونی (Cui, 2005).

از بین اشکال کانفورماسیونی پیرانوزها :

- تنها ۲ شکل کانفورماسیونی برای حالت صندلی امکان پذیر است که در شکل ۱-۶: الف به

نمایش درآمده است.

- ۶ شکل کانفورماسیونی برای حالت قایقی امکان پذیر است که تنها ۲ شکل در شکل ۱-۶:

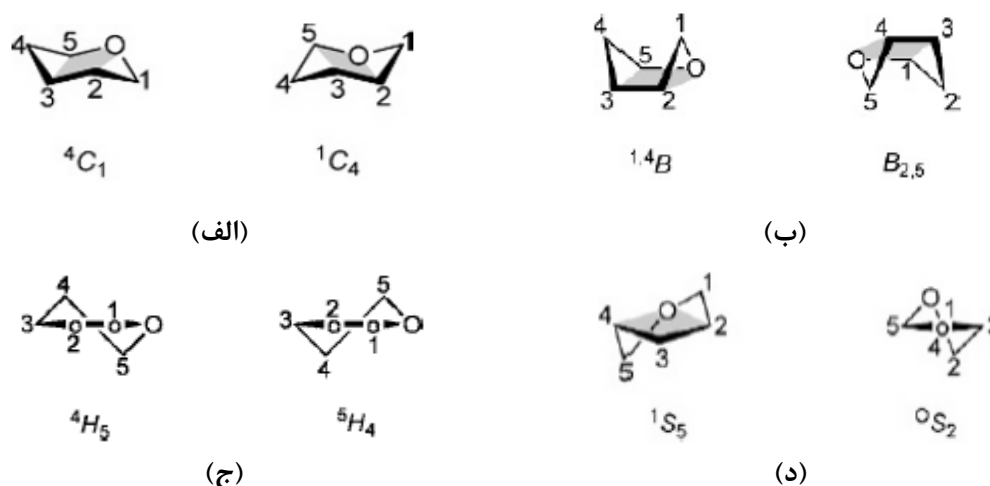
ب به تصویر کشیده شده است.

- شکل نیمه صندلی، کانفورماسیونی رایج برای نمایش برخی از مشتقات کربوهیدرات ها است

که حلقه پیرانوز دچار اصلاح شیمیایی شده است. افزون بر این در حلقه های پیرانوزی که حاوی یک پیوند دوگانه هستند شکل کانفورماسیونی غالب آنها نیمه صندلی است. ۱۲ شکل کانفورماسیونی برای حالت نیمه صندلی امکان پذیر است که تنها ۲ شکل در شکل ۱-۶: ج نشان داده شده است.

- ۶ شکل کانفورماسیونی برای حالت اُریب امکان پذیر است که تنها ۲ شکل در شکل ۱-۶: د

ترسیم شده است (Stick & Williams, 2009).



شکل (۱-۶): ساختار کانفورماسیونی امکان پذیر برای اشکال صندلی (الف)، قایقی (ب)، نیمه صندلی (ج) و اُریب (د) (Stick & Williams, 2009).

۱-۲-۲ ایزومری در قندها

ترکیباتی که دارای فرمول ساختاری یکسان ولی شکل فضائی متفاوتی هستند ایزومر نام دارند. دیاستروایزومرها^۱، ایزومرهای مولکولی هستند که در آرایش فضائی یک یا چند اتم کربن نامتقارن متفاوت هستند (Wrolstad, 2012). سه نوع ایزومری در مونوساکاریدها اعم از ایزومری عاملی، ایزومری حلقه و ایزومری نوری از اهمیت بالایی برخوردار هستند.

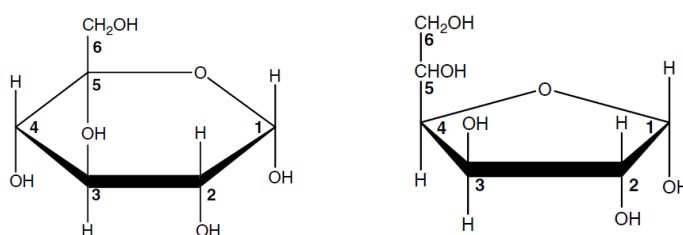
(۱) **ایزومری عاملی:** آلدوزها و کتوزهایی که تعداد کربن برابری داشته باشند ایزومر عاملی تلقی می شوند. در واقع ساختار شیمیایی آلدوزها به این نحو است که عامل کربونیلی بر روی کربن شماره ۱ قرار دارد در حالیکه در ساختار شیمیایی کتوز عامل کربونیلی بر روی کربن شماره ۲ واقع شده است. برای مثال ترکیباتی مانند گلوکز و فروکتوز فرمول ساختاری یکسانی دارند اما شکل فضائی آنها با هم متفاوت است.

^۱ Diastereoisomers

جدول (۱-۱): مونوساکاریدهای حاوی ایزومری عاملی (Cui, 2005).

مونوساکاریدها	آلدوز	کتوز
تریوز	گلیسر آلدئید	دی هیدروکسی استن
تتروز	اریتروز	اریتولوز
پنتوز	ریبوز	ریبولوز
هگزوز	گلوکز	فروکتوز

۲) ایزومری حلقه: همانطور که قبلاً اشاره شد، در آلدوهگزوزها به دنبال ایجاد پل اکسیژنی بین گروه کربونیل و گروه هیدروکسیل کربن های شماره ۵ یا ۴ به ترتیب ساختار حلقوی پیرانوز و فورانوز تشکیل می شوند. برای مثال همانطور که در شکل شماره ۱-۷ مشخص است، آلفا- D- گلوکو پیرانوز و آلفا- D- گلوکو فورانوز نسبت به یکدیگر ایزومر حلقه حساب می شوند زیرا دارای ساختار شیمیایی یکسان اما آرایش فضائی متفاوتند. لازم به ذکر است که ساختار حلقه های ۶ اتمی آلدوپیرانوز بسیار پایدارتر از حلقه های ۶ اتمی آلدوفورانوز هستند و در حالت محلول فرم حلقوی آلدوپیرانوز غالب است (Lapasin & Priel, 1995).



شکل (۱-۷): ایزومرهای حلقه آلفا- D- گلوکو فورانوز (راست)، آلفا- D- گلوکو پیرانوز (چپ) (Cui, 2005).

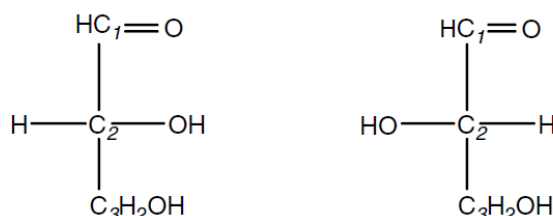
۳) ایزومری نوری (اُپتیک)^۱: ایزومر نوری، متداول ترین نوع ایزومری در قندها است. این نوع ایزومرها تنها در صورتیکه کربن نامتقارن (کایرال)^۲ در ساختار شیمیایی قندها وجود داشته باشد ایجاد

^۱ Optic

^۲ کربنی که به چهار گروه مختلف متصل شده است.

می شوند. بعلاوه قندهایی که در ساختار شیمیایی خود کربن نا متقارن دارند دارای خاصیت چرخش نور پلاریزه در جهات و مقادیر مختلف هستند. تمامی مونوساکاریدها به جزء دی هیدروکسی استن یک یا چند کربن نامتقارن دارند، بنابراین می توانند به صورت اشکال ایزومری با فعالیت نوری مختلف دیده شوند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰). ایزومری نوری در ۴ گروه مختلف ایزومری D و L، انانتیومری^۱، اپیمری^۲ و آنومری^۳ طبقه بندی می شود.

• ایزومری D و L: اگر در ساختار خطی مونوساکارید، گروه هیدروکسیل دورترین کربن نامتقارن نسبت به گروه کربونیل در سمت راست زنجیر کربنی واقع شده باشد ایزومری قند از نوع D و اگر گروه هیدروکسیل در سمت چپ زنجیر کربنی قرار گرفته باشد نوع ایزومری، L خواهد بود. گلیسر آلدئید ساده ترین آلدوز با یک کربن نامتقارن و دارای دو ایزومر نوری مختلف (شکل ۸-۱) است (Cui, 2005). در طبیعت به استثناء مقادیر قابل توجهی از L - رامنوز، L - آرابینوز، L - فوکوز و L - گلوکونات، اغلب قندها ایزومری نوع D دارند (Lapasin & Pricl, 1995).



شکل (۸-۱): ساختار د- (چپ) و ل- گلیسر آلدئید (راست) (Cui, 2005).

• انانتیومری: اگر جهت گروه های هیدروکسیل تمام کربن های نامتقارن دو مونوساکارید کاملاً در خلاف جهت یکدیگر باشند، آنها را ایزومر آینه ای یا انانتیومر می نامند. این ترکیبات دارای خاصیت چرخش نور پلاریزه در مقادیر یکسان اما در جهات مخالف یکدیگر هستند.

^۱ Enantiomer

^۲ Epimer

^۳ Anomer

ترکیباتی که ایزومر آینه ای یکدیگرند مانند D و L گلیسر آلدئید دارای فرمول تجربی یکسانی هستند اما خواص فیزیکی و شیمیایی آنها متفاوت است. برای مثال D گلیسر آلدئید در دمای اتاق ($^{\circ}\text{C}$ ۲۵) نور پلاریزه را به سمت راست (+) و به میزان ($+\frac{8}{7}$) درجه منحرف می کند در حالیکه L گلیسر آلدئید در دمای اتاق نور پلاریزه را به سمت چپ (-) و به میزان ($-\frac{8}{7}$) درجه منحرف می کند. باید به این نکته توجه داشت که D یا L بودن یک قند نشان دهنده جهت انحراف نور پلاریزه نیست. شکل D برخی از قندها مانند D - گلوکز و D - زایلوز راست گردان هستند و توانایی چرخاندن نور پلاریزه به سمت راست یا در جهت عقربه های ساعت را دارند در حالیکه دیگر قندهای شکل D مانند D - آرابینوز، D - ریبوز و D - فروکتوز چپ گردان هستند و توانایی چرخاندن نور پلاریزه به سمت چپ یا در خلاف عقربه های ساعت را دارند (Cui, 2005).

لازم به ذکر است در صورتیکه مقدار ایزومرهای D و L یک مونو ساکارید با هم برابر باشد مخلوط حاصله فعالیت نوری ندارد زیرا فعالیت نوری هر دو ایزومر یکدیگر را خنثی می کنند و چنین مخلوطی را مخلوط راسمیک^۱ یا (DL) می نامند (El Khadem, 1988).

چرخش نوری ویژه^۲ خصوصیت فیزیکی مهمی در قندها محسوب می شود و برای شناسایی قندها و اندازه گیری غلظت آنها کاربرد دارد. اندازه گیری این خاصیت توسط دستگاه پلاریمتر^۳ که دارای منبع نور پلاریزه شده صفحه ای است، صورت می گیرد و میزان درجه انحراف نور عبوری از سل حاوی محلول قندی توسط منشور این دستگاه اندازه گیری می شود. چرخش نوری ویژه اشکال D و L چند قند خاص در جدول (۱-۲) نشان داده شده است (Wrolstad, 2012).

• اپیمری: نوعی ایزومر نوری است که در آن آرایش فضائی تنها یک اتم کربن نامتقارن از اعضا این نوع ایزومر با یکدیگر متفاوت است. برای مثال تفاوت گلوکز با مانوز تنها در آرایش فضائی گروه

^۱ Racemic Mixture

^۲ Specific Optical Rotation

^۳ Polarimeter

هیدروکسیل متصل به کربن شماره ۲ است یا گلوکز و گالاکتوز تنها در آرایش فضائی گروه هیدروکسیل متصل به کربن شماره ۴ با یکدیگر تفاوت دارند. این نوع ایزومر از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا از نقطه ذوب مشتقات دی نیتروفنیل هیدرازون برای شناسایی قندها طبق یک روش کلاسیک استفاده می شود (Wrolstad, 2012).

جدول (۱-۲): چرخش ویژه $[a]^{20}_D$ فرم ال و د تعدادی از قندها (Wrolstad., 2012)

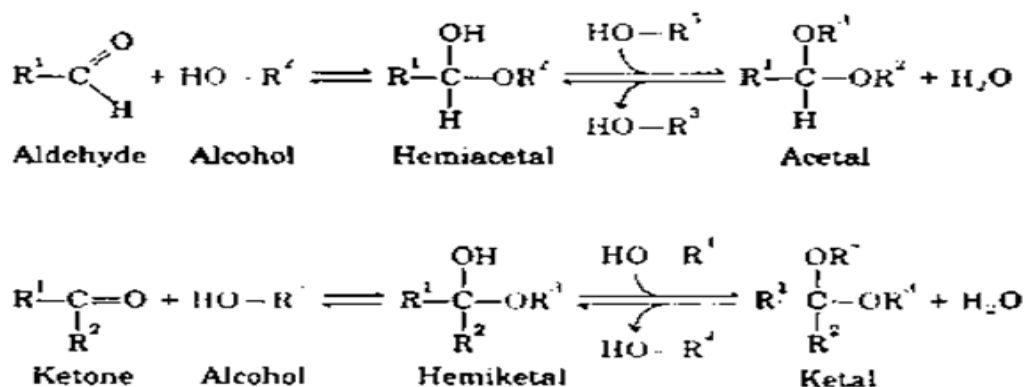
قند	$[a]^{20}_D$	قند	$[a]^{20}_D$
د-گلیسر آلدئید	+۱۳/۵	ال-گلیسر آلدئید	+۱۳/۵
د-ریبوز	-۲۱	ال-ریبوز	+۲۱
د-آرابینوز	-۱۰۵	ال-آرابینوز	+۱۰۵
د-گزیلوز	+۱۹	ال-گزیلوز	-۱۹
د-گلوکز	+۵۲	ال-گلوکز	-۵۲
د-مانوز	+۱۴	ال-مانوز	-۱۴
د-گالاکتوز	+۸۰	ال-گالاکتوز	-۸۰
د-فروکتوز	-۹۲	ال-فروکتوز	+۹۲

- آنومری: تمام مونوساکاریدهایی که بین ۴ تا ۷ اتم کربن دارند غالباً در محیطهای آبی، به صورت ساختارهای حلقوی هستند. گروه کربونیل این ترکیبات توسط پیوند کووالانسی به اکسیژن یکی از گروه های هیدروکسیل موجود در طول زنجیر کربنی متصل شده و در نتیجه مشتقاتی به نام همی استال و همی کتال تشکیل می دهد (شکل ۱-۹). به دنبال تشکیل این ساختارهای حلقوی، کربن عامل کربونیلی (کربن آنومری) تبدیل به یک کربن نامتقارن می شود. نوع آرایش فضائی گروه هیدروکسیل حول اتم کربن آنومری، تولید ایزومر نوری جدیدی به نام آنومری می کند که با علامت آلفا (α) و بتا (β) نمایش داده می شود. لازم به ذکر است که همی استال و همی کتال در محیط های قلیایی مقاومند و در مجاورت با اسید، با مولکول دیگری ترکیب شده و تولید استال و کتال می کند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

تشخیص نوع آلفا (α) و بتا (β) بودن ایزومر آنومری به صورتی است که آخرین کربن نامتقارن

نسبت به گروه کربونیل به عنوان مرجع در نظر گرفته می شود و آرایش فضائی گروه هیدروکسیل کربن آنومری نسبت به آرایش فضائی گروه هیدروکسیل کربن مرجع سنجیده می شود. در صورتیکه این دو عامل در وضعیت سیس (همسو) باشند آنومر را نوع آلفا (α) و اگر در وضعیت ترانس (غیر همسو) باشند آنومر را نوع بتا (β) می نامند.

به عبارت دیگر در آنومرهای نوع آلفا (α) مونوساکاریدهایی که در سری D قرار دارند، OH متصل به کربن آنومری در سمت پایین حلقه قرار می گیرد و در آنومرهای نوع بتا (β)، OH متصل به کربن آنومریک در سمت بالای حلقه واقع شده است. در مونوساکاریدهای سری L شرایط کاملاً برعکس سری D است (Stick & Williams, 2009).



شکل (۹-۱): تشکیل همی استال، استال، همی کتال و کتال (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

نه تنها قندهای مختلف چرخش نوری ویژه متفاوت و مخصوص خود را دارند بلکه اشکال حلقوی و آنومری قندهای مشابه نیز چرخش نوری ویژه متفاوتی دارند. وقتی کریستال های یک نوع قند در یک حلال قرار گیرند اشکال آنومری آلفا (α) و بتا (β) به یکدیگر تبدیل می شوند. ضمن تبدیل فرم آلفا (α) به فرم بتا (β) و برعکس، ساختار حلقوی مونوساکاریدها باز می شود و به صورت زنجیر باز می آید. طی این فرآیند آرایش فضائی پیرامون کربن های آنومری تغییر کرده و دچار بازآرایی می شود. این پدیده، تغییرات در قدرت چرخش نوری مونوساکاریدها را به دنبال دارد و به این نوع تغییر در توان

چرخش نوری، موتاروتاسیون^۱ گفته می شود (Belitz et al., 2009). جدول ۳-۱ چرخش نوری ویژه چند قند مختلف را نشان می دهد.

جدول (۳-۱): چرخش ویژه $[a]^{20}_D$ تعدادی از قندها (Wrolstad, 2012)

قند	$[a]^{20}_D$ ابتدایی	$[a]^{20}_D$ نهایی
آلفا-دی-گلوکز	+۱۱۲	+۵۲
بتا-دی-گلوکز	+۱۹	+۵۲
آلفا-دی-گالاکتوز	+۱۴۴	+۸۰
بتا-دی-گالاکتوز	+۵۲	+۸۰
آلفا-دی-مانوز	+۳۴	+۱۵
بتا-دی-مانوز	-۱۷	+۱۵
بتا-دی-فروکتو پیرانوز	-۱۳۳	-۹۲
بتا-دی-فروکتو فورانوز	-۲۱	-۹۲
آلفا-دی-زایلوز	+۹۲	+۱۹
بتا-دی-زایلوز	-۲۰	-۱۹

۳-۲-۱ تعیین ساختار کانفورماسیونی پایدار مونوساکاریدها

ساختارهای حلقوی پیرانوز و فورانوز قندها می توانند با اتخاذ آرایش های فضائی گوناگون، اشکال کانفورماسیونی متعددی را با پایداری ترمودینامیکی متفاوت بوجود آورند. از بین اشکال کانفورماسیونی متعددی که برای ساختار حلقوی مونوساکاریدها امکان پذیر است یکی از آنها نسبت به بقیه پایدارتر است و نسبت به سایر اشکال ارجحیت دارد. در واقع این اشکال به خاطر سطح پایین انرژی داخلی و عدم وجود فشار زاویه ای مطلوب تلقی می شوند (Stoddart, 1971). دو روش اساسی برای پیش بینی ثبات نسبی اشکال گوناگون کانفورماسیونی موجود است که عبارتند از:

(۱) روشی که بر مبنای محاسبه مقدار انرژی آزاد گیبس^۲ در پی اندازه گیری میزان ثابت تعادل

دی الکتريک است (Angyal, 1968).

^۱ Mutarotation

^۲ Gibbs Free Energy

۲) روشی که طی آن تمام نیروهای جاذبه و دافعه بین اتم ها (برای مثال نیروهای واندروالس، نیروهای دو قطبی - دو قطبی، پیوندهای هیدروژنی و تعاملات استریک) محاسبه می شود (Lapasin & Pricl, 1995).

کانفورماسیون مطلوب مولکول قند در حالت جامد لزوماً مشابه کانفورماسیون مطلوب آن در حالت محلول نیست. برای مثال در مورد کریستال های قند، اشکال منفرد بلورها ممکن است مطلوب تلقی شوند اما در حالت محلول که بین اشکال کانفورماسیونی مختلف تعادل وجود دارد ممکن است اشکال کانفورماسیونی که دارای بیشترین مقدار هستند مطلوب تلقی شوند. دو راه برای بررسی اشکال کانفورماسیونی مولکول های مونوساکاریدی وجود دارد که عبارتست از :

- استفاده از اشعه X برای شناسایی ساختار و اشکال کانفورماسیونی مولکول های جامد و

کریستالی مونوساکاریدها

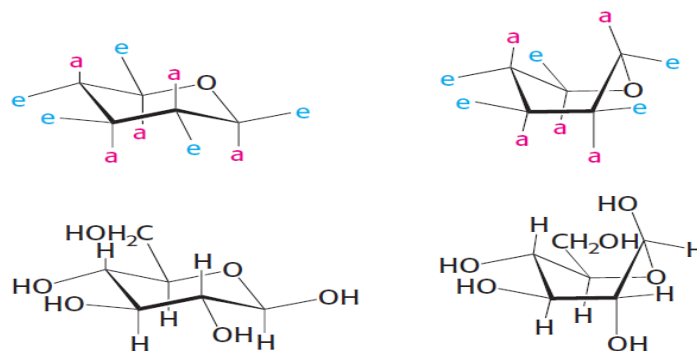
- به کارگیری روش طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته (NMR)^۱ برای تعیین اشکال کانفورماسیونی مولکول های مونوساکاریدی در حالت محلول (Stick & Williams, 2009).
- بارتون^۲ اولین کسی بود که اهمیت دو نوع مختلف از باندهای موجود (استوایی^۳ و محوری^۴) در سیکلوهگزان ها را شناخت و از آن برای توضیح اشکال کانفورماسیونی و واکنش پذیری مولکول هایی مانند استروئیدها بهره برد (Barton, 1953). استخلاف های هر اتم کربن در ساختار حلقوی مونوساکاریدها دارای دو جهت گیری محوری و استوایی است. اتصالات محوری عمود بر سطح حلقه می باشند در حالیکه اتصالات استوایی تقریباً موازی با سطح (شکل ۱-۱۰) حلقه هستند (Stryer et al., 2012).

^۱ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

^۲ Barton

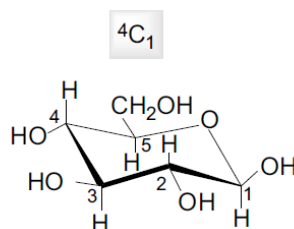
^۳ Axial

^۴ Equatorial



شکل (۱۰-۱): جهت گیری محوری (a) و استوایی (e) استخلافهای هر اتم کربن (Stryer et al., 2012).

D - گلوکز عمومی ترین مونوساکاریدی است که در ساختار اغلب کربوهیدرات ها وجود دارد. ساختار پیرانوزی D - گلوکز هنگامیکه به صورت محلول است به دلیل هندسه چهار وجهی اتم های کربن اشباع، مسطح نیست و ساختارهای فضائی آنها شبیه به صندلی و قایق است. β - D - گلوکز حدود $\frac{2}{3}$ اشکال آنومری محلول های حاوی D - گلوکز را، زمانیکه در حالت تعادل تبادلی خود قرار دارند، تشکیل می دهد. به عبارت دیگر شکل ایزومری β - آنومر با ساختار کانفورماسیونی 4C_1 به عنوان کانفورماسیون مطلوب D - گلوکز ارجحیت دارد و مطلوب تر تلقی می شود (Cui, 2005).



شکل (۱۱-۱): ساختار کانفورماسیونی مطلوب بتا-D-گلوکز (Cui, 2005).

علت برتری کانفورماسیون ذکر شده به اشغال شدن تمام موقعیت های محوری توسط اتم های هیدروژن و قرار گرفتن گروه های حجیمی مانند گروه های هیدروکسیل OH و CH_2OH در موقعیت های استوایی مربوط می شود. در این نوع آرایش فضائی گروه های حجیم و بزرگ دور از یکدیگر و در پایین ترین سطح انرژی و تعاملات قرار دارند. در حالیکه قرار گرفتن گروه های حجیم در موقعیت های محوری سطح بالایی از انرژی را با حداکثر تعاملات بین این گروه ها ایجاد می کنند (Hassel & Ottar, 1947).

در سال ۱۹۴۷ هسل^۱ و آتر^۲ شواهدی را بدست آوردند مبنی بر اینکه اگر در اشکال کانفورماسیونی گروه های حجیم در موقعیت های محوری بر روی اتم های کربن شماره ۱ و ۳ در یک سمت از حلقه قرار گیرند ثبات این اشکال به شدت کاهش یافته و بسیار ناپایدار می شوند.

با گسترش کاربرد نظریه هسل و آتر در مورد آنالیز اشکال کانفورماسیونی، ریوز^۳ در سال ۱۹۵۱ پیشنهاد کرد که به غیر از اتم هیدروژن، هرگونه اتم قرار گرفته روی استخلاف های محوری حلقه پیرانوز یک عنصر بی ثبات محسوب می شود (Reeves, 1951).

۴-۲-۱ واکنش ها و مشتقات مهم مونوساکاریدها

افزون بر مونوساکاریدهای ساده مانند گلوکز، گالاکتوز و مانوز، برخی مشتقات قندی وجود دارند که در آنها گروه هیدروکسیل موجود در ترکیب اولیه بوسیله سایر استخلاف ها جایگزین می شود یا اینکه یکی از اتم های کربن، اکسید شده و به گروه کربوکسیل تبدیل می شود. در ادامه واکنش ها و مشتقات مهم مونوساکاریدها بطور مختصر شرح داده شده است.

۱-۴-۲-۱ واکنش های احیاء

گروه کربونیل مونوساکاریدها می تواند به آسانی تحت تأثیر عوامل احیاء کننده مانند هیدروژن، کاتالیزورهای معدنی و یا آنزیم ها قرار گرفته و تولید قندهای الکلی (آلدیتول)^۴ کند. در واقع طی این واکنش یک اتم هیدروژن به کربن آنومری موجود در هگزوز اولیه اضافه می شود.

برای نامگذاری این ترکیبات، به جای پسوند "اوز"^۵ از پسوند "ایتول"^۶ استفاده می شود. برای مثال D - گلوسیتول^۷ در اثر احیاء شدن D - گلوکز تولید می گردد که با نام سوربیتول نیز شناخته

^۱ Hassel

^۲ Ottar

^۳ Reeves

^۴ Alditol

^۵ Ose

^۶ Itol

^۷ D-glucitol

می شود. احیاء شدن D - فروکتوز دو الکل ایزومری D - گلوسیتول و D - مانیتول^۱ تولید می کند. آلدوزها و کتوزها می توانند به آسانی تحت تأثیر بوروهیدرات سدیم در pH ۶-۱۰ احیاء شوند یا D - گلوکز به طور خاص می تواند توسط آنزیم D - سوربیتول دهیدروژناز^۲ احیاء شود. سوربیتول به صورت طبیعی در بسیاری از میوه ها مانند توت، گیلان، گلابی، زرد آلو و سیب و D - مانیتول در ترشحات گیاهی و جلبک های دریایی وجود دارد (Cui, 2005).

آلدیتول های دیگری نیز وجود دارند که می توان به گلیسرول^۳، ریبیتول^۴، اریترول^۵ و گالاکتیول^۶ اشاره کرد (Wrolstad, 2012).

۱-۲-۴-۲ واکنش های اکسیداسیون

گروه آلدئیدی آلدوزها می تواند به آسانی اکسید و تبدیل به گروه کربوکسیل شود. این واکنش منجر به تولید اسیدهای آلدونیک^۷ می شود. برای نامگذاری این ترکیبات از پسوند " اسید اونیک^۸ " استفاده می شود. برای مثال به دنبال اکسیداسیون عامل آلدئیدی D - گلوکز، اسید گلوکونیک^۹ (شکل ۱-۱۲) تولید می شود. اسید گلوکونیک از ترکیبات اولیه طبیعی آبمیوه و عسل است.

از آنجائیکه طی فرآیند اکسیداسیون عامل آلدئیدی آلدوز، عامل اکسنده را احیاء می کند، به آلدوزها قندهای احیاء کننده می گویند. به عبارت دیگر گلوکز و سایر قندهایی که قادر به احیاء یون فریک (Fe³⁺) و یا کوپریک (Cu²⁺) هستند قندهای احیاء کننده نام دارند. این ویژگی اساس واکنش فهلینگ^{۱۰}

^۱ D-mannitol

^۲ D-sorbitol dehydrogenase

^۳ Glycerol

^۴ Ribitol

^۵ Erythritol

^۶ Galactitol

^۷ Aldonic acids

^۸ Onic acid

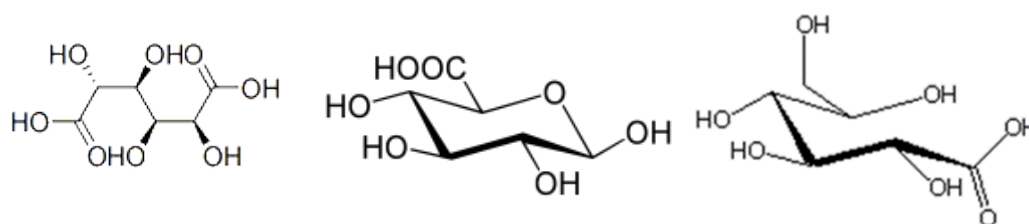
^۹ Gluconic acids

^{۱۰} Fehling's test

است. این واکنش نوعی آزمایش کیفی برای جست و جوی قندهای احیاء کننده در نمونه های غذایی و سایر مواد بیولوژیکی است (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

به دنبال اکسیداسیون عامل الکلی نوع اول (CH_2OH) قندهای آلدوزی و تبدیل آنها به اسیدهای کربوکسیلیک، اسیدهای گلیکوروئیک^۱ تولید می شوند. برای نامگذاری این ترکیبات از پسوند " اسید اورونیک " استفاده می شود. برای مثال به دنبال اکسیداسیون الکل نوع اول گلوکز، اسید گلوکوروئیک^۲ (شکل ۱-۱۲) تولید می شود. اسیدهای اورونیک واحدهای سازنده بسیاری از پلی ساکاریدها هستند. برای مثال اسید D - گالاکتوروئیک^۳ جزء اصلی سازنده پکتین است (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

اکسیداسیون هر دو عامل آلدئیدی و الکل نوع اول در قندهای آلدوزی، اسیدهای آلداریک^۴ را تولید می کند. برای نامگذاری این ترکیبات از پسوند " اسید آریک^۵ " استفاده می شود مانند اسید گلوکاریک که ساختار آن در شکل ۱-۱۲ آمده است (Belitz et al., 2009).



شکل (۱-۱۲): ساختار اسید گلوکونیک (راست)، اسید گلوکوروئیک، اسید گلوکاریک (چپ) (Wrolstad, 2012).

۱-۲-۳-۴ قندهای دئوکسی^۶ و آمین دار

جایگزینی گروه هیدروکسیل با یک پروتون منجر به تولید یک قند دئوکسی می شود. این نام بیانگر این موضوع است که اتم کربن با شماره مشخص فاقد اکسیژن می باشد و در واقع احیاء شده است. تعداد کمی از قندهای دئوکسی در طبیعت وجود دارند. در D - ریبوز جایگزینی معمولاً در موقعیت گروه

^۱ Glycuronic acids

^۲ Glucuronic acids

^۳ D-galacturonic acid

^۴ Aldaric acids

^۵ Aric acid

^۶ Deoxy sugars

هیدروکسیل کربن شماره ۲ انجام شده و منجر به تولید ۲ - دئوکسی - D - ریبوز، از اجزای DNA می شود.

جایگزینی گروه هیدروکسیل موجود در موقعیت کربن شماره ۶ D - مانوز توسط یک پروتون تولید ۶ - دئوکسی - D - مانوز می کند که D - رامنوز^۱ نامیده می شود. رامنوز که در طبیعت اغلب دارای آرایش فضائی L است نقش ساختاری مهمی در پلی ساکارید پکتین ایفا می کند و به عنوان یک گلیکوزید فنولیک در گیاهان یافت می شود (Butterworth & Hanessian, 1971).

جایگزینی گروه هیدروکسیل توسط گروه آمین منجر به تولید قندهای آمین دار می شود. قندهای آمین دار جایگزین قندهای دئوکسی بوده و با یک ترتیب الفبایی به صورت پیشوند دئوکسی نام گذاری می شوند. متداول ترین قندهای آمینه ۲ - آمینو - ۲ - دئوکسی - D - گلوکز و ۲ - آمینو - ۲ - دئوکسی - D - گالاکتوز هستند که به ترتیب تحت عنوان D - گلوکز آمین^۲ و D - گالاکتوز آمین^۳ شناخته می شوند.

قندهای آمین دار و N - استیل آمین ها در ترکیبات کربوهیدراتی اولیه گلیکوپروتئین ها یافت می شوند. N - استیل - D - گلوکز آمین بلوک های ساختمانی کیتین^۴ را تشکیل می دهند (Pigman et al., 1980).

۱-۲-۴-۴ اتر و استرهای قندی

ترکیبات قندی با اسیدها استریفیه شده و استرهای مختلف تولید می کنند. همه گروه های هیدروکسیل از جمله نوع آنومری قادر به شرکت در این واکنش هستند. استریفیکاسیون به طور معمول به دنبال تیمار کربوهیدرات ها توسط با اسید کلرید و اسید انیدرید انجام می شود. بسیاری از

^۱ D-rhamnose

^۲ D-glucosamine

^۳ D-galactosamine

^۴ Chitin

کربوهیدرات ها در طبیعت به صورت مشتقات استر فسفات وجود دارند.

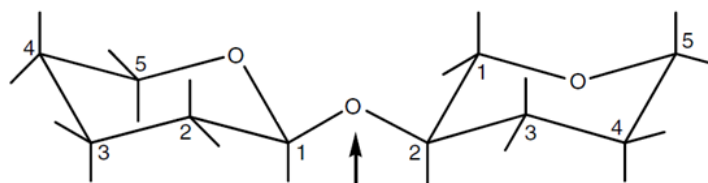
ترکیبات قندی به دنبال ترکیب با یکدیگر یا آسیل هالیدها^۱ تولید اتر می کنند. اشکال اتری کربوهیدرات ها چندان در طبیعت رایج نیست، با این حال بین گروه های هیدروکسیل اتم های کربن شماره ۳ و ۶ D - گالاکتوزهایی که واحد ساختمانی پلی ساکاریدهای جلبک های دریایی قرمز مانند آگار^۲، فورسلاران^۳ و کاپا، یوتا - کاراگینان^۴ را تشکیل می دهند اتصال اتری شکل می گیرد (Belitz et al., 2009).

۱-۳ دی و آلیگوساکاریدها

۱-۳-۱ پیوند های گلیکوزیدی

ویژگی بیوشیمیایی مونوساکاریدها بوسیله واکنش با سایر مولکول ها دچار تغییر می شود. این تغییرات منجر به افزایش تنوع بیوشیمیایی کربوهیدرات ها شده و آنها را قادر می سازد که به عنوان یک ناقل پیام عمل کنند و یا اینکه مستعد سوختن و تولید انرژی شوند.

پیوندی که بین کربن آنومری یک مونوساکارید و اتم اکسیژن گروه هیدروکسیل (عامل الکلی) واحد قندی دیگر ایجاد می شود پیوند گلیکوزیدی^۵ یا به طور اختصاصی تر، پیوند O - گلیکوزیدی نامیده می شود.



شکل (۱-۱۳): تصویری از پیوند گلیکوزیدی (Cui, 2005)

به عبارت دیگر واکنش شیمیایی اتم کربن آنومری شکل همی استال یا همی کتال قندها با گروه

^۱ Acyl halids

^۲ Agar

^۳ Furcellaran

^۴ K, ι Carrageenan

^۵ Glycosidic Linkage

هیدروکسیل شکل همی استال یا همی کتال قند دیگر تولید ستال یا کتال کامل می کند و پیوند موجود در این ساختار پیوند گلیکوزیدی نامیده می شود (Bochkov et al., 1979).

هنگامیکه کربوهیدرات ها جهت تشکیل پلیمرهای طویل به یکدیگر متصل می شوند، پیوندهای O - گلیکوزیدی پیوندهای غالبند. بعلاوه در گلیکوپروتئین ها و نوکلئوتیدها اتم کربن آنومری قند می تواند توسط پیوند N - گلیکوزیدی به اتم نیتروژن گروه آمین متصل شود. پیوندهای گلیکوزیدی به راحتی توسط اسیدها هیدرولیز می شوند اما نسبت به مواد قلیایی مقاوم هستند بنابراین جوشاندن زنجیرهای هیدروکربنی با اسید رقیق، موجب هیدرولیز این ترکیبات و تولید مونوساکاریدهای آزاد تشکیل دهنده آنها می شود (Stick & Williams, 2009).

۱-۳-۲ دی ساکاریدها

مولکول دی ساکارید از اتصال دو مونوساکارید به یکدیگر توسط پیوند O - گلیکوزیدی تشکیل می شود.

دی ساکاریدها بسته وجود یا عدم وجود کربن آنومری آزاد در ساختارشان به دو گروه احیاء کننده^۱ و غیر احیاء کننده^۲ طبقه بندی می شوند. برای مثال دی ساکارید مالتوز از اتصال گلیکوزیدی دو واحد D - گلوکز بین کربن های شماره ۱ (کربن آنومری) یک مولکول قند با کربن شماره ۴ مولکول دیگر تشکیل می شود (شکل ۱-۱۴). با توجه به اینکه دی ساکارید مالتوز کربن آنومری آزاد دارد یک دی ساکارید احیاء کننده محسوب می شود (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

لازم به ذکر است که برای توصیف ساختار آلیگو و پلی ساکاریدها، انتهای باز زنجیر کربوهیدرات ها که دارای کربن آنومری آزاد است معمولاً انتهای احیاء کننده نامیده می شود.

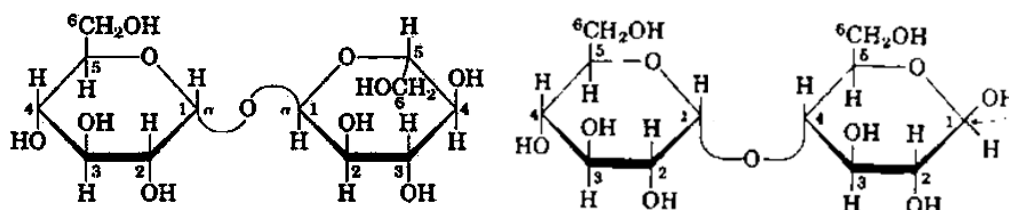
دی ساکارید ترهالوز^۳ که از واحدهای قندی یکسان D - گلوکز تشکیل شده است یک دی ساکارید

^۱ Reducing

^۲ Non reducing

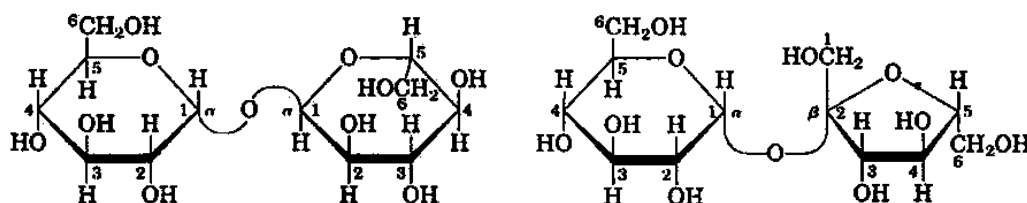
^۳ Trehalose

غیر احیاء کننده محسوب می شود (شکل ۱-۱۴). این ترکیب از اجزاء اصلی همولنف در حشرات و یک منبع ذخیره کننده انرژی است. قارچ ها نیز حاوی ترهالوز هستند و به عنوان منبع تجاری آن شناخته می شوند (Wrolstad, 2012).



شکل (۱-۱۴): دی ساکاریدهای احیاء کننده مالتوز (راست) و غیر احیاء کننده ترهالوز (چپ) (جعفرنژاد، ۱۳۹۰).

در نوعی دیگر از طبقه بندی می توان دی ساکاریدها را بر اساس ترکیب مونوساکاریدی آنها به دو گروه همگن و ناهمگن تقسیم کرد. همودی ساکاریدها دو واحد مونوساکاریدی یکسان دارند مانند مالتوز، سلوبیوز و ترهالوز که همگی از واحدهای مونوساکاریدی D-گلوکز تشکیل شده اند. در حالیکه هترو دی ساکاریدها حاوی دو واحد مونوساکاریدی متفاوتند. دو هترو دی ساکارید ساکارز و لاکتوز از مهمترین دی ساکاریدها محسوب می شوند و اغلب به صورت طبیعی در چغندر قند و شیر وجود دارند (Cui, 2005).

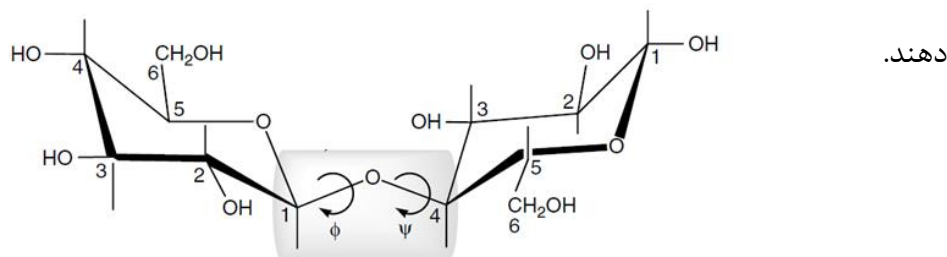


شکل (۱-۱۵): دی ساکاریدهای ناهمگن ساکارز (راست) و همگن ترهالوز (چپ) (جعفرنژاد، ۱۳۹۰).

۱-۲-۳-۱ ساختار کانفورماسیونی دی ساکاریدها

از آنجائیکه اشکال کانفورماسیونی انواع زنجیرهای هیدروکربنی در پلی ساکاریدها از جهت گیری واحدهای مونوساکاریدی مجاور هم نسبت به یکدیگر مشخص می شود، توصیف اشکال کانفورماسیونی این پلیمرها مشکل است و مطالعه آنها میسر نیست مگر اینکه اشکال کانفورماسیونی توالی های کوچکتر

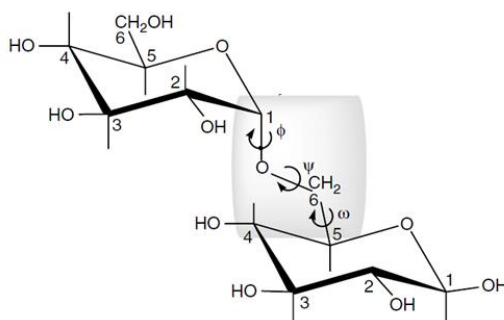
از پلی ساکاریدها مانند دی و آلیگو ساکاریدها مورد مطالعه قرار گیرند (Lapasin & Prich, 1995). واحدهای قندی در دی ساکاریدها می توانند آزادانه حول پیوند گلیکوزیدی چرخش کنند. جهت گیری نسبی دو واحد قندی مجاور هم در دی ساکاریدها معمولاً توسط دو زاویه چرخشی موجود در اطراف پیوند گلیکوزیدی تعیین می شود (شکل ۱-۱۶). این زوایا را با حروف یونانی ϕ و ψ نمایش می



شکل (۱-۱۶): زوایای چرخشی حول پیوند گلیکوزیدی (Cui, 2005).

هنگامیکه پیوند گلیکوزیدی بین کربن شماره ۱ از یک واحد قندی و کربن شماره ۶ مونوساکارید دیگر شکل می گیرد منجر به تشکیل زاویه چرخشی بزرگ ω می شود (شکل ۱-۱۷). در واقع تشکیل زاویه ω ، آزادی واحد مونوساکاریدی را به منظور اتخاذ طیف گسترده ای از جهت گیری ها نسبت به واحد مونوساکاریدی دیگر، افزایش می دهد (Shallenberger, 1982).

کانفورماسیون دی ساکاریدها توسط مجموعه متغیری از مقادیر زوایای چرخشی و کانفورماسیونی ϕ و ψ موجود در حول پیوند گلیکوزیدی تعیین می شود. سطح انرژی اشکال کانفورماسیونی دی ساکاریدها با یک جفت خاص از زوایای چرخشی مرتبط است و مقادیر آنها را می توان با توجه به پیوندهای واندروالس، قطبی و هیدروژنی بین دو واحد مونوساکاریدی برآورد کرد.



شکل (۱-۱۷): تشکیل زاویه چرخشی بزرگ ω حول پیوند گلیکوزیدی (Cui, 2005).

اشکال کانفورماسیونی دی ساکاریدها در حالت جامد همانند مونوساکاریدها در پایین ترین سطح انرژی و تعاملات خود قرار دارند و مقادیر زوایای چرخشی در این حالت ثابت است. از دلایل مهم ثبات اشکال کانفورماسیونی دی ساکاریدها در حالت جامد، پیوندهای هیدروژنی درون ساختاری آنها است (Belitz et al., 2009).

با توجه به تعاملات بین دی ساکاریدها و حلال در حالت محلول، ممکن است حداقل سطح انرژی برای اشکال کانفورماسیونی با حالت جامد متفاوت باشد. دلیل این امر مربوط به نوسانات و چرخش دائمی حول باندهای گلیکوزیدی است زیرا در محلول ها همیشه برخوردهای براونی^۱ وجود دارد بنابراین شکل کانفورماسیونی دی ساکاریدها در حالت محلول ثابت نیست (Lapasin & Pricl, 1995). اشکال کانفورماسیونی مطلوب با سطح انرژی پایین برای دی و آلیگوساکاریدها از طریق اطلاعات حاصل از داده های تجربی توسط پرتوهای X و NMR مشخص می شوند (Belitz et al, 2009).

۱-۳-۳ سایر آلیگو ساکاریدها

مطابق با تعریف اتحادیه بین المللی شیمی محض و کاربردی (IUPAC)^۲، آلیگو ساکاریدها ترکیباتی هستند که ۳ تا ۹ واحد مونوساکاریدی دارند. رافینوز^۳ از مهمترین تری ساکاریدهایی است که به طور گسترده در گیاهان یافت می شود و به طور تجاری از ملاس چغندر و دانه های کتان تهیه می شود (Cui, 2005).

۱-۴ پلی ساکاریدها

۱-۴-۱ تعریف و نامگذاری پلی ساکاریدها

اغلب ترکیبات قندی به صورت پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا (پلی ساکاریدها) در طبیعت وجود

^۱ Browni

^۲ International Union of Pure and Applied Chemistry

^۳ Raffinose

دارند. این نوع پلیمرها حاوی تعداد زیادی (گاهی بیش از ۱۰۰ واحد) مونوساکارید که از هر دو سمت توسط پیوند O – گلیکوزیدی به یکدیگر متصل می شوند هستند (Bender, 1986).

نامگذاری پلی ساکاریدها در گذشته بر اساس منابع بیولوژیکی مشتق شده و ویژگی بارز آنها انجام می شد. گلیکان^۱ نام کلی پیشنهادی توسط کمیسیون ها برای پلی ساکاریدها است. در صورتیکه یک گلیکان یا پلی ساکارید حاوی یک نوع مونوساکارید (گلیکوزید) در ساختار خود باشد برای نامگذاری این نوع پلیمر از نام مونوساکارید استفاده می شود با این تفاوت که پسوند " اوز " در انتهای نام اجزای مونوساکاریدی توسط پسوند " ان " جایگزین می شود. برای مثال فروکتان نام پلی ساکارید مشتق شده از مونومرهای فروکتوز است.

در مواردی که پلی ساکاریدها حاوی بیش از یک نوع مونوساکارید در ساختار خود باشند نامگذاری آنها بر اساس نوع واحد ساختاری زنجیر اصلی و نام سایر اجزای قندی به صورت پیشنهادی انجام می شود. برای نمونه گلوکو – آرابینو – گالاکتان نام پلی ساکاریدی است که واحدهای قندی زنجیر اصلی آن را گالاکتوز تشکیل می دهد و گلوکز و آرابینوز از اجزای قندی دیگر محسوب می شوند. در صورتیکه تشخیص واحد سازنده زنجیر اصلی به سادگی امکان پذیر نباشد، نامگذاری ترکیب بر اساس پیشنهاد نام اجزاء به ترتیب حروف الفبا همراه با اصطلاح گلیکان در انتهای نام آن صورت می گیرد. مانند گالاکتو – گلوکو – مانو – گلیکان.

علی رغم استفاده از نامگذاری ذکر شده، هنوز بسیاری از پلی ساکاریدها نامگذاری رایج خود را از زمان گذشته حفظ کرده اند مانند سلولز، نشاسته، گلیکوژن، کیتین، پکتین، اینولین و ... به هر حال هر دو نامگذاری رایج و سیستماتیک مورد پذیرش است (جهان بین، ۱۳۹۰).

۱-۴-۲ طبقه بندی پلی ساکاریدها

روش های مختلفی برای طبقه بندی پلی ساکاریدها وجود دارد که در ادامه مهمترین آنها آورده شده

^۱ Glycan

است.

۱-۲-۴-۱ منشاء

گروه‌بندی رایجی که به طور عمده در مورد پلی ساکاریدها مطرح می شود طبقه بندی آنها بر اساس منشاء تولیدشان -است. در این طبقه بندی پلی ساکاریدها در چهار گروه پلی ساکاریدهای حیوانی، گیاهی، دریایی و میکروبی قرار می گیرند (Cui, 2005).

۱-۲-۴-۲ نوع واحد تشکیل دهنده

در این طبقه بندی پلی ساکاریدها به دو دسته اصلی به شرح زیر تقسیم می شوند:

۱-۲-۲-۴-۱ همو گلیکان ها^۱

همو گلیکان ها پلی ساکاریدهایی هستند که تنها از یک نوع مونومر تشکیل شده اند. برخی از آنها مانند نشاسته و گلیکوژن حاوی مونومرهای $D - \alpha$ - گلوکز با اتصالات $(1 \rightarrow 4)$ هستند و پلی ساکارید ذخیره ای محسوب می شوند که به عنوان منبع انرژی مورد استفاده موجودات زنده قرار می گیرند. هموپلی ساکاریدهایی مانند سلولز و کیتین از مونومرهای یکسان $D - \beta$ - گلوکز با اتصالات $(1 \rightarrow 4)$ تشکیل شده اند به عنوان عناصر ساختاری دیواره سلولی گیاهان و اسکلت خارجی حیوانات ایفای نقش می کنند.

هموپلی ساکاریدها می توانند با توجه به آرایش فضائی اتصالات گلیکوزیدی (آلفا (α) یا بتا (β)) و موقعیت پیوندها، از یک یا چند نوع پیوند گلیکوزیدی تشکیل شده باشند.

۱-۲-۲-۴-۲ هتروگلیکان ها^۲

هتروگلیکان ها دسته ای از پلی ساکاریدها هستند که در ساختار خود دو یا چند نوع مونومر مختلف دارند. هتروپلی ساکاریدها معمولاً پوشش خارج سلولی موجودات زنده را تشکیل می دهند. برای مثال

^۱ Homo Glycans

^۲ Hetero Glycans

بخشی از لایه سخت پوشش سلولی باکتری ها حاوی این ترکیبات است اگر چه بطور گسترده در منابع گیاهی نیز وجود دارند. هتروپلی ساکاریدها می توانند علاوه بر انواع مختلف واحدهای مونومری دارای انواع مختلفی از پیوندهای گلیکوزیدی باشند و این موضوع باعث تنوع نامحدود ساختار آنها می شود (Aspinall, 1972).

۱-۴-۲-۳ ساختار شیمیایی

همانطور که قبلاً اشاره شد پلی ساکاریدها پلیمرهای متراکمی هستند که بین قسمت گلیکوزیل همی استال یا همی کتال یک واحد قندی سازنده آنها و گروه هیدروکسیل واحد قندی دیگر، به عنوان مولکول پذیرنده، پیوندهای گلیکوزیدی شکل می گیرد. خاصیت تک ظرفیتی قسمت های گلیکوزیل در مقابل خاصیت چند ظرفیتی مولکول های پذیرنده، علاوه بر اینکه امکان ایجاد شاخه و انشعابات را در زنجیرهای پلی ساکاریدی فراهم می کند، به علت تشکیل پیوندهای گلیکوزیدی، از ایجاد پیوندهای متقاطع درون مولکولی (پیوندهای کووالانسی) بین انشعابات مجاور جلوگیری می کند. بنابراین ممکن است برخی از پلی ساکاریدها مانند سلولز دارای ساختار خطی و برخی دیگر مانند گلیکوژن ساختار منشعب داشته باشند. در حالیکه برخی از پلی ساکاریدها به طور استثنا دارای ساختار حلقوی هستند و تحت عنوان سیکلوآمیلوزها^۱ شناخته می شوند (Cui, 2005).

پلی ساکاریدها برخلاف پروتئین ها، پلی ساکاریدها محصول ثانویه ژن هستند و در طبیعت توسط آنزیم های مختلف بیوسنتز (گلیکوزیل ترانسفرازها)^۲ تولید می شوند. به عبارت دیگر مسیر کلی بیوسنتز بسیاری از پلی ساکاریدها شناخته شده است اما مکانیسم کنترل وقایع خاص در طی بیوسنتز مانند چگالی و توزیع شاخه ها در طول زنجیر پلی ساکاریدی یا طول انشعابات به طور کلی واضح نیست (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

^۱ Cycloamyloses

^۲ Glycosyl transferases

۱-۴-۲-۴ بار یونی

پلی ساکاریدهایی که فاقد قند اسیدی هستند و تنها واحدهای قندی ساده دارند پلی ساکاریدهای خنثی^۱ نامیده می شوند مانند آمیلوز، آمیلو پکتین و سلولز.

برخی از پلی ساکاریدها قندهای اسیدی دارند و به علت داشتن گروه های کربوکسیل یونیزه شده حامل بارهای الکتریکی منفی هستند که به آنها پلی ساکاریدهای آنیونی^۲ می گویند. مانند بخش های اسید گالاکتورونیک سازنده ساختار پکتین.

کیتوزان^۳ تنها پلی ساکارید کاتیونی شناخته شده است. این پلی ساکارید در اثر اصلاح پلی ساکارید حیوانی کیتین، که به صورت طبیعی وجود دارد، حاصل می شود. کیتوزان در pH ۶ تا ۷ حامل بار الکتریکی مثبت است (Cui, 2005).

۱-۴-۲-۵ الگوی ساختاری مونومرها در یک توالی

پلی ساکاریدها بر اساس نوع الگوی ساختاری واحدهای قندی موجود در یک توالی به سه گروه عمده تقسیم می شوند.

(۱) انواع متناوب^۴ (دوره ای): در این گروه واحدهای قندی طبق یک الگوی تکراری مرتب می شوند مانند سلولز، آمیلوز و اسید هیالورونیک.

(۲) انواع منقطع^۵: این گروه متشکل از تعدادی بخش های متناوب هستند که توسط قسمت های نامنظم و بی قاعده از یکدیگر جدا می شوند مانند آلژینات، کاراگینان ها و پکتین.

(۳) انواع نامتناوب^۶: در این گروه توالی های نامنظم و بی قاعده از انواع مختلف مونوساکاریدها،

موقعیت و آرایش فضائی پیوندها وجود دارد مانند اجزای کربوهیدرات ها در گلیکوپروتئین ها. (Belitz

^۱ Neutral polysaccharides

^۲ Anionic polysaccharides

^۳ Chitosan

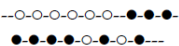
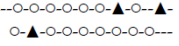
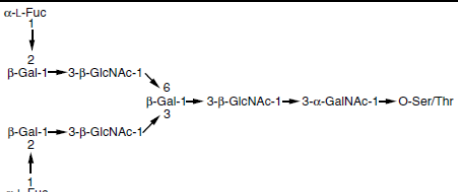
^۴ Periodic chains

^۵ Interrupted sequences

^۶ Aperiodic sequences

(et al., 2009).

جدول (۴-۱): طبقه بندی پلی ساکاریدها با توجه به توالی واحدهای قندی در زنجیر (Cui, 2005).

پلیمر	عملکرد	نوع واحد قندی	نوع توالی
نوع متناوب (دوره ای)	زخیره سازی انرژی	آلفا-د-گلوکو پیرانوز (○)	----○-○-○-○-○----
آمیروز	مواد ساختاری	بتا-د-گلوکو پیرانوز (●)	----●-●-●-●-●----
نوع منقطع	تشکیل ژل داخل و خارج سلولی	اسید آلفا-ال- گلوکورونیک و اسید بتا-د-مانورونیک (○)	
پکتین	اجزای دیواره سلولی گیاهان	اسید آلفا-د- گالاکتورونیک و ال- رامنو پیرانوز (▲)	
نوع نامتناوب	برخی از آلیگوساکاریدها در خون		زنجیرهای آلیگوساکاریدی از گلیکوپروتئینها

۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها مانند سایر پلیمرهای زیستی مثل پروتئین ها دارای ساختار اولیه، ثانویه، سوم و چهارم هستند و در واقع ساختار فضائی پلی ساکاریدها شباهت زیادی با سایر بیوپلیمرها دارد. ساختار اولیه پلی ساکاریدها نشان دهنده توالی کووالانسی واحدهای مونوساکاریدی در طول زنجیر است.

همانطور که قبلاً اشاره شد واحدهای مونومری در یک پلی ساکارید به دنبال چرخش حول باندهای گلیکوزیدی تحت فشار قرار می گیرند. جهت گیری نسبی بین دو مونومر مجاور در یک پلی ساکارید توسط زوایای چرخشی و زوایای دو سطحی^۱ اطراف پیوندهای گلیکوزیدی (ψ و ϕ) مطابق با آنچه که برای دی ساکاریدها مطرح شد بیان می شود. اغلب مونومرهای متصل تمایل دارند جهت گیری اتخاذ

^۱ Dihedral angles

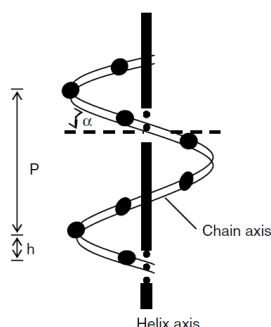
کنند که از سطح انرژی پایین تر و پایداری بالاتری برخوردار باشد (شکل ۱-۱۷). بنابراین زنجیر پلی ساکاریدی که ساختار اولیه دارد شکل هندسی خاصی به خود می گیرد که به عنوان ساختار ثانویه پلی ساکاریدها (ساختار کانفورماسیونی) در نظر گرفته می شود. ممکن است زنجیرهای پلی ساکاریدی با ساختار دوم با یکدیگر تعامل داشته و موجب شکل گیری ساختارهای سوم پلی ساکاریدها شوند. در این نوع ساختار، زنجیرهای پلی ساکاریدی به طور منظم سازماندهی می شوند و به شکل دسته ها یا میسل های حاوی چند تا چند ده زنجیر پلی ساکاریدی در می آیند. در نهایت وجود چنین تراکمی باعث ایجاد تعامل بین زنجیرهای پلی ساکاریدی دارای ساختار سوم شده و در نتیجه سطح بالاتری از سازماندهی ایجاد می شود. چنین ساختاری منجر به شکل گیری شبکه های سه بُعدی بزرگ تحت عنوان ساختارهای چهارتایی^۱ می شود (Lapasin & Prich, 1995).

ساختار کانفورماسیونی پلی ساکاریدها را می توان در دو دسته کلی منظم و نامنظم طبقه بندی کرد. ساختارهای کانفورماسیونی منظم مقادیر زوایای چرخشی (ψ و ϕ) ثابتی حول باندهای گلیکوزیدی در بخش هایی از پلی ساکارید دارند مانند حالت جامد یا هنگامیکه ژل های پایدار تشکیل می شود. ساختارهای کانفورماسیونی نامنظم مقادیر زوایای چرخشی متغیری حول باندهای گلیکوزیدی دارند که دلیل آن نوسانات دائمی حول پیوندهای گلیکوزیدی موجود بین مونومرهای مجاور، در سراسر زنجیر پلی ساکاریدی است. عموماً کانفورماسیون منظم پلی ساکاریدها به صورت شکل هندسی مارپیچ^۲ (شکل ۱-۱۸) توصیف می شود (Sarka & Marchessault, 1967).

ساختار کانفورماسیونی مارپیچ و ویژگی های آن را می توان با استفاده از پارامترهای n (تعداد واحدهای تکرار شونده در هر نوبت) و h (طول مشخص هر واحد مونومریک در امتداد طول محور مارپیچ) توصیف کرد. جهت گیری پیچ های یک مارپیچ با علامت های + یا - برای عدد n توصیف می شود. از علامت های + و - به ترتیب برای توصیف پیچ هایی که در سمت راست و چپ محور مارپیچ قرار دارند

^۱ Quaternary^۲ Helical geometry

استفاده می شود (Rees & Scott, 1971).



شکل (۱-۱۸): تصویر شماتیکی از ساختار کانفورماسیونی مارپیچی شکل (Cui, 2005).

۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی زنجیرهای هموپلی ساکاریدی

هموگلیکان های خطی بهترین گروه پلی ساکاریدی شناخته شده از نظر کانفورماسیون مولکولی هستند. این ترکیبات تنها حاوی یک نوع بخش قندی و یک نوع پیوند هستند. ساختار دوم (ساختار کانفورماسیونی) هموگلیکان ها، بر اساس زوایای دو سطحی تشکیل شده بین اتصالات گلیکوزیدی موجود در سراسر زنجیر (ψ و ϕ)، به چهار نوع کانفورماسیون با اشکال مختلف روبان مانند^۱، مارپیچ توخالی^۲، اربب مانند^۳ و لولا مانند (بند بند با حرکت آزاد)^۴ تقسیم می شوند. شایع ترین کانفورماسیون برای هموگلیکان ها، نوع روبان مانند و مارپیچ توخالی است که در شکل ۱-۱۹ به نمایش درآمده است (Rao et al., 1967).



شکل (۱-۱۹): ساختار کانفورماسیونی روبان مانند (راست) و مارپیچ تو خالی (چپ) (Cui, 2005).

۱-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی روبان مانند

این نوع کانفورماسیون برای بخش های β - D - گلوکوپیرانوزیل با اتصالات ($1 \rightarrow 4$) یا بخش های α

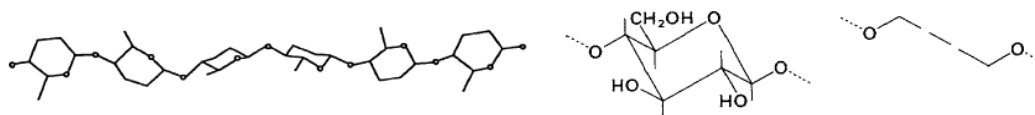
^۱ Ribbon like

^۲ Hollow helices

^۳ Crumpled ribbons

^۴ Loosely jointed chains

D – گالاکتو پیرانوزیل با اتصالات (۱→۴) در زنجیرهای پلی ساکاریدی در نظر گرفته می شود. در این کانفورماسیون، پیوندهای موجود در زنجیر پلی ساکاریدی معمولاً به نحوی است (اتصال مونومرها توسط پل اکسیژنی) که منجر به ایجاد شکل هندسی زیگزاگ مانند می شود (شکل ۱-۲۰).



شکل (۱-۲۰): ساختار و شکل کانفورماسیونی روبان مانند (Belitz et al., 2009).

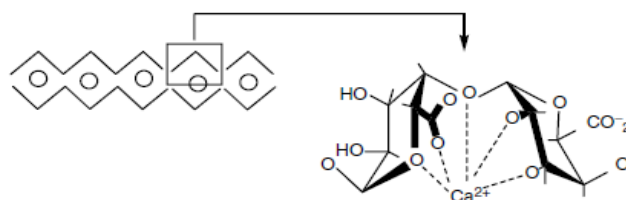
این نوع از زنجیرهای پلی ساکاریدی معمولاً به شکل روبان هستند و ممکن است به صورت طویل یا اینکه فشرده باشند. زنجیرهای روبان مانند طویل دارای مقادیر مجازی از n در محدوده $(۲-۴) \pm$ و مقادیری از h معادل حداکثر طول یک بخش هستند. این مقادیر حاکی از این است که طول هر مونومر باید تقریباً موازی با محور مارپیچ باشد. بعلاوه در این نوع از زنجیرها، زوایای دو سطحی از باند گلیکوزیدی ۱۸۰° درجه است (Rees, 1977).

زنجیرهای روبان مانند آسانتر ردیف و همتراز شده و سریع تر می توانند توسط پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی متراکم شوند. سلولز نمونه ای از یک پلیمر خطی متشکل از واحدهای قندی β D – گلوکوز با اتصالات (۱→۴) است. این ترکیب دارای کانفورماسیون روبان مانند طولی به شکل مضاعف (دو تایی) است و همین امر موجب جلوگیری از نفوذ حلال در داخل ساختارشان و در نتیجه نا محلول بودن آنها در آب می شود.

زنجیرهای روبان مانند ممکن است در اثر ایجاد اتصالات هیدروژنی بین بخش های مجاور تا حدودی متراکم شده و به صورت یک نوار خمیده درآیند. این نوع از آرایش زنجیرها به هنگام تشکیل ساختار سوم ممکن است باعث ایجاد شکاف هایی در داخل ساختار فضائی شوند. چنین ساختارهایی اغلب تحت عنوان مدل جعبه تخم مرغی^۱ شناخته شده و معمولاً توسط پیوند با کاتیون های فلزی مانند Ca^{2+}

^۱ Egg-box model

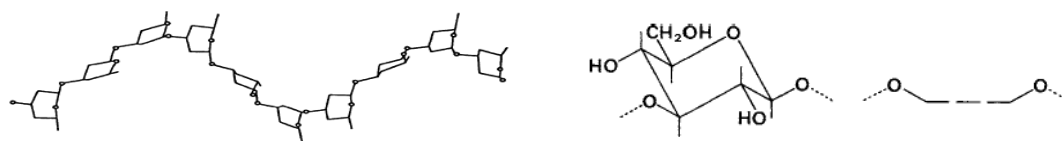
پایدار می شوند (شکل ۱-۲۱). پلی ساکاریدهای ایجاد کننده ژل مانند پکتین ها و آلژینات ها دارای این نوع کانفورماسیون هستند (Settineri & Marchessault, 1965).



شکل (۱-۲۱): ساختار کانفورماسیونی مدل جعبه تخم مرغی (Cui, 2005).

۱-۳-۴-۲ ساختار کانفورماسیونی مارپیچ تو خالی

اگر در یک زنجیر پلی ساکارید، اگر اتصالات بین مونومرها به شکل موازی، کوتاه و U مانند باشند، شکل هندسی ساختار حاصل شده به احتمال زیاد به صورت یک مارپیچ تو خالی است (شکل ۱-۲۲).



شکل (۱-۲۲): ساختار و شکل کانفورماسیونی مارپیچ تو خالی (Belitz et al., 2009).

این نوع کانفورماسیون در زنجیرهای پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای β - D - گلوکوپیرانوز با اتصالات (۱→۳) مانند پلی ساکارید باکتریایی کردلان^۱ و نیز پلیمرهای حاوی واحدهای α - D - گلوکوپیرانوز با اتصالات (۱→۴) مانند آمیلوز حاصل از گرانول های نشاسته وجود دارد.

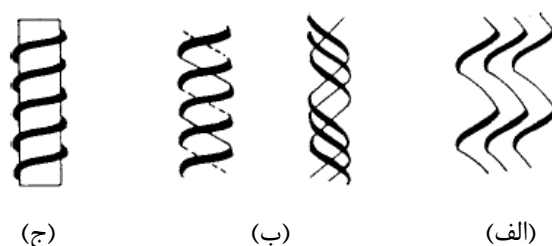
در این نوع از کانفورماسیون ها مقدار n بین $(10-2) \pm$ متغیر است در حالیکه مقدار h بسیار کم و نزدیک به صفر می باشد. این مقادیر به این معنی است که بخش ها، تقریباً عمود بر محور مارپیچ هستند. با توجه به اینکه شکل هندسی این نوع کانفورماسیون ها به صورت حفره تو خالی در امتداد محور مارپیچ است، زنجیرهای پلیمری معمولاً توسط روش های گوناگون تثبیت می شوند. هنگامیکه قطر این مارپیچ ها بزرگ باشد فضای خالی موجود در مرکز ساختار می تواند توسط مولکول های مناسب با اندازه کوچک

^۱ Curdlan

تر پُر شود و یک اجتماع شکل گیرد (شکل ۱-۲۳ ج). ساختار کانفورماسیونی آمیلوز مثال خوبی برای این نوع ساختار است. آمیلوزها ساختاری ۶ رشته ای با کانفورماسیون مارپیچ دابل^۱ (مضاعف) موازی در سمت چپ هستند.

حال در صورتیکه قطر مارپیچ ها کوچک باشد زنجیرهای پلی ساکاریدی کشیده و طویل می شوند. این ساختارها می توانند مارپیچ های رشته ای درهم تنیده طناب مانند را به صورت دابل (دوتایی) یا سوبل^۲ (سه تایی) تشکیل دهند (شکل ۱-۲۳ ب).

اگر زنجیرها بسیار طویل و کشیده باشند، کانفورماسیون برای ایجاد ثبات طناب مانند نبوده بلکه به صورت یک مجموعه زیگزاگ و چین خورده (شکل ۱-۲۳ الف) است (Cui, 2005).



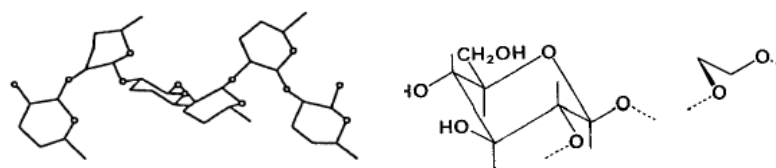
شکل (۱-۲۳): مارپیچ چین خورده (الف)، مارپیچ دابل و سوبل (ب)، مارپیچ تو پُر (ج) (Cui, 2005).

۳-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی اُریب مانند (منحنی)

این نوع کانفورماسیون در زنجیرهای پلی ساکاریدی متشکل از مونومرهای $D - \beta$ - گلوکوپیرانوز با اتصالات (۱→۲) قابل مشاهده است. در این نوع کانفورماسیون مقدار h حدود ۲-۳ آنگسترم و n دارای مقادیر متنوعی از ۲- تا ۴ است. بعلاوه زوایای سطحی پیوندهای گلیکوزیدی بین مونومرها حدود ۶۰ درجه است. این کانفورماسیون ها کمیاب و نادر هستند اگر چه در توالی رامنو گالاکتورونیک اسید در پکتین و برخی از پلی ساکاریدهای باکتریایی وجود دارند (Rees, 1977).

^۱ Double helix

^۲ Triple helix



شکل (۱-۲۴): ساختار و شکل کانفورماسیونی آریب مانند (Belitz et al., 2009).

۴-۱-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی لولا مانند (بند بند با حرکت آزاد)

این نوع کانفورماسیون‌ها معمولاً در زنجیرهای پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای β - D - گلوکوپیرانوز با اتصالات (۶→۱) وجود دارند. پلی ساکاریدها با این نوع کانفورماسیون از نظر خصوصیات تنوع زیادی دارند و انعطاف پذیری آنها مربوط به پل های ارتباطی (پل اکسیژنی) بین مونومرها است. در واقع در این نوع ساختارها به جای ۲ پل ارتباطی، ۳ پل وجود دارد و بخش های قندی فاصله بیشتری نسبت به یکدیگر دارند.



شکل (۱-۲۵): ساختار کانفورماسیونی لولا مانند (Belitz et al., 2009).

این زنجیرهای پلی ساکاریدی به دلیل تمایل زیادشان در محلول شدن قابل تشخیص هستند. بنابراین چنین کانفورماسیونی واکنش های شیمیایی پلی ساکاریدها مانند واکنش های آنزیمی و نیز اتصالات یونی با آب را تسهیل می کند (Belitz et al., 2009).

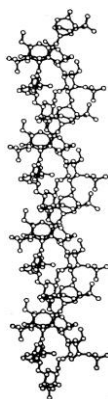
۴-۱-۳-۲ ساختار کانفورماسیونی زنجیرهای هتروپلی ساکاریدی

همانطور که قبلاً اشاره شد هتروگلیکان ها (هتروپلی ساکاریدها) بیش از یک نوع واحد قندی یا بیش از یک نوع پیوند گلیکوزیدی دارند. شناسایی و تشخیص کانفورماسیون دقیق آنها به دلیل پیچیدگی های مربوط به فضای چند بُعدی کار سخت و دشواری است. در ادامه ساختار کانفورماسیونی سه نوع هتروگلیکان بطور خلاصه شرح داده شده است.

۱-۲-۳-۴-۱ ساختار کانفورماسیونی هتروگلیکان های نوع تناوبی (دوره ای)

واحدهای قندی در هتروپلی ساکاریدهای نوع تناوبی طبق یک الگوی تکراری (دوره) مرتب می شوند. یوتا کاراگینان، آگارز و اسید هیالورونیک ساده ترین زنجیرهای متناوب هستند. هر سه پلیمر حاوی واحدهای قندی β - D - گلوکوپیرانوز با دو نوع اتصال گلیکوزیدی ($1 \rightarrow 3$) و ($1 \rightarrow 4$) هستند. در صورتیکه واحدهای قندی با اتصالات ($1 \rightarrow 4$) به تنهایی در یک هموپلی ساکارید وجود داشته باشند منجر به تشکیل کانفورماسیون روبان مانند می شوند در حالیکه حضور واحدهای قندی با اتصالات ($1 \rightarrow 3$) به تنهایی در یک هموگلیکان تمایل به تشکیل مارپیچ تو خالی را دارند (Lapasin & Prich, 1995).

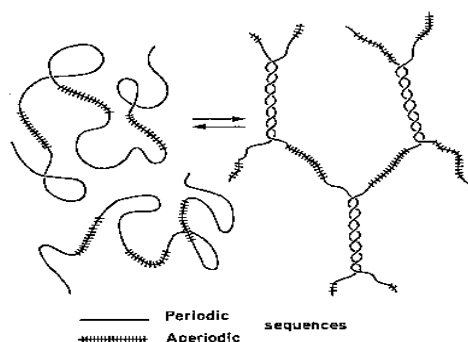
کانفورماسیون توالی متناوب حاوی ۲ نوع واحد قندی را نمی توان به آسانی پیش بینی کرد. آنالیز پرتو X حاصل از هیالورونات حاکی از وجود کانفورماسیون نوع مارپیچ تو خالی است. در حالی که پلی ساکاریدهای یوتا کاراگینان و آگارز نوعی کانفورماسیون کمتر توسعه یافته ایجاد می کنند که در آن دو به شکل یک مارپیچ طویل دابل (دو تایی) طناب مانند در کنار یکدیگر قرار گرفته اند مارپیچ دابل آگارز فشرده تر و پیچ ها به علت آرایش فضائی نوع L واحدهای قندی با اتصالات ($1 \rightarrow 4$) در سمت چپ محور قرار دارند، در مقابل مارپیچ دابل یوتا کاراگینان به دلیل آرایش فضائی نوع D واحدهای قندی در سمت راست محور مارپیچ قرار گرفته اند (Rees, 1977).



شکل (۱-۲۶): ساختار کانفورماسیونی مارپیچ دو رشته ای یوتا کاراگینان (Belitz et al., 2009).

۱-۴-۳-۲ ساختارهای کانفورماسیونی هترو گلیکان های نوع منقطع

این نوع زنجیرهای پلیمری حاوی تعدادی بخش متناوب (دوره ای) هستند که توسط قسمت های بی قاعده و نامنظم از یکدیگر جدا می شوند. کاپا کاراگینان مثال خوبی از این نوع کانفورماسیون است. کانفورماسیون بخش های متناوب (دوره ای) این زنجیرها، مشابه با یوتا کاراگینان است اما قسمت های منقطع موجود در ساختار کاپا کاراگینان شکل کلی و کانفورماسیون این نوع پلی ساکاریدها را به شدت تحت تأثیر قرار می دهد. برای مثال تحت شرایط مطلوب زنجیرهای کاپا کاراگینان با توالی های متناوب قادر به تشکیل مارپیچ های دوبل (دوتایی) هستند در حالیکه قسمت های منقطع نمی توانند در تشکیل این ساختار شرکت کنند و در واقع وجود قسمت های منقطع و بی قاعده سبب ایجاد تاب خوردگی^۱ در زنجیر می شوند. این تاب خوردگی ها سبب تشکیل اجباری پیوندهای متقاطع^۲ در زنجیرهای پلیمری می شوند، که به تشکیل یک شبکه سه بُعدی^۳ و در نهایت ژلاتینه شدن کاپا کاراگینان در محلول های آبی منجر می شود (Lapasin & Pricl, 1995).



شکل (۱-۲۷): نحوه ژلاتینه شدن کاپا کاراگینان در محلول های آبی (Belitz et al., 2009).

۱-۴-۳-۳ ساختار کانفورماسیونی هترو گلیکان های نوع نامتناوب

این دسته مهم از پلی ساکاریدها در سطح سلول و نیز مایعات خارج سلولی بسیاری از موجودات زنده وجود دارند و معمولاً این نوع زنجیرهای پلی ساکاریدی به یک زنجیر پلی پپتیدی یا یک زنجیر

^۱ Kink

^۲ Cross link

^۳ Three-dimensional networks

لیپیدی متصلند.

باید به این نکته توجه داشت که این نوع ساختارها منابع سنتزی وسیع و عملکردهای بیولوژیکی مهمی دارند. برای مثال می توان به نقش مهم این مواد در زیست شناسی مولکولی، عملکرد مثبت سیستم های ایمنی و عملکرد آنها به عنوان گیرنده های هورمون اشاره کرد. لازم به ذکر است که اطلاعات محدودی در مورد شکل کانفورماسیونی این نوع پلی ساکاریدها وجود دارد (Lapasin & Pricl, 1995).

۱-۴-۳ نقش ساختار کانفورماسیونی پلی ساکاریدها در تعیین عملکرد آنها

شناسایی شکل هندسی (ساختار کانفورماسیونی) پلی ساکاریدها از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا نوع کانفورماسیون این ترکیبات نقش و عملکرد آنها را در سلول های زنده تعیین می کند. یک مثال واضح برای این موضوع زنجیرهای پلی ساکاریدی آمیلوز و سلولز است. با توجه به اینکه ساختار هر دو از یک نوع واحد قندی D - گلوکو پیرانوز تشکیل شده است اما هر کدام نقش کاملاً متفاوتی را در سلول های زنده ایفا می کنند.

پلی ساکاریدهای سلولز که از مونومرهای $D - \beta$ - گلوکوپیرانوز با اتصالات $(1 \rightarrow 4)$ تشکیل شده اند دارای کانفورماسیون روبان مانند هستند. بدیهی است که این نوع ساختار از نظر انرژی شکل فضائی پایداری دارند و به عنوان یک پلی ساکارید ساختاری در ساختار اسکلتی و دیواره سلولی به جهت استحکام بخشیدن به ساختار سلول کاربرد دارند.

پلی ساکارید آمیلوز از واحدهای $D - \alpha$ - گلوکوپیرانوز با اتصالات $(1 \rightarrow 4)$ تشکیل شده اند. هنگامیکه واحدهای $D - \alpha$ - گلوکوپیرانوز با اتصالات $(1 \rightarrow 4)$ به یکدیگر متصل می شوند زنجیر پلی ساکاریدی آمیلوز دچار چرخش طبیعی شده و کانفورماسیون آن از نوع مارپیچ طویل است. این نوع کانفورماسیون از پایداری کمتری برخوردار است و وظیفه ذخیره انرژی را بر عهده دارند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

۴-۴-۱ خاصیت و موارد کاربرد پلی ساکاریدها

همانطور که قبلاً اشاره شد پلی ساکاریدها به طور گسترده و به وفور در طبیعت توزیع شده اند. از نقش های مهم این ترکیبات در طبیعت می توان به نقش ساختاری آنها در دیواره سلولی باکتری ها، گیاهان و همچنین بافت ها پیوندی حیوانات، منبع تأمین انرژی برای رشد و بقا گیاهان و سایر سلول های غیر فتوسنتزی و در نهایت نقش اساسی آنها در جذب و اتصال با مولکول های آب اشاره کرد.

پلی ساکاریدها در بسیاری از محصولات غذایی به عنوان فرآورده تولید می شوند، عمدتاً قادر به حفظ نقش های طبیعی و ذاتی خود به عنوان مواد اسکلتی (میوه و سبزیجات) یا مواد مغذی (غلات، حبوبات و ...) هستند. از این رو پلی ساکاریدهای استخراج شده به مقدار زیادی در فرآوری مواد غذایی چه به صورت بومی یا فرم اصلاح شده کاربرد دارند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

اغلب ویژگی ها و وظایفی که پلی ساکاریدها بر عهده دارند به تنوع ساختاری فوق العاده این دسته از مولکول ها برمی گردد.

۱-۴-۴-۱ خواص مرتبط با ساختار پلی ساکاریدها

۱-۴-۴-۱-۱ پلی ساکاریدهای کاملاً خطی^۱

پلی ساکاریدهایی که تنها از یک نوع واحد قندی و یک نوع پیوند تشکیل شده باشند مثل سلولز و یا آمیلوز تحت عنوان پلی ساکاریدهای کاملاً خطی شناخته می شوند. این ترکیبات معمولاً نا محلول در آب هستند و تنها تحت شرایط پُر تنش مانند درجه حرارت بالا و یا شکستن اتصالات هیدروژنی توسط مواد قلیایی یا سایر مواد مناسب به صورت محلول در می آیند. هنگامیکه تغییری جزئی در نوع واحدهای ساختاری، نوع پیوند یا وزن مولکولی این گروه از پلی ساکاریدها رخ دهد، تفاوت های زیادی در خواص و ویژگی های این مواد ایجاد می شود. این پدیده در خواص سلولز و آمیلوز قابل مشاهده است بطوریکه یکی دارای نقش ساختاری و دیگری وظیفه تأمین انرژی را بر عهده دارد.

^۱ Perfectly Linear Polysaccharides

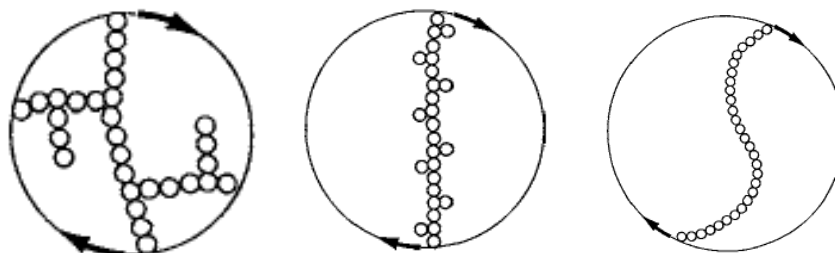
۱-۴-۴-۲ پلی ساکاریدهای منشعب^۱

پلی ساکاریدهای منشعب مانند آمیلوپکتین و گلیکوژن نسبت به همتایان خطی خود با وزن مولکولی برابر و غلظت یکسان در آب محلول ترند. این در حالیست که محلول های حاصل از پلی ساکاریدهای منشعب در مقایسه با محلول های حاصل از پلی ساکاریدهای خطی دارای ویسکوزیته پایین تری هستند. با فرض اینکه ویسکوزیته یک محلول بیانگر حجم مؤثر درشت مولکول های موجود در آن است، این حجم به طور کلی برای مولکول های خطی نسبت به مولکول های منشعب بزرگتر است. به عبارت دیگر پلی ساکاریدهای خطی خنثی، فضای بیشتری نسبت به پلی ساکاریدهای منشعب اشغال می کنند در نتیجه ویسکوزیته بالاتری از پلی ساکاریدهای منشعب با همان وزن مولکولی دارند اما محلول های آنها چسبناک نیست. در حالیکه در پلی ساکاریدهای منشعب به دلیل درگیر شدن وسیع زنجیرهای جانبی آنها محلول های چسبناک تری نسبت به پلی ساکاریدهای خطی تشکیل می شود در نتیجه برخلاف پلی ساکاریدهای خطی خنثی به آسانی قادر به تشکیل فیلم بر روی سطوح خشک نیستند و اغلب به عنوان عامل ایجاد چسبندگی به کار گرفته می شوند.

۱-۴-۴-۳ پلی ساکاریدهای خطی منشعب^۲

پلی ساکاریدهای خطی منشعب مانند گواران یا آلکیل سلولز پلیمرهایی هستند که از یک ستون اصلی به صورت یک زنجیر طویل به همراه تعداد زیادی زنجیرهای جانبی کوتاه تشکیل شده اند. خواص این ترکیبات از خواص هر دو پلی ساکارید کاملاً خطی و منشعب مشتق می شود. طولانی بودن ستون اصلی زنجیرها موجب ویسکوزیته بالای محلول می شود. بعلاوه حضور زنجیرهای جانبی کوتاه متعدد، تعاملات بین مولکول ها را تا حد زیادی تضعیف می کند در نتیجه حلالیت و نرخ جذب مجدد آب توسط مولکول های پلی ساکاریدی بهبود و افزایش می یابد.

^۱ Branched Polysaccharides^۲ Linearly Branched Polysaccharides



شکل (۱-۲۸): حجم مؤثر ساختار خطی (راست)، خطی منشعب و منشعب (چپ) (Belitz et al., 2009).

۴-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای حاوی گروه کربوکسیل^۱

پلی ساکاریدهای حاوی گروه کربوکسیل مانند پکتین، آلژینات و کربوکسی متیل سلولز همانند نمک های قلیایی در محدوده pH قلیایی یا خنثی بسیار محلولند. این مولکول ها به علت وجود یون های کربوکسیل دارای بار منفی هستند و با توجه به دافعه ناشی از بارهای الکتریکی همنام مولکول های مجاور یکدیگر را دفع می کنند و در برابر اجتماع های بین مولکولی مقاومت می کنند.

ویسکوزیته محلول های حاصل از این نوع پلی ساکاریدها بالا و وابسته به pH است. حالت ژل و یا رسوب در pH برابر یا کمتر از ۳ رخ می دهد که دلیل آن توقف دافعه الکترواستاتیک در pH ذکر شده است. بعلاوه گروه های کربوکسیل در این نوع ساختارها درگیر اتصالات محکم هیدروژنی هستند در نتیجه برای دستیابی به حالت ژل در محلول های خنثی نیاز به کاتیون های دو ظرفیتی است.

۵-۱-۴-۴-۱ پلی ساکاریدهای حاوی گروه های به شدت اسیدی^۲

زنجیرهای پلیمری همراه با گروه های استر (اسید سولفوریک، اسید فسفریک) مانند فورسلاران، کاراگینان یا نشاسته اصلاح شده به عنوان پلی ساکاریدهای اسیدی شناخته می شوند. این ترکیبات در آب بسیار محلولند و منجر به تشکیل محلول های بسیار ویسکوز می شوند. این نوع پلیمرها برخلاف پلی ساکاریدهای حاوی گروه های کربوکسیل، در محیط های به شدت اسیدی به صورت محلولند و از ثبات بالایی برخوردار هستند (Belitz et al., 2009).

^۱ Polysaccharides with Carboxyl Groups

^۲ Polysaccharides with Strongly Acidic Groups

۱-۴-۲ هیدروکلوئیدها و خواص عملکردی آنها

همانطور که اشاره شد خاصیت اتصال و جذب مولکول های آب از ویژگی های مهم اغلب پلی ساکاریدها است. این خصوصیت مهم منجر به قرار گرفتن این نوع از بیوپلیمرها در گروه هیدروکلوئیدها شده است. هیدروکلوئیدها گروه متنوعی از پلیمرهای بلند زنجیرند که به طور کامل یا قسمتی از آنها^۱ (جزء محلول آنها) در آب حل می شوند. افزون بر این آنها دارای قابلیت تورم در آب^۲ هستند (Williams & Phillips, 2000). وجود تعداد زیادی گروههای هیدروکسیل (OH) در ساختار هیدروکلوئیدها، میل این ترکیبات را برای جذب و اتصال با مولکول های آب به طور مشخصی افزایش می دهد به همین جهت به عنوان مواد آبدوست^۳ شناخته می شوند. در واقع خاصیت جذب آب هیدروکلوئیدها از دلایل اصلی استفاده گسترده این ترکیبات به عنوان مواد افزودنی در صنعت غذا است زیرا جذب مولکول های آب باعث بهبود ویژگی های رئولوژیکی و در نتیجه بهبود خواص حسی مواد غذایی می شود. بعلاوه هیدروکلوئیدها قادر به ایجاد پراکندگی در سیستم های ناهمگن هستند، در واقع آنها به عنوان حد واسطه بین محلول حقیقی^۴ و سوسپانسیون (سیستم معلق)^۵ محسوب می شوند. در نتیجه این مواد به درستی تحت عنوان هیدروکلوئیدها شناخته می شوند (Saha & Bhattacharya, 2010).

معیارهای مختلفی برای طبقه بندی هیدروکلوئیدها وجود دارد مانند طبقه بندی بر اساس ساختار شیمیایی، بار یونی، رفتار جریان و ... اما از متداولترین معیارها برای طبقه بندی هیدروکلوئیدها دسته بندی این ترکیبات بر اساس منشأ آنها است که بر این اساس در یکی از چهار گروه هیدروکلوئیدهای گیاهی، جلبک ها، میکروبی و جانوری (جدول ۱-۵) قرار می گیرند (Williams & Phillips, 2000).

^۱ Partially soluble^۲ Swell in water^۳ Hydrophilic^۴ True solution^۵ Suspension

جدول (۱-۵): طبقه بندی منابع مهم هیدروکلوئیدها (Williams & Phillips, 2000).

گیاهی	درختان	(سلولز)
	صمغ ترش‌چی درخت	(صمغ عربی، کارایا، فاطی، تراگاکانت)
	گیاهان	(صمغ گوآر، صمغ لوبیای خرنوب، صمغ تارا)
جلبک دریایی	جلبک قرمز	(آگار، کاراگینان)
	جلبک قهوه ای	(آلژینات)
میکروبی	صمغ زانتان، ژلان، کردلان، دکستران، سلولز	
حیوانی	ژلاتین، کازئینات، پروتئین آب پنیر، کیتوزان	

در سالهای اخیر تقاضا برای محصولات غذایی سالم و طبیعی توسط مصرف کنندگان آگاه به سلامتی افزایش یافته و همین امر از فاکتورهای محرکی است که باعث افزایش توسعه بازار هیدروکلوئیدها شده است. با توجه به گزارش بازار جهانی هیدروکلوئیدها در سال ۲۰۱۳، پیش بینی شده است که آمریکای شمالی در سال ۲۰۱۸ با داشتن بازاری با ارزش ۷ میلیارد دلار به عنوان بزرگترین مصرف کننده هیدروکلوئیدهای غذایی محسوب شود (Li et al., 2016).

هیدروکلوئیدها اغلب به عنوان عوامل ایجاد قوام^۱، ایجاد ژل^۲، امولسیفایر^۳، ایجاد ثبات و پایداری^۴، جایگزین چربی^۵، ایجاد وضوح و شفافیت^۶ و عوامل فلوکاسیون^۷ در زمره مواد اولیه مورد استفاده در صنایع غذایی قرار دارند. بعلاوه آنها دارای برنامه های کاربردی در زمینه فیلم های خوراکی، کپسوله سازی^۸ ترکیبات حساس مانند اسانس ها و مهار تبلور^۹ هستند.

در حال حاضر هیدروکلوئیدهایی شناخته شده اند که در زمینه سلامت کاربرد دارند. در این میان هیدروکلوئیدها علاوه بر بسیاری از جنبه های کاربردی قادر به تهیه رژیم های غذایی شامل فیبرهای

^۱ Thickener agent

^۲ Gelling Agent

^۳ Emulsifier

^۴ Stabiliser

^۵ Fat replacer

^۶ Clarifying agent

^۷ Flocculating agent

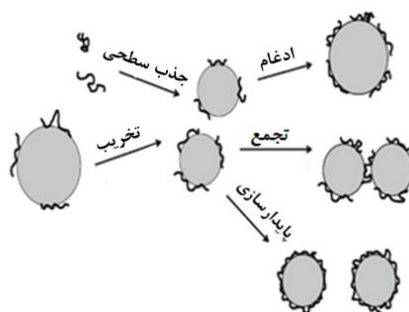
^۸ Encapsulating agent

^۹ Crystallization inhibitor

کم کالری هستند (Williams & Phillips, 2000).

همانطور که اشاره شد پایداری سازی سیستم های امولسیون از مهمترین جنبه های کاربردی پلی ساکاریدها در صنایع غذایی است. در فرمولاسیون یک سیستم امولسیونی بین امولسیفایر و عوامل تثبیت کننده، تمایز وجود دارد. امولسیفایرها نوعی از ماده شیمیایی (یا مخلوطی از مواد شیمیایی) هستند که منجر به شکل گیری سیستم های امولسیونی و یکنواختی آنها از طریق کاهش کشش سطحی بین فازهای مختلف می شوند در حالیکه عوامل تثبیت کننده جزء شیمیایی هستند که می توانند در طولانی مدت سبب ثبات سیستم های امولسیونی شوند (Dickinson, 2003). این بدان معنی است که هیدروکلوئیدها به عنوان امولسیفایرهای کلاسیک در نظر گرفته نمی شوند بلکه بعلت خاصیت آبدوستی شدید و وزن مولکولی بالایشان منجر به تشکیل ژل شده و در نتیجه از تجمع ذرات فاز پراکنده در سیستم های امولسیونی مانند امولسیون های آب و روغن ممانعت می کنند.

بعلاوه در مقایسه با امولسیفایرهای پروتئینی، بزرگی اندازه مولکول ها و خاصیت آبدوستی قابل توجه هیدروکلوئیدها منجر به تشکیل لایه غلیظی در اطراف ذرات فاز پراکنده موجود در سیستم های امولسیونی می شود که این لایه غلیظ از تجمع بیش از حد قطرات در شرایط نامطلوب مانند اعمال شوک حرارتی یا افزودن نمک های کلسیم جلوگیری می کند (Chanamai & McClements, 2002). به عبارت دیگر فعالیت سطحی هیدروکلوئیدها منشاء مولکولی دارد. خاصیت غیر قطبی گروه های شیمیایی متصل به ستون اصلی پلی ساکاریدهای آبدوست از یک سمت و حضور جزء پروتئینی متصل شده به پلی ساکارید با پیوند کووالانسی از طرف دیگر می تواند علت اصلی فعالیت سطحی هیدروکلوئیدها محسوب شود (Dickinson, 2009).



شکل (۱-۲۹): نحوه تثبیت سیستم های امولسیون توسط فعالیت سطحی هیدروکلوئیدها (Dickinson, 2009).

مشهورترین امولسیفایر هیدروکلوئیدی صمغ عربی است که به طور گسترده در نوشیدنی ها و نوشابه های غیر الکلی برای امولسیون سازی اسانس های روغنی در pH پایین و قدرت یونی بالا و نیز در حضور عوامل رنگی نوشیدنی ها کاربرد دارد (Nakauma et al., 2008).

صمغ عربی از صمغ های تراوش شده (صمغ درخت آکاسیا)^۱ است و در گروه صمغ های پروتئینی آرابینوگالاکتان ها قرار دارد. احتمالاً نقاط اتصال آرابینو گالاکتان به زنجیر پروتئینی از طریق اسید آمینه های سرین و هیدروکسی پرولین است (Islam et al., 1997).

بخش پروتئینی صمغ عربی به شدت آبگریز است و توسط قطرات روغن جذب می شود در حالیکه نواحی آزاد زنجیرهای پلی ساکاریدی آبدوست هستند و در بخش محلول امولسیون گسترش یافته و نیروهای دافعه الکترواستاتیک از تشکیل لخته و انعقاد قطره های روغن جلوگیری می کنند. لازم به ذکر است که میزان فعالیت سطحی صمغ عربی در مقایسه با امولسیفایرهای پروتئینی رایج نسبتاً کم است، در نتیجه برای جبران این نقص نسبت وزنی نسبتاً بالای صمغ عربی نسبت به روغن مورد نیاز می باشد. از دیگر امولسیفایرهای هیدروکلوئیدی که به میزان زیاد در برنامه های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند می توان به برخی از انواع پکتین، گالاکتومانان ها، نشاسته اصلاح شده و برخی از مشتقات سلولز اشاره کرد (Kang et al., 2012).

^۱ Acasia

۱-۴-۵ استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها

۱-۴-۵-۱ استخراج پلی ساکاریدها

جداسازی و خالص سازی پلی ساکاریدهای مورد نظر از سایر ترکیبات موجود در نمونه یک فرآیند مهم و ضروری برای شناسایی مطلوب ساختار شیمیایی و مولکولی این پلیمرها محسوب می شود. در فرآیند استخراج، بسته به عوامل مختلف از جمله شرایط استخراج انواع پلی ساکاریدهای مختلف و ترکیبات اصلی نمونه، حلال های مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند.

معمولاً آب در درجه حرارت های مختلف برای استخراج پلی ساکاریدهای خنثی مورد استفاده قرار می گیرد در حالیکه پلی ساکاریدهای اسیدی مانند پکتین ها به دنبال تشکیل کمپلکس های محکم بین یون های فلزی دو ظرفیتی با عوامل شلاته^۱ کننده مانند اگزالات آمونیوم، هگزا متا فسفات سدیم و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید^۲ در آب محلول می شوند.

معمولاً حلال های قطبی مانند دی متیل سولفوکسید^۳ (با محتوی حدود ۱۰٪ آب) برای انحلال گرانول های نشاسته و ا^۴ - استیل - گالاکتومانان ها مورد استفاده قرار می گیرند.

بطور معمول از حلال های اسیدی برای استخراج پلی ساکاریدها به دلیل خطر هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی استفاده نمی شود. با این حال طی آماده سازی تجاری پکتین ها از پوست مرکبات و یا پالپ سیب فرآیند استخراج توسط محلول های مایع اسیدی با pH ۳-۱ و دمای ۹۰°C - ۵۰ انجام می گیرد. ا^۴ - متیل مورفولین - ا^۴ - اکسید^۴ حلالی مناسب برای استخراج پلی ساکاریدهای دیواره سلولی مانند سلولز است. محلول های قلیایی به طور گسترده برای استخراج پلی ساکاریدهای دیواره سلولی استفاده می شوند. در این روش به طور معمول برای کاهش خطر حذف بتا^۵ (حذف پی در پی

^۱ Chelating agents

^۲ Ethyldiamine tetraacetic acid (EDTA)

^۳ Dimethyl sulfoxide (DMSO)

^۴ N-methylmorpholine N-oxide

^۵ β -elimination

مونوساکاریدها از انتهای احیاء کننده زنجیره پلی ساکاریدی) که در محدوده pH بالا ممکن است رخ دهد بوروهیدرات سدیم به محلول استخراجی افزوده می شود.

هیدروکسید باریوم اشباع به طور ویژه برای مراحل اولیه استخراج آرابینو زایلان های محلول در آب موجود در گندم و جو کاربرد دارد. در حالیکه حلال رقیق هیدروکسید سدیم برای استخراج زایلو گلوکان ها، زایلان ها، بتا گلوکان ها و پکتین ها مورد استفاده قرار می گیرد. لازم به ذکر است که پس از خروج پلی ساکاریدها از دیواره سلولی توسط فرآیند استخراج با مواد قلیایی، پلی ساکاریدها به مواد محلول در آب تبدیل می شوند (Cui, 2005).

۱-۴-۵-۱ عوامل مؤثر بر میزان حلالیت پلی ساکاریدها

حلالیت پلی ساکاریدها بسیار متنوع است و تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار می گیرد که عبارتند از:

- وزن مولکولی: معمولاً سرعت انحلال ذرات نمونه با اندازه یکسان با افزایش وزن مولکولی کم می شود. دلیل این امر صرف زمان بیشتر برای آزاد شدن از سطح و سپس انتشار مولکول های سنگین نسبت به مولکول های سبک است.

- ساختار شیمیایی: انشعاب زنجیرهای پلی ساکاریدی امکان اتصالات بین مولکولی را کاهش می دهد در نتیجه حلالیت افزایش می یابد. به طور کلی هر ساختار که شامل واحدهای انعطاف پذیر خاص مانند اتصالات ۶→۱ باشد به علت انتروپی^۱ مطلوب محلول دارای حلالیت بالایی است.

- بار الکتریکی: به طور کلی پلی ساکاریدهای خنثی نسبت به پلی ساکاریدهای حامل بار الکتریکی (پلی الکترولیت ها)^۲ از حلالیت کمتری برخوردار هستند.

- ساختار کانفورماسیونی: زنجیرهای پلی ساکاریدی با اشکال ساختاری بسیار منظم که قادر به تشکیل ساختارهای کریستالی یا نیمه کریستالی هستند معمولاً به صورت نامحلول هستند (Wang et

^۱ Entropy

^۲ Polyelectrolyts

(al., 2003).

تعاملات بین پلی ساکاریدها و انواع مختلف حلال بخصوص آب عمدتاً به پیوندهای هیدروژنی، درجه حرارت و فشار وابسته است لذا این عوامل بر روی حلالیت پلی ساکاریدها تأثیر می گذارند. به طور کلی فشار و دمای بالا انحلال پلی ساکاریدها را افزایش می دهد (Wang et al., 2002).

بمنظور بهبود راندمان فرآیند استخراج پلی ساکاریدها، عملیات مقدماتی حذف چربی ضروری و از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا این گروه از مواد می توانند نفوذ حلال ها (بخصوص آب) را محدود کرده و روی راندمان استخراج تأثیر منفی بگذارند. چربی ها و مواد محلول در چربی معمولاً توسط حلال های قطبی مانند مخلوط کلروفرم - متانول با نسبت حجمی (۹۵ : ۵)، اتانول ۹۰٪، دی اکسان^۱، هگزان و دی اتیل اتر حذف می شوند (Harris et al., 1984).

۱-۴-۵-۲ خالص کردن پلی ساکاریدها

در پایان مرحله استخراج محلولی حاصل می شود که حاوی مخلوطی از ترکیبات گوناگون اعم از پلی ساکارید مورد نظر، مواد غیر کربوهیدراتی و همچنین پلی ساکاریدهای دیگر است. برای تشخیص ساختار شیمیایی پلی ساکارید مورد نظر یکنواختی و درجه خلوص آن قبل از آزمایش های طیف سنجی از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا کوچکترین مقدار ناخالصی ممکن است اطلاعات نادرستی در مورد پلی ساکارید مورد نظر ارائه دهد (Eliasson, 2006).

۱-۴-۵-۲-۱ حذف ناخالصی های پروتئینی

روش های مختلفی برای حذف ناخالصی های پروتئینی از عصاره حاصل از مرحله استخراج وجود دارد که عبارتند از:

- حذف پروتئین ها به دنبال هضم این ترکیبات توسط آنزیم های پروتئولیتیک مانند پاپائین^۲ یا

^۱ Dioxane

^۲ Papain

پروتئازهای باکتریایی. نکته مهم در استفاده از روش های آنزیمی حصول اطمینان از عدم وجود آنزیم های گلیکو هیدرولاز تخریب کننده زنجیرهای پلی ساکاریدی است (Schwendig et al., 1989).

- حذف پروتئین ها به دنبال ترسیب آنها توسط ترکیبات شیمیایی مانند اسید تری کلرو استیک^۱ (TCA) یا اسید سولفو سالیسیلیک^۲ (Preuss et al., 1983).

- جذب غیر اختصاصی پروتئین های گیاهی با استفاده از سطح حاوی پوشش سیلیس یا انواع خاک های رس (Cui, 2005).

- حذف پروتئین ها به دنبال عبور محلول های ناخالص از میان رزین های تبادل یونی (کاتیونی) قوی به شکل H^+ . بعلت به اینکه پروتئین ها و پلی ساکاریدهای غیر خنثی یا آنیونی دارای بار مثبت هستند به ستون متصل خواهند شد، در حالیکه پلی ساکاریدهای خنثی از میان ستون عبور خواهند کرد (Figueira et al., 1994).

- حذف پروتئین ها به روش سواگ^۳ که در این روش پروتئین ها در یک امولسیون حاوی کلروفرم واسرشت^۴ شده و پس از فرآیند سانتریفیوژ کردن به صورت یک لایه ژل مانند در حد واسط بین کلروفرم – آب ظاهر می شوند. جهت تسریع واسرشتن پروتئین ها، می توان از یک بافر با pH ۵-^۴ به جای آب استفاده کرد که در این شرایط افزودن مقدار کمی ۱- بوتانول یا ۱- پنتانول ضروری است. با توجه به اینکه این روش قادر به حذف مقادیر کمی پروتئین در هر مرحله است باید به دفعات تکرار شود تا پروتئین به صورت کامل حذف شود اما آفت مقدار پلی ساکارید را نیز به دنبال خواهد داشت (Staub, 1965).

۱-۴-۵-۲ خالص کردن پلی ساکاریدها با روش های آنزیمی

^۱ Trichloroacetic acid (TCA)

^۲ Sulfosalicylic acid

^۳ Sevag

^۴ Denaturation

ناخالصی های پلیمرهای کربوهیدراتی می توانند توسط هضم اختصاصی آلاینده ها از طریق آنزیم های هیدرولیز کننده مناسب حذف شوند. اما در این روش تنها می توان از آنزیم های بسیار خالص بدون فعالیت جانبی (آنزیم های اختصاصی) استفاده کرد (Cui, 2005).

۱-۴-۵-۲-۳ خالص کردن پلی ساکاریدها با استفاده از روش های کروماتوگرافی

یکی از حساس ترین و بهترین روش ها که برای خالص کردن پلی ساکاریدها از عصاره های گیاهی و حذف ناخالصی ها کاربرد دارد استفاده از انواع مختلف روش های کروماتوگرافی است. به طور کلی کروماتوگرافی روش آنالیزی بسیار خوبی در جداسازی، خالص سازی و شناسایی مواد تشکیل دهنده ترکیبات مختلف در سالهای اخیر محسوب می شود.

جهت انجام کروماتوگرافی داشتن یکسری اطلاعات در مورد خصوصیات فیزیکی شیمیایی ماده مورد آنالیز لازم است که باید به دقت آنها را مد نظر داشت. این خصوصیات عبارتند از:

- حلالیت مولکول های نمونه در حلال مورد نظر
- درجه فرار بودن نمونه مورد نظر
- درجه تمایل جذب مولکول های نمونه نسبت به ماده جاذب (فاز ثابت)

بنابراین برای اینکه عمل جداسازی بوسیله کروماتوگرافی به صورت مطلوب انجام گیرد بررسی وضعیت و خصوصیات فاز ثابت^۱ و فاز متحرک^۲ توصیه می شود.

فاز متحرک که از روی فاز ثابت عبور می کند، ممکن است مایع یا گاز باشد. از طرف دیگر فاز ثابت نیز ممکن است مایع یا جامد باشد. بنابراین اختلاف سرعت حرکت مواد و فاز متحرک بر روی فاز ثابت، پایه و اساس جداسازی مواد به روش کروماتوگرافی را است (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

همانطور که گفته شد روش های کروماتوگرافی گوناگونی در بحث جداسازی، خالص کردن و

^۱ Stationary phase

^۲ Mobile phase

شناسایی پلی ساکاریدها از یکدیگر و همچنین از سایر نا خالصی های غیر کربوهیدراتی مورد استفاده قرار می گیرد که در ادامه به اختصار به توضیح برخی از آنها پرداخته می شود.

۱-۴-۵-۳-۱ کروماتوگرافی گازی (GC)^۱

کروماتوگرافی گازی از تکنیک های پیشرفته ای است که برای جداسازی و تشخیص کمی و کیفی مواد تشکیل دهنده ترکیبات مختلف به کار برده می شود. کروماتوگرافی گازی به دو شکل زیر مورد استفاده قرار می گیرد.

الف) کروماتوگرافی گاز-مایع (GLC)^۲: در این نوع کروماتوگرافی فاز ثابت، مایع است و از ترکیبات سیلیس، پلیمرهای ویژه و غیره می باشد که در یک لوله مخصوص جای داده شده است. در این سیستم فاز متحرک را گازهای بی اثر مانند هلیوم، ازت، هیدروژن و آرگون تشکیل می دهند.

ب) کروماتوگرافی گاز-جامد (GSC)^۳: در این نوع کروماتوگرافی، فاز ثابت جامد بوده و از ترکیبات جاذب و فعالی مثل آلومینا، سیلیکاژل و کربن که در یک لوله مخصوص جای داده شده است تشکیل شده و فاز متحرک شامل گازهای بی اثر است.

دستگاه کروماتوگرافی گازی از چهار قسمت اصلی ستون، بخش تأمین کننده جریان گاز، دستگاه گرم کننده و آشکارساز تشکیل شده است (شکل ۱-۳۰).

اساس عمل دستگاه کروماتوگرافی گازی به این صورت است که نمونه مورد آزمایش پس از تزریق وارد فاز متحرک شده و همراه آن وارد ستون (فاز ثابت) می شود. سپس نمونه مورد نظر توسط حرارت تفکیک شده و بین گاز و فاز ثابت (جامد یا مایع) پخش شده که ممکن است حل یا جذب گردد. با در نظر گرفتن زمان لازم برای خروج ترکیب مورد نظر از ستون (زمان بازداری)^۴ و حجم گاز مورد نیاز برای

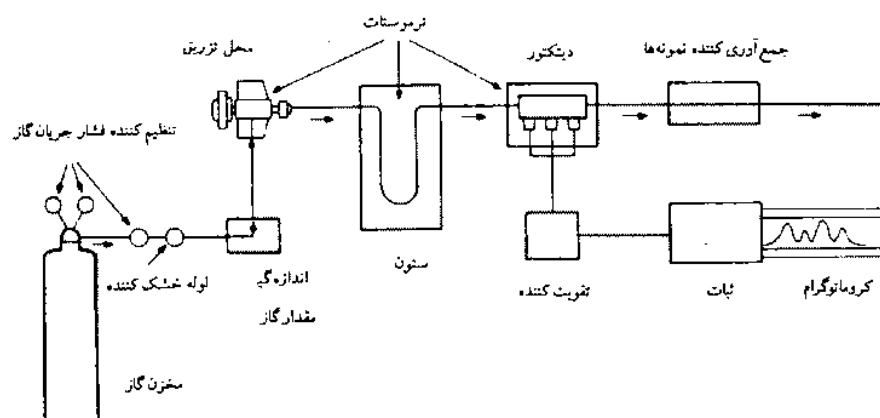
^۱ Gas-Chromatography

^۲ Gas-Liquid-Chromatography

^۳ Gas-Solid-Chromatography

^۴ Retention time

خارج شدن ترکیب مورد نظر از ستون ارزیابی کمی و کیفی بوسیله آشکارسازها صورت می گیرد (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).



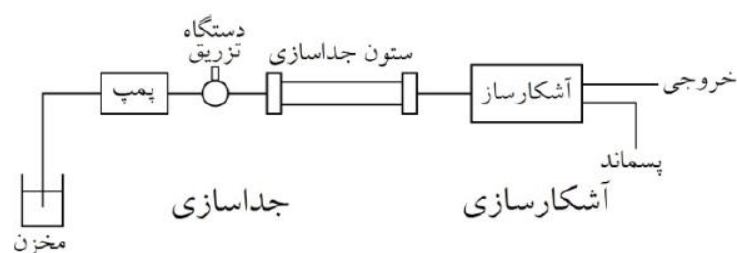
شکل (۱-۳۰): تصویری از قسمت های اصلی یک دستگاه کروماتوگرافی گازی (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

۱-۴-۵-۲-۳-۲ کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)^۱

کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا مانند کروماتوگرافی گازی دارای کارایی بسیار زیاد و تمام اتوماتیک است و قادر به انجام کلیه اعمال جداسازی و آنالیزهایی که با روش های دیگر کروماتوگرافی غیر قابل انجام است با صرف کمترین زمان می باشد. از طرف دیگر این تکنیک پژوهشگر را قادر می سازد تا بسیاری از اجسام غیر پایدار یا حساس را مستقیماً تعیین مقدار کمی و کیفی نماید در حالیکه در تکنیک کروماتوگرافی گازی اجسام ابتدا باید به مشتقات خاصی تبدیل شوند تا بتوان عمل جداسازی را انجام داد. از دیگر محاسن این روش، آشکارسازهای متفاوت و ستون های پُر شده از انواع مختلف فاز جامد (فاز ثابت) است که می توانند در این تکنیک مورد استفاده قرار گیرند. از طرف دیگر فازهای مایع متعدد با درصدهای مختلف که به طور اتوماتیک با برنامه خاص وارد ستون می شوند کفایت و کارایی این روش را افزایش می دهند.

^۱ High Performance Liquid Chromatography

اساس عمل دستگاه HPLC به این صورت است که ابتدا فاز متحرک توسط پمپ های مخصوص با فشار و حرارت مشخص همراه با نمونه مورد آنالیز وارد پیش ستون شده و در ادامه وارد ستون اصلی می شود. در این سیستم فاز جامد (فاز ثابت) توسط داخل یک ستون فلزی استیل به قطر حدود ۵ میلی متر قرار می گیرد. در نهایت نمونه هایی که بوسیله ستون تفکیک شده اند توسط آشکارسازهای مختلف شناسایی و مورد ارزیابی قرار می گیرند (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).



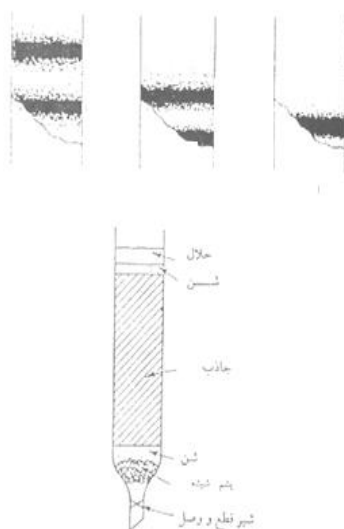
شکل (۱-۳): تصویری کلی از یک سیستم HPLC (Niesen, 2010).

۱-۴-۵-۲-۳ کروماتوگرافی ستونی^۱

کروماتوگرافی ستونی یک روش آنالیز فیزیکی و شیمیایی است که در آن فاز ثابت ممکن است جامد یا مایع باشد. در این سیستم فاز جامد (مثل سیلیکاژل، اکسید آلومینیوم، آلومینا، کربنات سدیم و ...) که به صورت ذراتی با اندازه مشخصند داخل ستون های شیشه ای با ابعاد مختلف شده و سپس عصاره ماده خام با غلظت مناسب وارد ستون می شود و توسط حلالی مناسب (فاز متحرک)، مواد از روی ستون عبور داده (شسته) می شوند. در این روش نمونه ها بر اساس درجه قطبیتی که دارند در قسمت های خاصی از طول ستون قرار می گیرند و در نهایت باندها توسط اشعه ماوراء بنفش بر روی ستون یا خارج از آن و پس از جداسازی بخش ها، مورد آنالیز قرار می گیرند. عواملی مانند اندازه ذرات مواد جاذب و یکنواخت بودن آنها در طول ستون کروماتوگرافی، سرعت جریان حلال در ستون، انتخاب نوع حلال، فعالیت ماده جاذب و غلظت عصاره حاوی نمونه (عصاره با غلظت کم ارجحیت دارد) بمنظور بهبود

^۱ Column Chromatography

راندمان جداسازی توسط ستون کروماتوگرافی باید مورد توجه قرار گیرند. در شکل ۱-۳۲ بخش قسمت های مختلف یک ستون کروماتوگرافی و مواد جذب شده در قسمت های مختلف ستون نمایش داده شده است (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

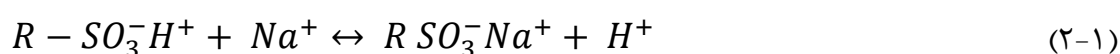


شکل (۱-۳۲): ساختمان یک ستون کروماتوگرافی و مواد جذب شده روی آن (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

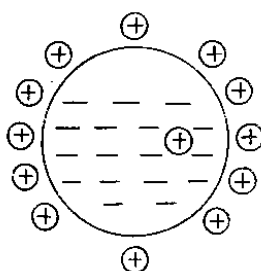
۱-۴-۵-۲-۳-۴ کروماتوگرافی تبادل یونی^۱

در کروماتوگرافی تبادل یونی همانطور که از اسم آن مشخص است تبادل یونی بین فاز ثابت (از پلیمر ترکیبات رزینی مختلف ساخته شده است) با یون های موجود در نمونه مورد آنالیز که در فاز مایع حل شده (فاز متحرک) صورت می گیرد. فاز ثابت در این سیستم از دو نوع رزین ساخته شده (اشکال ۱-۳۳ و ۱-۳۴) که در قسمت زیر به طور خلاصه شرح داده شده است.

الف) رزین اسیدی که معمولاً از اسیدهای کربوکسیلیک و سولفونیک ساخته شده و به شکل زیر عمل می کند.

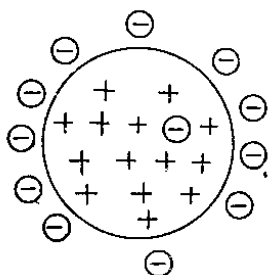
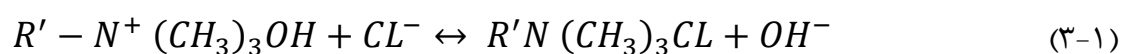


^۱ Ion exchange chromatography



شکل (۳۳-۱): ستون تبادل کننده کاتیونی (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

ب) رزین بازی که معمولاً از پلیمری شدن یک نوع آمین ساخته می شود و به شکل زیر عمل می کند.



شکل (۳۴-۱): ستون تبادل کننده آنیونی (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

در این تکنیک روش کار به این صورت است که اگر نمونه مورد آنالیز دارای بار مثبت باشد محتوای ستون کروماتوگرافی باید دارای بار منفی باشند. در این حالت چون رزین ها، یون های مثبت نمونه مورد آنالیز را به خود جذب می کنند، بنابراین تحت عنوان تبادل کننده کاتیونی^۱ نامیده می شوند. در صورتیکه نمونه مورد آنالیز دارای بار منفی باشد، محتوای ستون کروماتوگرافی باید دارای بار مثبت باشند. در این حالت چون رزین ها یون های منفی نمونه مورد آنالیز را به خود جذب می کنند تحت عنوان تبادل کننده آنیونی^۲ نامیده می شوند (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

^۱ Cation Exchanger

^۲ Anion Exchanger

همانطور که قبلاً اشاره شد از انواع تکنیک های کروماتوگرافی برای جداسازی پلی ساکاریدها از سایر آلودگی های غیر کربوهیدراتی می توان استفاده کرد. کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه یا غریبال مولکولی^۱ تکنیکی مناسب برای خالص سازی پلی ساکاریدهای آنیونی و خنثی است. در این تکنیک پلیمرها بر اساس تفاوتی که از نظر وزن مولکولی و حجم هیدرودینامیکی دارند تفکیک می شوند. برای مثال آرابینو زایلان ها و آرابینو گالاکتان ها می توانند به خوبی توسط کروماتوگرافی غریبال مولکولی (با استفاده از ستون سفارز^۲) از یکدیگر جدا شوند.

برای جداسازی پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی، کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل – سلولز^۳ بسیار مناسب است. در این روش پلی ساکارید خنثی بدون هیچ اتصال از میان ستون عبور می کند در حالیکه پلی ساکاریدهای اسیدی به دلیل بار منفی که دارند روی ستون باقی مانده و در نهایت توسط بافرها با افزایش قدرت یونی یا pH از روی ستون شسته می شوند (Cui, 2005). لازم به ذکر است که در حین مراحل مختلف استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدهای مورد نظر یکسری نکات مهم باید مد نظر گرفته شوند که عبارتند از:

- حجم عصاره های بدست آمده پس از مرحله استخراج را باید به کمک فرآیند تقطیر تحت خلاء کاهش داد.
- برای جلوگیری از خراب شدن عصاره توسط قارچ ها، کپک ها و باکتری ها باید کمی تولوئن به محلول اضافه شود.
- برای جلوگیری از تجزیه یا از بین رفتن ترکیبات مورد نظر موجود در عصاره ها، همیشه باید عصاره غلیظ شده را تا مرحله جداسازی و خالص نمودن در یخچال نگهداری کرد.
- حتی الامکان سعی شود مرحله جداسازی مواد بلافاصله بعد از عصاره گیری انجام شود (صمصام

^۱ Size Exclusion Chromatography

^۲ Sepharose

^۳ Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-Cellulose)

شریعت، ۱۳۸۶).

۱-۴-۵-۲ معیارهای خلوص پلی ساکاریدها

خلوص پلی ساکاریدهای آماده شده را می توان توسط روش های مختلف تأیید کرد. در بسیاری از موارد مقدار نیتروژن بیانگر میزان آلودگی توسط پروتئین ها است. این روش بر خلاف پلی ساکاریدهایی مانند صمغ عربی و سایر آرابینو گالاکتان ها، که حاوی اتصالات کووالانسی پپتیدی هستند، روش مناسبی برای بررسی درجه خلوص پلی ساکاریدهایی مانند بتا - گلوکان ها، آرابینو زایلان ها، سلولز، زانتان، ژلان و آلژینات است زیرا این پلی ساکاریدها سطوح پایینی از پروتئین دارند. بعلاوه این ثبات در ترکیب پلی ساکاریدها و نسبت قندها پس از تکرار مراحل تصفیه بیانگر خلوص مراحل آماده سازی پلی ساکاریدهاست. در نهایت مشخصات پیک های حاصل (تعداد، اندازه و تقارن پیک ها) از کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه یا کروماتوگرافی تبادل یون نیز می تواند بیانگر خلوص پلی ساکاریدها باشد (Cui, 2005).

۱-۴-۶ ترسیب پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدهای حاصل از مراحل مختلف تصفیه با افزودن اتانول، استن یا ۲-پروپانول ترسیب می شوند. ترسیب پلی ساکاریدها با این روش بدون مشکل نیست زیرا پلی ساکاریدهای موجود در محلول های بسیار رقیق به خوبی ترسیب نمی شوند، بنابراین محلول مورد نظر باید تغلیظ شود.

به طور معمول لازم است اتانول ۹۵٪ به میزان ۳-۴ برابر حجم محلول پلی ساکاریدی اضافه شود (غلظت نهایی اتانول برابر ۷۶-۷۱٪ است). این حجم اتانول معمولاً برای پلی ساکاریدها با وزن مولکولی بالا کافی است با این حال با توجه به اینکه محدوده وزن مولکولی پلی ساکاریدها وسیع است، پلی ساکاریدها با وزن مولکولی بسیار کم ممکن است حتی با افزودن ۴ برابر حجمی اتانول به خوبی رسوب نکنند. در نهایت پلی ساکاریدها پس از طی کردن مراحل دیالیز (برای اطمینان از حذف نمک ها با وزن

مولکولی پایین) با استفاده از روش انجمادی خشک^۱ می شوند (Whistler & Sanella, 1965).

۱-۴-۷ شناخت و تشخیص ساختار شیمیایی و مولکولی پلی ساکاریدها

روش های مورد استفاده جهت آنالیز ساختار پلی ساکاریدها به طور قابل توجهی متفاوت از روش های به کار برده شده برای تجزیه و تحلیل ساختار سایر بیوپلیمرها بوده و نیازمند تجهیزات و تکنیک های پیشرفته ای است. بسیاری از ساختارهای پلی ساکاریدی موجود در طبیعت حاوی انواع متعددی از مونوساکاریدها همراه با انواع مختلف پیوندهای گلیکوزیدی است و همین موضوع سبب پیچیدگی و دشواری شناسایی ساختار کامل این ترکیبات می شود. برای مثال با وجود اینکه ۳۰ سال از اولین تلاش برای شناسایی ساختار پلی ساکارید غالب موجود در غلات از جمله جو دوسر می گذرد توالی کامل بتا - د - گلوکان های موجود در این ساختار هنوز مورد بررسی قرار دارد. این مثال بیانگر این مطلب است که یافتن ساختار کامل پلیمری یک پلی ساکارید شامل یک نوع مونوساکارید (بتا - د - گلوکان) با دو نوع اتصالات گلیکوزیدی (۱→۴) و (۱→۳) کار پیچیده و دشواری است. البته باید این نکته را متذکر شد که توسعه سریع تکنیک ها و تجهیزات از جمله طیف وسیعی از روش های طیف سنجی^۲ در طول سه دهه گذشته تا حد زیادی توانسته این مشکل را بر طرف کرده و امکان آنالیز ساختار بسیاری از پلی ساکاریدها را فراهم کند.

برای تعیین ساختار اولیه پلی ساکاریدها، بدست آوردن داده های کمی و کیفی زیر از اهمیت ویژه

ای برخوردار است:

- وزن مولکولی
- ترکیب مونوساکاریدهای سازنده (ماهیت و نسبت مولی مونوساکاریدهای سازنده زنجیرهای پلی ساکاریدی)

^۱ Freez dried

^۲ Spectroscopic

- الگوهای پیوندی (موقعیت اتصالات گلیکوزیدی موجود در زنجیر اصلی و انشعابات)
- نوع ایزومری حلقه ها (پیرانوز یا فورانوز بودن مونوساکاریدها)
- آرایش فضائی آنومریک (فرم آلفا یا بتا اتصالات گلیکوزیدی)
- نوع الگوی ساختاری مونوساکاریدها در یک توالی (Cui, 2005).

امروزه روش های گوناگونی جهت پی بردن به ساختار پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرد که می توان آنها را به سه دسته اصلی روش های شیمیایی، آنزیمی و طیف سنجی تقسیم کرد.

۱-۷-۴-۱ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های شیمیایی

۱-۷-۴-۱-۱ تعیین وزن مولکولی

وزن مولکولی از خصوصیات اساسی پلی ساکاریدها است زیرا بین این پارامتر و بسیاری از ویژگی های فیزیکی پلی ساکاریدها ارتباط معنی داری وجود دارد. همانطور که قبلاً اشاره شد، عدم کنترل ژنتیکی دقیق در طول سنتز هر زنجیر پلی ساکاریدی باعث می شود که اغلب پلی ساکاریدها وزن مولکولی معین و خاصی نداشته باشند اما برای اینکه بتوان وزن مولکولی یک پلی ساکارید را به طور دقیق توصیف کرد، داشتن اطلاعاتی در مورد میانگین وزن مولکولی و پراکندگی وزن مولکولی ضروری است. انواع مختلفی از میانگین های وزن مولکولی از جمله میانگین وزن مولکولی عددی (M_n) و میانگین وزن مولکولی وزنی (M_w) وجود دارد. میانگین وزن مولکولی عددی (M_n) مربوط به اندازه گیری طول زنجیرهای پلی ساکارید است. از لحاظ فیزیکی این پارامتر توسط تکنیک هایی که مولکول ها را شمارش می کند مانند غشاء اسمزی تعیین می شود. در واقع این پارامتر به مولکول های کوچک موجود در ساختار بسیار حساس است.

بسیاری از خواص ترمودینامیکی زنجیرهای پلی ساکاریدی با تعداد ذرات موجود در ساختار این ترکیبات در ارتباط است. میانگین وزن مولکولی وزنی (M_w) نیز همانند میانگین وزن مولکولی عددی مربوط به اندازه گیری طول زنجیرهای پلی ساکاریدی است و این پارامتر بیشتر روی مولکول ها با وزن

مولکولی بالا حساس است. میانگین وزن مولکولی وزنی (M_w) به طور تجربی از طریق اندازه گیری پارامترهایی که با اندازه مولکول ها در ارتباط هستند مانند پراکنش (تفرق) نور^۱ قابل محاسبه است. لازم به ذکر است که خواص حجمی مانند ویسکوزیته به طور خاص تحت تأثیر (M_w) قرار دارد (Carraher, 2000).

برای پلی ساکاریدهای ناهمگن M_w بیشتر از M_n است، در واقع اختلاف بین M_w و M_n حاکی از پراکندگی وزن مولکولی زنجیرهای پلی ساکاریدی است. پراکندگی وزن مولکولی زنجیرهای پلی ساکاریدی توسط پارامتر شاخص پراکندگی بیان می شود. این شاخص به صورت نسبت میانگین وزن مولکولی وزنی به میانگین وزن مولکولی عددی ($\frac{M_w}{M_n}$) بیان می شود. شاخص پراکندگی یک پلی ساکارید طبیعی معمولاً در محدوده ۱/۵-۲ است اما با استفاده از تکنیک هایی مانند کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC) می توان فراکشن های پلی ساکاریدی با شاخص پراکندگی کم (نزدیک به ۱) بدست آورد (Wang et al., 2003).

تکنیک های مختلفی برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها (M_w) وجود دارد که می توان آنها را در سه گروه زیر طبقه بندی کرد.

- تکنیک های مطلق: این تکنیک ها نیازی به داشتن اطلاعات در مورد اشکال ساختاری مولکول ها و یا انجام کالیبراسیون با استفاده از استانداردهایی که وزن مولکولی آنها از پیش تعیین شده ندارند. این گروه شامل تکنیک های غشاء اسمزی و تفرق نور استاتیک^۲ می باشد.

- تکنیک های نسبی: این گروه برخلاف گروه قبل به اطلاعاتی در مورد اشکال ساختاری مولکول ها (ساختار کانفورماسیونی) و نیز انجام کالیبراسیون با استفاده از استانداردهایی که وزن مولکولی آنها شناخته شده است نیاز دارند. استفاده از ویسکومتر و کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC) در

^۱ Light scattering

^۲ Static Light Scattering

این گروه قرار دارند.

- تکنیک های ترکیبی: در این گروه از اطلاعات و داده های دو یا چند روش مانند اندازه گیری سرعت ترسیب همراه با پراکندگی نور دینامیک^۱ استفاده می شود.
- روش های مختلفی مانند تکنیک غشاء اسمزی، پراکندگی نور استاتیک، سانتریفیوژ کردن با سرعت بالا، ویسکومتری و کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC) برای تعیین وزن مولکولی پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار می گیرند (Cui, 2005). در ادامه یکی از متداول ترین آنها بطور مختصر شرح داده شده است.

در تکنیک کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC)، ژل تراوا یا غربال مولکولی، مولکول های پلی ساکارید به جای خواص شیمیایی، بر اساس اندازه مولکولی از یکدیگر جدا می شوند. هنگامیکه یک محلول پلیمری توسط ستون کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC) تحت فشار قرار می گیرد زنجیرهای پلیمری براساس تفاوتی که در حجم دینامیکی با یکدیگر دارند از طریق مواد پُر شده در ستون از یکدیگر جدا می شوند. به عبارت دیگر ستون به نحوی ساخته شده است که امکان نگهداری و جذب مولکول های کوچکتر و حذف مولکول های بزرگتر را فراهم می کند. بنابراین با اندازه گیری حجم احتباس یک فراکشن می توان وزن مولکولی را محاسبه کرد. در واقع کروماتوگرافی مولکولی بر اساس اندازه (SEC) به جای یک وزن مولکولی مطلق، محدوده توزیع وزن مولکولی را اندازه می گیرد.

ژل هایی که برای پُر کردن ستون مورد استفاده قرار می گیرند (مانند پلی آمیدها) ترجیحاً از نظر ویژگی با کربوهیدرات ها متفاوتند و نوع آنها اغلب با توجه به ساختار پلی ساکارید و تداخل این ژل ها با توجه به محدوده وزن مولکولی نمونه مورد آزمون انتخاب می شود.

محلول های کلرید سدیم در آب (۱ مولار) یک شوینده مناسب برای این ستون هاست. هر چند آب یا بافرهای فرار مانند استات پیریدینیوم هم می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

^۱ Dynamic Light Scattering

در این روش نیاز به استفاده از استانداردهای کالیبراسیون برای تبدیل حجم احتباس شده به وزن مولکولی نمونه تزریق شده به ستون است. معمولاً از فراکشن های استاندارد که دارای پیک هایی با موقعیت مکانی نزدیک به پیک های نمونه مورد آنالیز هستند مانند پلوان و دکستران برای کالیبراسیون ستون استفاده می شود (Stephen et al., 1990).

۴-۱-۷-۲ تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکاریدها

بر خلاف روش های آنزیمی که تنها به آنالیز یک نوع خاصی از مونوساکاریدها می پردازند، روش های کروماتوگرافی قادر به آنالیز کمی و کیفی یک یا چند مونوساکارید موجود در نمونه پلی ساکاریدی هستند. برای آنالیز کمی و کیفی مونوساکاریدهای تشکیل دهنده یک پلی ساکارید مشخص، نمونه باید پلیمرزدایی شود. این کار اغلب با استفاده از هیدرولیز اسیدی انجام می شود.

هیدرولیز باندهای گلیکوزیدی توسط اسید، یک پیش شرط ضروری برای تعیین هویت و نسبت های مولی قند و واحدهای اسید اورونیک است. ممکن است در طول هیدرولیز اسیدی، برخی از پیوندهای گلیکوزیدی متلاشی نشوند بنابراین برای کامل انجام گرفتن فرآیند هیدرولیز، باید دو پارامتر زمان و شدت هیدرولیز تنظیم شوند. به عبارت دیگر لازم است زمان و قدرت فرآیند هیدرولیز به حد کافی باشد اما نه آنقدر زیاد که منجر به تخریب مونوساکاریدها شود. برای انجام این فرآیند به طور معمول از اسید سولفوریک و اسید تری فلورو استیک (TFA) استفاده می شود. بعلاوه اینکه اسید سولفوریک پس از فرآیند هیدرولیز به سختی از نمونه حذف می شود و حضور آن می تواند باعث ایجاد تداخل با روش هایی مانند استیله کردن ترکیبات کند لذا ترجیحاً اسید تری فلورو استیک مورد استفاده قرار می گیرد (Harris et al., 1995). البته برای هیدرولیز نمونه های فیبری مانند سبوس گندم، کاه و نمونه های سلولزی استفاده از اسید سولفوریک نسبت به اسید تری فلورو استیک ارجحیت دارد (Garleb et al., 1989).

طی این روش هر چند نتایج سریع و با حداقل هزینه حاصل می شوند اما برخی مشکلات وجود

دارد از جمله:

- به دنبال انتشار واحدهای مونوساکاریدی در پی تجزیه باندهای گلیکوزیدی امکان تجزیه تدریجی قندهای آزاد وجود دارد. بنابراین زمان و شدت هیدرولیز باید به دقت تحت کنترل باشد.
 - تعیین و تنظیم شرایط فرآیند از جمله مولاریته اسید، درجه حرارت و مدت زمان فرآیند از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا مشکل حلالیت برخی از پلی ساکاریدها ممکن است تشدید شود.
 - طی این روش مشکل انتشار آهسته واحدهای قندی متصل به بخش های اسیدهای اورونیک وجود دارد. این مشکل با احیاء مقدماتی پلی ساکاریدها قبل از فرآیند هیدرولیز رفع می شود.
- متداول ترین روش های کروماتوگرافی که به منظور شناسایی محصولات حاصل از هیدرولیز اسیدی مورد استفاده قرار می گیرند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی هستند که قبلاً به طور کامل توضیح داده شده اند (Stephen et al., 1990).

۱-۴-۷-۱-۳ تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی

جهت تعیین وضعیت اتصالات گلیکوزیدی روش های گوناگونی وجود دارد که از مهمترین آنها می توان متیلاسیون^۱، هیدرولیز اسیدی ناقص (ملایم)^۲ و اکسیداسیون اشاره کرد که در ادامه این روش ها شرح داده شده است.

۱-۴-۷-۱-۳-۱ متیلاسیون

آنالیز متیلاسیون از قدیمی ترین و قدرتمندترین روش های مورد استفاده برای تعیین ساختار کربوهیدرات هاست که شامل مراحل زیر است.

(^۱) متیلاسیون کامل پلی ساکاریدها: طی این مرحله تمام گروه های هیدروکسیل (OH) آزاد متصل به زنجیر پلی ساکارید با قرار گرفتن در یک محیط قلیایی و دریافت گروه های متیل از محیط تبدیل

^۱ Methylation

^۲ Partial (mild) acid hydrolysis

به گروه های متوکسیل می شوند. در گذشته از اکسید نقره و هیدروکسید سدیم - متیل سولفات به عنوان محیط قلیایی استفاده می شد اما اکنون دی‌مسیل سدیم^۱ و یدید متیل جایگزین این ترکیبات شده اند (Hakomori, 1964). اخیراً در یک روش ساده تر از سوسپانسیون هیدروکسید سدیم در پودر دی متیل سولفوکسید (DMSO) به عنوان محیط قلیایی استفاده می شود (Dell, 1990). صحت نتایج حاصل از این آزمون بستگی زیاد به تبدیل موفقیت آمیز تمام گروه های هیدروکسیل به متوکسیل دارد. بنابراین پلی ساکاریدها باید به طور کامل در DMSO حل شوند که برای این منظور می توان از شیکر ثابت یا تیمار فراصوت در دماهای بالا (بالتر از ۷۰ °C) استفاده کرد.

(۲) هیدرولیز اسیدی پلی ساکاریدهای متیله شده و تبدیل آنها به مخلوطی از مونوساکاریدهای پاره ای متیله: پس از اطمینان از متیلاسیون کامل پلی ساکارید از طریق عدم مشاهده طیف مادون قرمز در طول موج 3420 cm^{-1} (مربوط به گروه های OH آزاد)، پلی ساکاریدها توسط اسید هیدرولیز می شوند. در این فرآیند تنها اتصالات درونی گلیکوزیدی هیدرولیز می شوند و پیوندهای متیل اتر دست نخورده باقی می مانند. بعلاوه حذف آسان اسید آلی تری فلورو استیک توسط فرآیند تبخیر بطور معمول برای هیدرولیز اسیدی از این اسید استفاده می شود. باید به این نکته توجه داشت که در صورت استفاده از اسیدهای معدنی مانند اسید سولفوریک، پس از فرآیند هیدرولیز باید pH اسیدی محیط با افزودن ترکیباتی مانند کربنات باریم خنثی شده و در نهایت رسوب سولفات باریم توسط سانتریفیوژ حذف شود.

(۳) احیاء مونوساکاریدهای پاره ای متیله و تبدیل آنها به آلدیتولهای مربوطه: این فرآیند طی تیمار مونوساکاریدهای پاره ای متیله توسط بورودئوترید سدیم^۲ تحت شرایط قلیایی صورت می گیرد. بورودئوترید سدیم یک اتم دوتریوم روی موقعیت کربن شماره ۱ ایجاد می کند و از این طریق تشخیص اتم کربن شماره ۱ از اتم کربن شماره ۶ آسان می شود.

^۱ Dym syl sodium

^۲ Borodeuteride sodium

۴) استیله شدن آلدیتول های پاره ای متیله: آلدیتول های پاره ای متیله در نهایت توسط انیدرید استیک استیله شده و ترکیبات فرار مانند استات آلدیتول پاره ای متیله (PMAA)^۱ را تولید می کنند. در نهایت این ترکیبات فرار توسط کروماتوگرافی گازی و طیف سنجی جرمی از نظر کمی و کیفی مورد آنالیز قرار می گیرند. تناسب زمان نگهداری و طیف جرمی هر استات آلدیتول پاره ای متیله می تواند برای تعیین واحدهای مونوساکاریدی و الگوی پیوندها مورد استفاده قرار گیرد. در حالیکه مساحت و ارتفاع پیک های کروماتوگرافی برای تعیین مقدار واحدهای قندی کاربرد دارند (Singthong et al., 2004).

با استفاده از روش متیلاسیون می توان اطلاعاتی در مورد موقعیت اتصالات گلیکوزیدی و نوع ایزومری حلقه های مونوساکاریدی (پیرانوز یا فورانوز) حاصل نمود برای مثال وجود گروه های متوکسیل در اتم های کربن شماره ۴ و ۵ به ترتیب نشان دهنده وجود حلقه های پیرانوز و فورانوز است. بعلاوه از روش متیلاسیون برای تشخیص گروه های پایانی غیر احیاء کننده در یک زنجیر پلی ساکاریدی و نیز تشخیص زنجیر اصلی از انشعابات استفاده می شود (Cui, 2005).

بعلت اینکه پلی ساکاریدها به طور معمول از اندازه مولکولی بزرگی برخوردارند و همچنین طیف وسیعی از وزن مولکولی دارند (از چند هزار تا چند میلیون دالتون)، به استثنای پلی ساکاریدهای ساده ای مانند سلولز، بررسی توالی کامل سایر پلی ساکاریدها عملاً غیر ممکن است مگر اینکه این پلیمرها تخریب و به مخلوطی از مونوساکارید و آلیگو ساکاریدها تبدیل شوند.

به عبارت دیگر به منظور حصول اطلاعات مربوط به توالی واحدهای مونوساکاریدی در یک پلی ساکارید پیچیده، باید پلیمر طی یک روش کنترل شده به واحدهای توالی های تکرار شونده خود تبدیل شود. در نهایت شناسایی ساختار کامل آلیگو ساکاریدهای حاصل منجر به پیش بینی توالی پلی ساکاریدها می شود.

^۱ Partially methylated alditol acetate

روش های خاصی که در ادامه توضیح داده شده است در نهایت می تواند برای شناسایی توالی کامل ساختار پلی ساکاریدها، در صورتیکه پلی ساکاریدها حاوی واحدهای تکرار شونده بسیار منظمی باشند مورد استفاده قرار گیرد. البته اگر پلی ساکاریدها حاوی واحدهای آلیگوساکاریدی با نظم و ترتیب کمتری باشند باز هم این روش ها می تواند اطلاعات سودمندی در مورد ویژگی های ساختاری این نوع از پلی ساکاریدها فراهم کند (جعفر نژاد، ۱۳۹۰).

۱-۴-۷-۱-۲ هیدرولیز اسیدی ملایم (ناقص)

هیدرولیز اسیدی ملایم (استفاده از اسید سولفوریک ۰/۵-۰/۱ نرمال در دمای 100°C) روشی بسیار مناسب جهت شناسایی ساختار پلی ساکاریدهاست. این روش بر اساس حساسیت زیاد برخی از اتصالات گلیکوزیدی نسبت به سایر اتصالات عمل می کند در نتیجه در این روش با آنالیز مونوساکاریدها و آلیگو ساکاریدهای حاصل از هیدرولیز اسیدی ملایم می توان به اطلاعات مفیدی در مورد توالی گلیکوزها و اتصالات موجود در پلی ساکاریدها دست یافت. برای مثال حلقه های فورانوزی و قندهای دئوکسی معمولاً پیوندهای گلیکوزیدی ضعیفی دارند و به راحتی تحت شرایط هیدرولیز اسیدی ملایم تخریب می شوند. هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی ۶-دئوکسی هگزوزها تقریباً ۵ برابر سریع تر از هیدرولیز اتصالات گلیکوزیدی سایر هگزوزهای موجود در اطراف آنهاست (Lindberg et al., 1975). در هگزوپیرانوزها، اتصالات نوع (۱→۶) نسبت به سایر اتصالات (۱→۲)، (۱→۳) و (۱→۴) پایدارترند و نیز اتصالات نوع بتا نسبت به اتصالات نوع آلفای مشابه از پایداری بالاتری برخوردارند. بعلاوه اتصالات اسیدهای اورونیک به مونوساکاریدهای خنثی از سایر اتصالات موجود در ساختار پلی ساکاریدها مقاومتر است.

آلیگو ساکاریدهای حاصل از فرآیند هیدرولیز اسیدی ملایم را می توان توسط روش های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی روی کاغذ^۱، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی ژل تراوا

^۱ Paper chromatography

خالص سازی کرد. در نهایت برای تعیین موقعیت اتصالات گلیکوزیدی از روش متیلاسیون (مشابه با آنچه که در مورد پلی ساکاریدها ذکر شد)، تعیین آرایش فضائی آنومری از روش های چرخش نوری و رزونانس مغناطیس هسته ای پروتون ($^1\text{HNMR}$) و برای تعیین جرم مولکولی و شناسایی توالی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید از تکنیک کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنجی جرمی استفاده می شود (جهان بین، ۱۳۹۰).

۱-۴-۷-۱-۳-۳ اکسیداسیون

اکسایش پلی ساکاریدها و شناسایی ترکیبات حاصل از اکسیداسیون می تواند اطلاعات مفیدی در مورد نوع اتصالات، الگوی استخلاف، تعیین توالی و آرایش آنومری اتصالات گلیکوزیدی (آلفا یا بتا) در پلی ساکاریدها فراهم کند. در ادامه مهمترین روش های اکسیداسیون پلی ساکاریدها یعنی اکسایش پریدوات^۱ و اکسایش با تری اکسید کرومیوم^۲ شرح داده شده است.

۱-۴-۷-۱-۳-۳-۱ اکسایش پریدوات و تجزیه اسمیت^۳

اکسایش پریدوات عبارتست از اکسیداسیون یک گلیکوزید ساده با اسید پریدودیک یا نمک های آن که در نهایت به تولید دی آلدئید و اسید فرمیک منجر می شود. به عبارتی دیگر ترکیباتی مانند ویسیل گلیکول ها^۴ (۲ گروه هیدروکسیل مجاور هم در یک واحد قندی) می توانند در محلول های آبی با pH ۳-۵ با اسید پریدودیک یا نمک های آن واکنش دهند و با شکستن اتصالات در زنجیره کربنی ۲ گروه آلدئیدی روی زنجیر کربنی تشکیل شود. در این واکنش^۱ مول اکی والانت پریدوات مصرف می شود (شکل ۱-۳۵، الف).

در مورد آلفا، بتا و گاما تریول ها با مصرف ۲ مول اکی والانت پریدوات یک تقسیم دو تایی در زنجیر

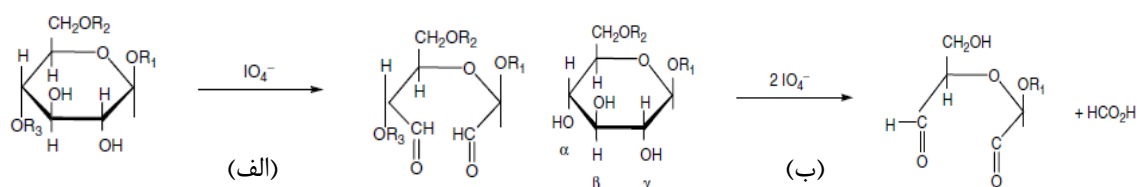
^۱ Periodate oxidation

^۲ Chromium trioxide

^۳ Periodate oxidation and smith degradation

^۴ Viciyl-glycos

کربنی از دو طرف موقعیت بتا صورت می گیرد و منجر به تولید دو گروه آلدئیدی (یک دی آلدئید) و یک اسید فرمیک می شود (شکل ۱-۳۵، ب) (Cui, 2005).



شکل (۱-۳۵): اکسیداسیون ویسیل گلیکول ها با اسید پریودیک (Cui, 2005).

الگوی پیوندی متفاوت واحدهای قندی در پلی ساکاریدها در نحوه واکنش پلی ساکاریدها با پریودات بسیار مؤثر است. برای مثال در انتهای غیر احیاء کننده زنجیرهای قندی و یا بخش های غیر پایانی با اتصالات نوع (۶→۱) که دارای ۳ گروه هیدروکسیل مجاور هستند، با وقوع یک تقسیم دو تایی، ۲ مول اکی والانت پریودات مصرف و ۱ مول اکی والانت اسید فرمیک تولید می شود. یا در بخش های غیر پایانی با اتصالات (۲→۱) یا (۴→۱)، ۱ مول پریودات مصرف می شود بدون اینکه اسید فرمیک تولید شود.

لازم به ذکر است که بخش های قندی فاقد گروه های هیدروکسیل مجاور مانند بخش هایی از زنجیر پلی ساکارید با اتصالات (۳→۱) یا انشعابات موجود در کربن های شماره ۲ و ۴ تحت تأثیر این واکنش قرار نمی گیرند.

بنابراین تعیین مقدار پریودات مصرف شده و اسید فرمیک تولید شده همراه با اطلاعات مربوط به واحدهای قندی که تحت اکسیداسیون قرار نگرفته اند، می تواند در شناسایی ماهیت پیوندهای گلیکوزیدی و سایر ویژگی های ساختاری پلی ساکاریدها مفید واقع شود (Cui, 2005).

بعلاوه از واکنش اکسایش پریودات می توان برای محاسبه درجه پلیمریزاسیون پیوندهای گلیکوزیدی با اتصالات (۴→۱) استفاده کرد. لازم به ذکر است که اکسیداسیون پریودات همچنین می تواند برای برآورد نسبت بخش های انتهایی و غیر انتهایی انشعابات پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار گیرد. البته

در رابطه با پلی ساکاریدهای بسیار منشعب مانند گلیکوژن و صمغ عربی، مقدار اسید فرمیک تولید شده از بخش های انتهایی احیاء کننده بسیار ناچیز است. بعلاوه در پلی ساکاریدهای حاوی پیوندهای گلیکوزیدی درون زنجیر با اتصالات (۶→۱) این روش کاربردی ندارد زیرا اتصالات (۶→۱) داخل زنجیر خود قادر به تولید اسید فرمیک هستند.

واکنش اکسایش پریودات به طور تجربی در یک محلول رقیق از پریودات سدیم در درجه حرارت پایین (برای مثال ۴°C) رخ می دهد و ثابت شدن مقدار پریودات مصرف شده و اسید فرمیک تولید شده در اندازه گیری های متوالی (دو بار اندازه گیری پی در پی) بیانگر پایان واکنش اکسیداسیون است. غلظت پریودات را می توان توسط روش های تیتراسیون یا اسپکتروفوتومتری^۱ (روش های رنگ سنجی) محاسبه کرد و همچنین برای برآورد میزان اسید فرمیک تولید شده طی فرآیند اکسیداسیون می توان از روش تیتراسیون مستقیم با مواد قلیایی استاندارد استفاده کرد.

دی آلدئیدهای تولید شده طی فرآیند اکسایش پریودات به دنبال احیاء شدن با بورو هیدرید سدیم تولید استال می کنند که این ترکیبات نسبت به اسید حساسند. در واقع استال ها حتی در اسیدهای معدنی رقیق و درجه حرارت محیط سرعت هیدرولیز می شوند. درحالیکه پیوندهای گلیکوزیدی سالم (اکسید نشده) در زنجیر پلی ساکارید نسبت به هیدرولیز اسیدی ملایم مقاومند. ترکیب اکسیداسیون پریودات، واکنش احیاء و هیدرولیز اسیدی ملایم تحت عنوان تجزیه اسمیت شناخته می شود (Hay et al., 1965).

۱-۴-۷-۱-۳-۲ اکسایش با تری اکسید کرومیوم

این روش برای تعیین آرایش فضائی آنومری اتصالات گلیکوزیدی در پلی ساکاریدها استفاده می شود. اکسید کرومیوم موجب اکسایش اتصالات گلیکوزیدی با فرم بتا در پلی ساکاریدها می شود زیرا تشکیل

^۱ Spectrophotometer

استرکتو^۱ از ترکیبات آنومری نوع بتا آسان تر از نوع آلفاست و پلی ساکاریدهای حاوی اتصالات نوع آلفا نسبت به نوع بتا به کندی اکسید می شود (Chaplin & Kennedy, 1994).

۱-۴-۷-۲ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های آنزیمی

با وجود اینکه واکنش های اختصاصی هیدرولیز آنزیمی به طور گسترده برای شناسایی ساختار بسیاری از گلیکو پروتئین ها، گلیکو لیپیدها و پروتئو گلیکان ها مورد استفاده قرار می گیرند اما عمده‌تاً این روش ها برای آنالیز ساختار بسیاری از پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای به کار برده نمی شوند. اخیراً تحولات کمی در خصوص تولید آنزیم های اختصاصی برای پلیمرزدایی پلی ساکاریدهایی مانند کیتین، گالاکتومانان ها، مخلوط بتا گلوکان ها، پلوان، زانتان، زایلان، آرابینوزایلان و ... صورت گرفته است.

آنزیم های هیدرولیز کننده پلی ساکاریدها به ۲ گروه اندو و اگزو گلیکوزیدازها^۲ تقسیم بندی می شوند. اگزو گلیکوزیدازها (مانند بتا-آمیلازها) واحدهای مونو و دی ساکاریدی را از یک سمت انتهایی مولکول (معمولاً انتهای غیر احیاء کننده) جدا می کنند در حالیکه اندو گلیکوزیدازها (مثل آلفا-آمیلازها) به طور اختصاصی عمل می کنند و سبب تکه تکه شدن تصادفی همپولی ساکاریدها می شوند. بدین ترتیب مجموعه ای از آلیگو ساکاریدها با درجات پلیمریزاسیون متفاوت حاصل می شوند (Heinz, 2005).

بعلت به اینکه آنزیم ها می توانند روی سوبسترا و محصولات واکنش به صورت اختصاصی عمل کنند، حتی اگر امکان آنالیز کمی، تنها با استفاده از روش های آنزیمی وجود نداشته باشد حداقل از این روش می توان برای شناسایی کیفی ساختار پلی ساکاریدها بهره برد. با این حال در روش های آنالیز آنزیمی باید از درجه خلوص بالای آنزیم ها اطمینان حاصل شود زیرا آنزیم های آماده به صورت تجاری

^۱ Keto ester

^۲ Endo and Exo glycosidases

ممکن است حاوی بیش از یک نوع گلیکو هیدرولاز فعال باشند. بطور معمول می توان از سایر روش ها مانند روش های کروماتوگرافی، طیف سنجی جرمی و رزونانس مغناطیس هسته ای به منظور تصدیق نتایج حاصل از روش های آنزیمی استفاده کرد (Eliasson, 2006).

۱-۴-۷-۳ شناسایی ساختار پلی ساکاریدها با استفاده از روش های طیف سنجی

پیشرفت های سریع روش های اسپکتروسکوپی طی ۲۰ سال اخیر، بسیاری از مسائل و مشکلات تعیین ساختار شیمیایی مواد مانند صرف وقت و هزینه زیاد و از طرف دیگر آماده سازی مقادیر زیادی از نمونه خالص را حل نموده است. اطلاعات حاصل از روش های طیف سنجی ترکیبات نمونه مورد نظر برای تشخیص و تفسیر ساختمان شیمیایی این مواد از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا با استفاده از اطلاعات و داده های حاصل از آنها می توان وزن مولکولی، فرمول مولکولی، گروه های شیمیایی نمونه مورد نظر و ... را بررسی و مشخص نمود (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

مهمترین روش های طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای، مادون قرمز^۱، فرا بنفش^۲ و تعیین چرخش نوری ویژه (پلاریمتری)^۳ است که در ادامه هر یک از این موارد به طور مختصر توضیح داده شده است.

۱-۴-۷-۳-۱ طیف سنجی فرا بنفش و مرئی

هنگامیکه تابش مداومی از یک ماده عبور می کند بخشی از پرتو جذب می شود. به دنبال وقوع این اتفاق باقیمانده تابش در صورت عبور از یک منشور ایجاد طیفی می کند که فواصلی میان خطوط آنها وجود دارد و آن را یک طیف جذبی می نامند. اتم ها یا مولکول ها در اثر جذب انرژی از سطح انرژی کم (حالت اولیه یا پایه) به سطح انرژی بالاتر (حالت برانگیخته) منتقل می شوند. این فرآیند کوانتایی^۴

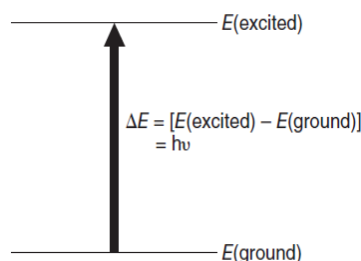
^۱ Infra red (IR)

^۲ Ultraviolet

^۳ Polarimetric

^۴ Quantized

نام دارد که در شکل ۱-۳۶ نشان داده شده است.



شکل (۱-۳۶): فرآیند کوانتایی (Pavia et al., 2009).

انتقالاتی که منجر به جذب تابش الکترومغناطیس در طیف فرابنفش و مرئی (طول موج ۸۰۰-۱۹۰ نانومتر) می شوند، انتقالات بین ترازهای انرژی الکترونی هستند. در واقع هنگامیکه مولکولی انرژی جذب می کند یک الکترون از یک اربیتال اشغال شده به یک اربیتال خالی با انرژی پتانسیل بالا منتقل می شود، به همین علت از عنوان مترادف طیف سنجی الکترونی برای این نوع روش طیف سنجی نیز استفاده می شود (Pavia et al., 2009).

اندازه گیری طیف جذبی ترکیبات بدون رنگ در ناحیه بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر (مرتبط با ناحیه امواج فرابنفش) می باشد، درحالیکه جذب ترکیبات رنگی بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر (محدوده امواج مرئی) است. طیف سنجی فرابنفش بیشتر برای آنالیز دسته ای از ترکیبات آلی کاربرد دارد که در ساختار خود دارای باند مضاعف بوده و به صورت رنگی تحت تأثیر اشعه فرابنفش دیده می شوند.

به طور کلی می توان با استفاده از طول موج های مختلف طیف های جذبی مواد تشکیل دهنده گیاهان از جمله کربوهیدرات ها را در محلول های بسیار رقیق در برابر یک حلال شاهد ثبت کرد که این کار از طریق طیف سنج های نوری خودکار انجام می گیرد. برای این منظور ابتدا باید نمونه های مورد آزمایش در حلال مناسبی حل شوند. حلال نباید در ناحیه مورد مطالعه دارای جذب باشد بنابراین حلال هایی که بیشتر برای طیف های فرابنفش به کار برده می شوند الکل اتیلیک ۹۵٪، متانول، اتر

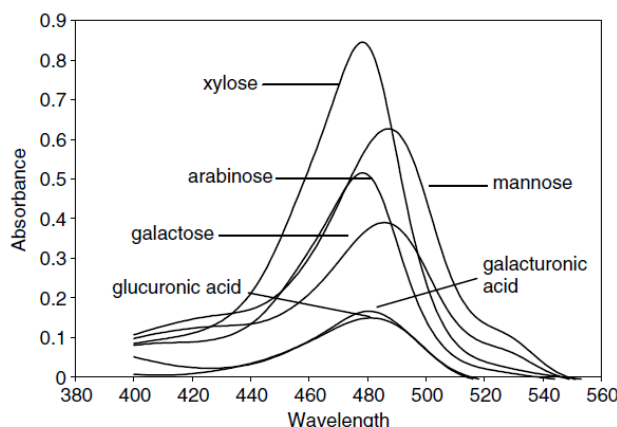
دوتریول و دی اتیل اتر هستند. همچنین باید از به کار بردن کلروفرم و پریدین در طول موج ۲۶۰-۲۰۰ نانومتر، به علت جذب شدن حلال در این ناحیه، خودداری شود ولی در طول موج مرئی می توان از آنها استفاده کرد.

سپس جسم حل شده در حلال در محفظه مناسبی قرار می گیرد بطوریکه سیل (شیشه حاوی نمونه) در مقابل نوری که نوار فرکانس آن مورد مطالعه است شفاف باشد. با وجود اینکه به کار بردن سیل شیشه ای هنگام استفاده از نور مرئی نتیجه مطلوبی دارد ولی هنگام کار در ناحیه فرابنفش، به علت جذب زیاد، بهتر است از سیل کوارتزی استفاده شود (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

بیشترین کاربرد استفاده از طیف سنجی فرابنفش و مرئی در شناسایی ساختار پلی ساکاریدها مربوط به تائید مراحل خالص سازی و مرحله اندازه گیری قند کل است. در واقع عدم جذب در ناحیه ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش نشان دهنده عدم حضور پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید و عملکرد خوب در مراحل خالص سازی پلی ساکارید مورد نظر است.

برای اندازه گیری میزان قند کل در پلی ساکاریدها معمولاً از روش رنگ سنجی^۱ استفاده می شود. در این روش پلی ساکارید در حضور فنول و اسید سولفوریک غلیظ، رنگ زرد متمایل به نارنجی تولید می کند که حداکثر شدت رنگ حاصله در طول موج ۴۹۰ نانومتر (برای هگزوزها) و ۴۸۰ نانومتر (برای پنتوزها و اسیدهای اورونیک) با استفاده از طیف سنجی نوری اندازه گیری می شود (شکل ۱-۳۷) (جهان بین، ۱۳۹۰). در این روش با مقایسه میزان جذب حاصل از نمونه با منحنی استاندارد حاصل از جذب نمونه شاهد (به طور معمول گلوکز) می توان میزان قند کل موجود در ساختار پلی ساکاریدها را محاسبه کرد. از مزایای این روش می توان به استفاده از معرف های کم هزینه، در دسترس و سادگی روش کار اشاره کرد (Dubois et al., 1956).

^۱ Colorimetric



شکل (۱-۳۷): پیک های حداکثر جذب برای هگروزها و پنتوزها در آزمون فنول-اسید سولفوریک (Cui, 2005).

۱-۴-۷-۳-۲ طیف سنجی مادون قرمز (IR)

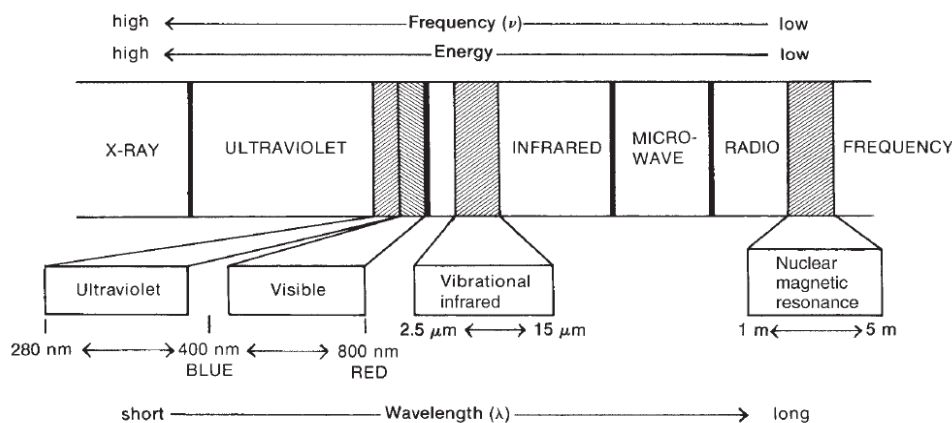
با استفاده از طیف سنجی مادون قرمز اطلاعات مفیدی در مورد ساختمان مولکولی مواد خالص سازی شده از گیاهان (به صورت جامد یا مایع) حاصل می شود.

تقریباً تمامی ترکیباتی که پیوند کووالانسی دارند، اعم از مواد آلی و معدنی، فرکانس های متفاوت از اشعه الکترومغناطیس را در ناحیه طیف مادون قرمز جذب می کنند. ناحیه مادون قرمز طیف الکترو مغناطیس دارای طول موجی بلندتر از نور مرئی (طول موج های ۸۰۰-۴۰۰ نانومتر) و کوتاهتر از طول موج مایکروویو (طول موج بلندتر از ۱ میلی متر) است. ارتباط ناحیه مادون قرمز با دیگر نواحی موجود در طیف الکترو مغناطیس در شکل ۱-۳۸ به خوبی تشریح شده است.

در طیف سنجی مادون قرمز با عبور نور مادون قرمز از میان سیل حاوی نمونه، بخشی از فرکانس های آن توسط نمونه جذب شده و بقیه از نمونه خارج و منتشر می شوند. در صورتیکه نمودار تغییرات درصد نور جذب شده یا عبور داده شده را بر حسب فرکانس در محدوده $(4000-400 \text{ cm}^{-1})$ رسم کنیم طیف مادون قرمز نمونه حاصل می شود.

با توجه به اینکه هر پیوند دارای فرکانس ارتعاشی طبیعی خاصی است و همچنین یک پیوند خاص در دو مولکول مختلف در دو محیط متفاوت قرار دارد، هیچگاه دو مولکول مختلف، طیف مادون قرمز

کاملاً یکسانی نخواهند داشت. بنابراین طیف مادون قرمز می تواند مانند اثر انگشت در انسان ها برای شناسایی مولکول ها به کار گرفته شود (Pavia et al., 2009).



شکل (۱-۳۸): رابطه ناحیه مادون قرمز با سایر نواحی موجود در طیف الکترومغناطیس (Pavia et al., 2009).

برای آماده سازی نمونه ها در این روش، در صورتیکه نمونه مایع باشد، یک قطره از آن بین یک زوج از صفحات صیقل یافته کلرور سدیم یا برمور پتاسیم (که به آنها صفحات نمکی^۱ اطلاق می شود) قرار می گیرد. زمانیکه این صفحات با ملایمت تحت فشار قرار گیرند لایه نازکی از مایع بین دو صفحه تشکیل می شود و طیفی که از این طریق بدست می آید طیف مایع خالص^۲ نام دارد زیرا از هیچ حلالی استفاده نمی شود.

در صورتیکه نمونه جامد باشد حداقل سه روش معمول برای تهیه یک نمونه جامد برای طیف سنجی وجود دارد.

(۱) در اولین روش نمونه جامد پودر شده با پودر برمور پتاسیم (KBr) توسط آسیاب های تویی

به صورت کامل مخلوط می شود. برمور پتاسیم تحت فشار ذوب شده و ترکیب مورد نظر به صورت یک ماتریکس در می آید. قرص KBr آماده شده از این طریق در محفظه دستگاه مادون قرمز قرار داده می

^۱ Salt plates

^۲ Neat

شود. در صورتیکه قرص KBr به خوبی تهیه شود طیف حاصل حاوی نوارهای مزاحم نخواهد بود زیرا برمور پتاسیم تا 400 cm^{-1} شفاف است.

۲) دومین روش (تهیه خمیر نوزول)^۱ مستلزم خرد کردن ترکیب با روغن معدنی (نوزول) است که در نهایت تعلیقی از نمونه بسیار خرد توزیع شده در روغن معدنی حاصل شده و بین صفحات نمکی قرار می گیرد.

۳) در سومین روش ترکیب آلی (نمونه) در یک حلال (معمول ترین حلال کلرور کربن CCl_4 است) حل می شود (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

۱-۴-۳-۳-۳ طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای (NMR)

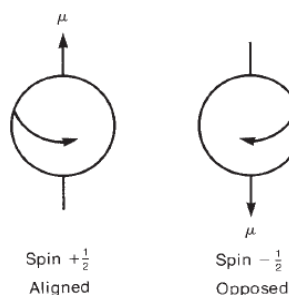
طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای یک روشی فیزیکوشیمیایی قوی و غیر تهاجمی برای تعیین ساختار پلی ساکاریدها محسوب می شود. با استفاده از این روش می توان اطلاعات ساختاری جزئی کربوهیدرات ها از جمله ترکیب مونوساکاریدها، آرایش فضائی آنومری (آلفا یا بتا بودن) واحدهای قندی، الگوی پیوندی و توالی واحدهای قندی در آلیگوساکاریدها یا پلی ساکاریدها را شناسایی کرد. در واقع رزونانس مغناطیس هسته ای شکل دیگری از طیف سنجی جذبی است که مکمل طیف سنجی فرابنفش و مادون قرمز است. با استفاده از این سه طیف می توان به راحتی ساختار یک مولکول مجهول را تشخیص داد (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

همانطور که از نام این روش پیداست رزونانس مغناطیس هسته ای به خواص مغناطیسی هسته اتم های معین بویژه هسته اتم هیدروژن-پروتون (^1H) و ایزوتوپ اتم کربن، کربن - ^{13}C مربوط می شود. بسیاری از هسته های اتم ها دارای خصلتی هستند که اسپین خوانده می شود یعنی هسته اتم ها به گونه ای عمل می کنند که گویی در حال چرخش هستند. در حقیقت اتم هایی که عدد جرمی فرد، عدد اتمی فرد یا هر دو را دارند دارای گشتاور زاویه اسپین و گشتاور مغناطیسی هستند.

^۱ Nujol

در غیاب یک میدان مغناطیسی، تمام حالات اسپین یک هسته ترازهای انرژی برابری دارند. در حالیکه در صورت اعمال یک میدان مغناطیسی، حالات مختلف اسپین انرژی یکسانی را نخواهند داشت زیرا یک هسته ذره ای باردار بوده و هر ذره باردار متحرک نیز تولید میدان مغناطیسی می کند. بنابراین در صورت اعمال مغناطیس یک هسته دارای گشتاور مغناطیسی است که بوسیله بارالکتریکی و اسپین آن تولید می شود.

برای مثال در حالت معمول هسته هیدروژن می تواند اسپینی (چرخش) موافق جهت عقربه های ساعت ($+\frac{1}{2}$) و یا خلاف جهت آن ($-\frac{1}{2}$) داشته باشد و در این حالت گشتاورهای مغناطیسی هسته در دو جهت مخالف هستند.



شکل (۱-۳۹): گشتاور مغناطیسی اسپین ها در حالت معمول (Pavia et al., 2009).

در یک میدان مغناطیسی، تمام پروتون ها گشتاور مغناطیسی خود را در جهت میدان یا در خلاف جهت آن قرار می دهند. حالت اسپین در صورتیکه در جهت میدان باشد از انرژی کمتری برخوردار است در حالیکه حالت اسپین در خلاف جهت میدان دارای انرژی بالاتری است. طی پدیده رزونانس مغناطیس هسته ای، هسته های همجهت میدان مغناطیسی انرژی را جذب می کنند و جهت اسپین خود را نسبت به میدان تغییر می دهند (مقدار انرژی جذب شده برابر اختلاف انرژی بین دو حالت موجود است). به دنبال حذف میدان مغناطیسی مقدار انرژی جذب شده به صورت تابشی در ناحیه فرکانس رادیویی طیف الکترومغناطیسی منتشر می شود و دستگاه طیف سنج NMR آن را به صورت یک سیگنال رزونانس یا پیک نمایش می دهد (Pavia et al., 2009).

در واقع مطالعه یک مولکول توسط طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ای این امکان را فراهم می کند تا اختلاف خواص مغناطیسی هسته های مختلف موجود در یک مولکول ثبت شود و موقعیت هر یک از این هسته ها در داخل مولکول مورد ارزیابی قرار گیرد. با استفاده از این روش می توان پیش بینی کرد که چند نوع هسته با موقعیت محیطی متفاوت در یک مولکول وجود دارد. همچنین می توان دریافت که چه اتم هایی در گروه های مجاور وجود داشته و تعداد اتم های موجود در هر موقعیتی را نیز می توان مشخص نمود.

جهت بدست آوردن این اطلاعات باید مقداری از جسم مورد آزمون (حداقل ۵ تا ۱۰ میلی گرم) در یک حلال بی اثر و فاقد هیدروژن مثل تترا کلرور کربن یا دوتریو کلروفرم ($CDCl_3$)، آب سنگین (D_2O)، دوتریو استن (CD_3-C-CD_3) و غیره به صورت محلول در آمده و در بین دو قطب مغناطیسی دستگاه قرار گیرد. در این حالت هیدروژن های موجود در مولکول بر حسب موقعیت اطراف خود در مولکول (جابجایی شیمیایی)^۱ دچار تغییرات می شوند. این تغییرات را می توان بوسیله دستگاه رزونانس مغناطیس هسته ای در مقایسه با جسم استاندارد که معمولاً تترا متیل سیلان^۲ (TMS) است مورد ارزیابی قرار داد.

TMS از متداولترین استانداردهای مورد استفاده برای NMR است که در حلال های آلی مانند کلروفرم محلول می باشد. در صورتیکه جسم مورد آزمایش در آب محلول باشد (مانند پلی ساکاریدها) از ترکیب دیگری به نام (DSS)^۳ یا نمک سدیم آن به عنوان استاندارد استفاده می شود. قابلیت انحلال DSS در آب بسیار بیشتر از TMS است (صمصام شریعت، ۱۳۸۶).

مناسب ترین نقطه شروع برای مطالعه NMR پلی ساکاریدها، بررسی NMR پروتون است. زیرا پروتون ساده ترین هسته و اولین هسته ای است که پدیده NMR برای اولین بار در آن مشاهده شده

^۱ Chemical Shift

^۲ Tetramethylsilane

^۳ 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid

است. دو نوع پروتون (پروتون متصل شده به اتم های کربن و اتم های اکسیژن) برای مطالعه NMR پروتون گلیکوزها وجود دارد.

پروتون های هیدروکسیلی (هیدروژن متصل به اتم اکسیژن) به دلیل تولید سیگنال های پهن، تغییر پذیر در جا به جایی شیمیایی و قابلیت سهولت تبادل در محلولهای آبی، برای تغییر ساختار مناسب نیستند. پروتون های متصل به کربن های ۲ تا ۶ نسبت به پروتون متصل شده به کربن آنومری (کربن شماره ۱) از قابلیت حفاظت بیشتری برخوردارند. معمولاً تجزیه و تحلیل طیف کامل NMR پروتون، به دلیل پیچیدگی NMR پروتون آلیگو و پلی ساکاریدها، ضرورتی ندارد و محققین بیشتر ناحیه آنومری (۴/۵-۶/۵ PPM) را که حاوی سیگنال های مهمی است مورد تجزیه و تحلیل قرار می دهند.

طیف NMR کربن کربوهیدرات ها حاوی اطلاعات با ارزشی در مورد ساختار آلیگو و پلی ساکاریدها است. در این طیف برای هر نوع به خصوصی از کربن های موجود، یک سیگنال وجود دارد. به عبارت دیگر کربن های گوناگون، سیگنال های متمایزی را که مشخصه ساختاری آنهاست، در این طیف نشان می دهند. برای مثال عموماً سیگنال های کربن شماره ۱ مربوط به اتصالات گلیکوزیدی نوع آلفا و بتا به ترتیب در نواحی بین ۹۹-۱۰۲ PPM و ۱۰۵-۱۰۲ PPM ظاهر می شوند.

با استفاده از طیف های حاصل از NMR کربن پلی ساکاریدها، دستیابی به اطلاعاتی مانند ترکیب مونوساکاریدها، توالی و شکل پلی ساکاریدها و همچنین تشخیص خلوص پلی ساکاریدهای حاصل از مرحله آماده سازی امکان پذیر خواهد بود (جهان بین، ۱۳۹۰).

۱-۴-۷-۳-۴ درجه چرخش نوری (پلاریمتری)

هناطور که قبلاً اشاره شد علاوه بر قندهای مختلف، اشکال حلقوی و آنومری مونوساکاریدها نیز چرخش نوری ویژه متفاوت و منحصر به فردی دارند. وقتی کریستال های یک نوع قند به صورت محلول در می آیند، آرایش فضائی آلفا و بتا واحدهای قندی به یکدیگر تبدیل می شوند. ضمن تبدیل آلفا به بتا و بالعکس، ساختار حلقوی مونوساکاریدها باز می شود. طی این فرآیند آرایش فضائی پیرامون کربن

های آنومری تغییر کرده و دچار بازآرایی می شوند، که در نتیجه تغییرات قدرت چرخش نوری مونوساکاریدها (موتاروتاسیون) را در پی دارد (Belitz et al., 2009).

با تعیین توان چرخش نوری محلول های گلیکولیز، پیش بینی آرایش فضایی اتصالات گلیکوزیدی امکان پذیر خواهد بود. معمولاً چرخش نوری نسبتاً بالا در ساکارید (مساوی یا بزرگتر از ۱۰۰ درجه) نشان دهنده وجود تعداد زیادی اتصالات نوع آلفا و چرخش نوری نسبتاً پایین (مساوی یا کمتر از ۱۰ درجه) بیانگر وجود تعداد زیادی اتصالات نوع بتا است (Heinz, 2005).

۱-۵ معرفی گیاه (درخت بادام کوهی *Amygdalus scoparia* spach)

۱-۵-۱ خصوصیات اکولوژیکی و تاکسونومی گیاه

زدو صمغ ترشگی شفافی است که از تنه درخت بادام کوهی با نام علمی *آمیگدالوس اسکوپاریا* اسپچ به دلیل بیماری های قارچی، محافظت در برابر صدمات مکانیکی یا نیش حشرات حاصل می شود. این درختچه از خانواده گلسرخیان و جنس پرانوس^۱ است که در ایران بطور وحشی و خودرو در مناطق خشک و نیمه خشک ایرانی تورانی زاگرس می روید.

این گونه گیاهی بومی کشور ایران است و پراکنش جغرافیایی این درختچه در استان های فارس، کرمان، یزد، ایلام، چهار محال بختیاری، خراسان، سیستان بلوچستان، بوشهر و خوزستان گزارش شده است (مظفریان، ۱۳۸۳ و مظفریان، ۱۳۷۵). این درختچه در برابر شرایط نامساعد محیطی، کم آبی، نوسانات شدید دما و انواع اقلیم مقاوم است و بخوبی رشد و گسترش می یابد (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۲).

راندمان تولید صمغ های تراوشی توسط گونه های مختلف گیاهی تحت شرایط آب و هوایی و خاک

^۱ Prunus

مطلوب بسیار کم و نا چیز است. در حالیکه تحت شرایط نامساعد مانند گرمای بیش از حد یا کمبود رطوبت و نیز در ارتفاعات زیاد، راندمان تراوش صمغ به میزان قابل توجهی افزایش می یابد. این بازده می تواند عمداً از طریق کندن پوست درختان یا ایجاد شکاف در تنه درخت و آسیب رساندن افزایش یابد (Nussinovitch, 2010).

یکی از مهمترین مناطق جمع آوری صمغ زدو استان فارس است زیرا بعلت شرایط آب و هوایی گرم و خشکی که دارد راندمان تولید این صمغ از درختان بادام کوهی موجود در این منطقه زیاد است، به همین دلیل نام دیگر صمغ زدو، صمغ فارسی یا شیرازی است (خالصی و همکاران، ۱۳۹۱).

۱-۵-۲ مشخصات ظاهری گیاه

بادام کوهی درختچه ای با ارتفاع حداکثر ۶ متر است (شکل ۱-۴۰). این درختچه منشعب و پُر شاخه دارای شاخه های ترکه ای و راست است که شاخه های آن اغلب بدون گُرد، سبز رنگ و استوانه ای هستند. این گیاه اغلب در فصل تابستان بدون برگ است و برگ های آن که بیشتر در فصل بهار دیده می شوند خطی سر نیزه ای یا خطی قاشقی با لبه کنگره ای - دندانه ای با قاعده ای ممتد، نوکی سیخک دار سبز رنگ و بدون گُرد هستند.

این درختچه در فصل بهار گل می دهد و گلپای آن سفید یا سفید مایل به قرمز و بزرگ در گل آذین خوشه ای بر روی شاخه قرار گرفته اند. این گیاه دارای میوه شفت کروی یا تخم مرغی به قطر حداکثر تا ۲۰ میلی متر با گُرد های دائمی است (مظفریان، ۱۳۸۳).

صمغ تراوش شده از درختچه بادام کوهی به صورت اشک مانند یا توده های بدون شکل هستند که بعد از تراوش به دنبال قرار گرفتن در معرض نور آفتاب خشک و تبدیل به ترشحات سخت و شیشه ای با رنگ های مختلف می شوند (شکل ۱-۴۱).

بر اساس استاندارد که برای این صمغ تعریف شده است (استاندارد شماره ۱۳۴۶ - ۴۴۲) صمغ زدو با رنگ های سفید نباتی، زرد روشن تا نارنجی و قرمز یافت وجود دارد و عوامل مؤثر در درجه بندی

این صمغ شامل مواد خارجی و اندازه قطعات است.



شکل (۱-۴۰): تصاویری از نوع شاخه، برگ، گل و میوه درخت بادام کوهی.

طبق این استاندارد صمغ زرد بر حسب رنگ و مواد خارجی (مواد زائد) که دارد به دو درجه تقسیم می شوند. صمغ زرد درجه یک که به رنگ سفید تا کرمی است و فاقد هر گونه مواد خارجی و زدوی سیاه است. و صمغ درجه دو، که رنگی زرد، نارنجی و قرمز دارد (معروف به زدو معمولی). این صمغ می تواند تا ۵٪ مواد خارجی و ۵٪ زدو سیاه^۱ داشته باشد.

^۱ صمغی به رنگ ساقه درخت که در اثر دوری از آفتاب تغییر رنگ داده است.



شکل (۱-۴۱): درجه بندی صمغ زدو بر اساس رنگ.

۱-۵-۳ ترکیبات شیمیایی گیاه

مطالعات انجام شده روی صمغ های تراوش شده از درختان نشان می دهد که صمغ ها متشکل از یک بخش عمده پلی ساکاریدی حاوی مونوساکاریدهای گالاکتوز، آرابینوز، رامنوز، اسیدهای اورونیک و عناصری مانند کلسیم و منیزیم هستند که به عنوان ترکیبات اصلی و عمده آنها محسوب می شوند. بعلاوه ترکیباتی مانند مونوساکاریدهای گلوکز، زایلوز، مانوز و موادی مانند چربی ها و در برخی موارد پروتئین ها نیز ممکن است ترکیبات فرعی این صمغ ها را تشکیل دهند (Mirhosseini & Tabatabaee Amid, 2012).

تفاوت موجود بین نسبت های مختلف ترکیبات اولیه تشکیل دهنده این صمغ ها، که ناشی از شرایط زیست محیطی (آب، هوا و خاک) متفاوت آنهاست، منجر به بروز خصوصیات فیزیکوشیمیایی گوناگون صمغ های گیاهی می شود (Nussinovitch, 2010).

۱-۵-۴ موارد مصرف و کاربردهای صمغ زدو

همانطور که اشاره شد صمغ ها ترکیبات ناهمگنی هستند که معمولاً حاوی یک بخش محلول و یک بخش نامحلول می باشند (Mhinzi, 2002). صمغ های طبیعی محلول در آب، به عنوان گروهی از هیدروکلوئیدها، به علت توانایی آنها در امولسیفیه کردن، ریز کپسوله کردن، ایجاد قوام و ... دارای ویژگی های کاربردی بسیار گسترده و مطلوب در صنایع گوناگون از جمله صنایع غذایی هستند (Jahanbin et al., 2012).

طبق گزارشات موجود، هیدروکلوئیدهای غذایی دارای بازاری بالغ بر ۳ میلیارد دلار در دنیا هستند، که در این میان انواع صمغ ها با منشاء گیاهی جزء افزودنی های مورد توجه در بسیاری از صنایع از جمله صنایع غذایی محسوب می شوند، زیرا مصرف کنندگان ترجیح می دهند از ترکیبات طبیعی در مواد غذایی خود استفاده کنند (Singthong et al., 2009).

از طرف دیگر بسیاری از کارشناسان تغذیه بخصوص در کشورهای صنعتی، به شدت علاقه مند به استفاده از خواص بالقوه این مواد به عنوان فیبر رژیمی یا کاربرد آنها در فرمولاسیون مواد غذایی کم چرب و کم کالری هستند (Miyoshi & Nishinari, 2000).

افزون بر استفاده از صمغ زرد در صنایع مختلف از جمله نساجی، کاغذ سازی، چسب سازی، آرایشی و بهداشتی (مکمل صمغ عربی و کتیرا به جهت پایداری سیستم های امولسیون)، داروسازی (استفاده از خاصیت چسبندگی آن در قرص سازی) و ... این صمغ در طب سنتی نیز به منظور تحریک اشتها، خرد کردن سنگ مثانه، رفع سرفه های مزمن و رفع دندان درد نیز کاربرد دارد. سالیانه مقادیر زیادی از صمغ برداشت شده به کشورهای اروپائی بویژه آلمان و فرانسه صادر می شود (خرمی، ۱۳۸۵).

اخیراً کارشناسان صنایع غذایی پیوسته تلاش می کنند تا منبع جدیدی از هیدروکلوئیدها را با خواص عملکردی مطلوب به صنعت غذا معرفی کنند. در کشور ایران کم و بیش تحقیقاتی در زمینه کاربردهای صمغ زرد در صنایع گوناگون از جمله صنایع غذایی، دارویی و ... صورت گرفته است اما متأسفانه هیچ کدام جنبه عمل پیدا نکرده اند (خرمی و همکاران، ۱۳۸۹، Golkar et al., 2015).

Hashtjin & Abbasi, 2013، Jafari et al., 2014، Fadavi et al., 2014، Abbasi & Mohamadi, 2013، (2015).

فصل دوم:

بررسی منابع

۲ بررسی منابع

۱-۲ استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدها

استخراج و خالص سازی ترکیبات مختلف از گیاهان از گذشته تا کنون به مرور زمان تکامل یافته است، بطوریکه امروزه روش های اختصاصی برای استخراج و خالص سازی هرکدام از ترکیبات موجود در گیاهان در دسترس است. در ادامه تعدادی از انواع روش های استخراج که برای جداسازی پلی ساکاریدها از گیاهان مختلف توسط محققین در سال های اخیر استفاده شده مورد بررسی قرار می گیرد. زو^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۶ پلی ساکارید موجود در میسیلیوم قارچ گردایسپس گونی^۲ را با استفاده از آب در دمای اتاق و آب داغ °C ۷۸ استخراج کردند. آنها برای انجام فرآیند خالص سازی از ستون سفادکس جی - ۱۰۰ استفاده نمودند.

استخراج یک پلی ساکارید محلول در آب جدید از میوه گیاه لیسیموم بارباریوم^۳ توسط یوان^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از آب داغ °C ۸۰ انجام شد. فرآیند خالص سازی پلی ساکارید مذکور با استفاده از سفاکریل^۵ اس - ۲۰۰ صورت گرفت.

یانگ^۶ و همکاران در سال ۲۰۱۶ پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از پالپ هسته میوه گیاه لیچی چیننسیس^۷ استحصال کردند. آنها برای استخراج و خالص سازی پلی ساکارید مذکور به ترتیب از آب داغ °C ۸۰ و سفاکریل اس - ۴۰۰ استفاده کردند.

^۱ Zhu^۲ *Cordyceps gunnii*^۳ *lycium Barbarium*^۴ Yuan^۵ Sephacryl^۶ Yang^۷ *Litchi Chinensis*

لیم^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۶ پلی ساکارید محلول در آب جدیدی از اندام هوایی گیاه گون میمبراناسه^۲ با استفاده از آب گرم ۵۰°C استحصال کردند. فرآیند خالص سازی پلی ساکارید مورد نظر با استفاده از سفاکریل اس - ۲۰۰ و ۳۰۰ و سفاروز CL-6B انجام پذیرفت.

ژنگ^۳ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از آب جوش پلی ساکاریدهای محلول در آب گل های گیاه کریسان تیمم مورفولیوم^۴ استخراج کردند. فرآیند خالص سازی پلی ساکاریدهای مذکور با استفاده از دی اتیل آمینو اتیل سلولز (DEAE - سلولز) انجام شد.

هو^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای استخراج و خالص سازی پلی ساکارید موجود در جلبک دریایی سارگاسوم فیوزیفرم^۶ به ترتیب از آب داغ ۷۵°C و سفاکریل اس - ۳۰۰ استفاده کردند.

استخراج یک پلی ساکارید محلول در آب جدید از دانه های گیاه پیتسلوبیوم دالس بند^۷ توسط باگچی^۸ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از آب جوش انجام گرفت. فرآیند خالص سازی پلی ساکارید مذکور با استفاده از DEAE - سلولز انجام شد و در نهایت پلی ساکارید خالص بدست آمد.

هو^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از آب داغ ۸۰°C، یک نوع پلی ساکارید محلول در آب از ساقه گیاه آکانتوپاناکس براچیپوس^{۱۰} استحصال کردند. خالص سازی پلی ساکارید مذکور با استفاده از DEAE - سلولز - ۵۲ و سفاکریل اس - ۳۰۰ انجام شد.

^۱ Lim

^۲ *Membranaceus*

^۳ Zheng

^۴ *Chrysanthemum morifolium*

^۵ Hu

^۶ *Sargassum fusiforme*

^۷ *Pithecellobium dulce benth*

^۸ Bagchi

^۹ Hu

^{۱۰} *Acanthopanax brachypus*

فرآیند استخراج و خالص سازی پلی ساکاریدهای ریشه گیاه سینوموریوم سَنگاریکِم^۱ به ترتیب با استفاده از آب در درجه حرارت محیط و DEAE – سلولز – ۵۲ توسط وانگ^۲ و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت.

استخراج پلی ساکارید ریشه گیاه پی اُنیَا آلبا^۳ با استفاده از آب داغ ۸۰°C توسط ژانگ^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۵ صورت گرفت. آنها برای خالص سازی پلی ساکارید استخراج شده از DEAE – سلولز – ۵۲ و سفادکس جی – ۲۵ استفاده کردند.

ژنگ^۵ و همکاران در سال ۲۰۱۵ پلی ساکارید محلول در آب موجود در میوه یک گیاه بومی چین با نام فورچنلا مارگاریتا سواینگل^۶ را توسط آب داغ استخراج کردند، و برای افزایش راندمان استخراج از امواج فراصوت با قدرت ۲۴۰ – ۱۲۰ وات به مدت ۱۲۰ – ۴۰ دقیقه و تغییرات دما بین ۷۰°C – ۳۰ استفاده شد. طی این فرآیند خالص سازی پلی ساکارید توسط DEAE و سفاروز CL-6B صورت گرفت. استخراج و خالص سازی پلی ساکارید حاصل از گیاه کنگر ایلوسیفالیس^۷ به ترتیب با استفاده از آب داغ ۹۰°C و DEAE سفاروز و سفاروز CL-6B توسط ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد. نتایج نشان داد که پلی ساکاریدهای خالص شده هر دو نوع خنثی و اسیدی هستند.

استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از دانه های گیاه پلانتاگو آسیاتیکال^۸ توسط یین^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از آب جوش صورت گرفت و سپس فرآیند خالص سازی با استفاده

^۱ *Cynomorium songaricum*

^۲ Wang

^۳ *Paeoniae Alba*

^۴ Zhang

^۵ Zeng

^۶ *Fortunella margarita Swingle*

^۷ *Acanthus ilicifolius*

^۸ *Plantago asiatica*

^۹ Yin

از سفاکریل اس - ۴۰۰ انجام شد.

جین^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از آب جوش پلی ساکاریدهای محلول در آب از چای حاصل شده از برگ های گیاه آنجلیکا سینسیس^۲ پرداختند. فرآیندهای خالص سازی با استفاده از سفاکس جی - ۱۰۰ انجام شد و در نهایت پلی ساکارید خالص بدست آمد.

استخراج و خالص سازی یک پلی ساکارید جدید از ریشه های گیاه چوبک تماشایی^۳ به ترتیب با استفاده از آب گرم ۵۰°C و DEAE - سلولز A - ۵۲ و سفاکس جی - ۱۰۰ توسط جهان بین و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد.

نا^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۰ پلی ساکارید محلول در آب موجود در جلبک دریایی سبز کاپسوسیفن فولوسنس^۵ را توسط اسید رقیق استخراج و برای خالص سازی آن از ستون تبادل یونی DEAE - سلولز استفاده کردند.

پیرا^۶ و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از آب در دمای محیط پلی ساکارید محلول در آب صمغ تراوش شده از درخت بادام زمینی کاشیو-نات^۷ را استخراج کردند. فرآیند خالص سازی با استفاده از سفاکس جی - ۱۰ صورت پذیرفت انجام گرفت.

استخراج پلی ساکارید اصلی محلول در آب از صمغ تراوش شده از تنه درخت کوروتون یوکوروانا^۸ توسط مایلو^۹ و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از آب در درجه حرارت محیط انجام شد. برای فرآیند خالص سازی پلی ساکارید مذکور از DEAE سفاروز و سفاروز CL-4B استفاده شد.

^۱ Jin

^۲ *Angelica sinensis*

^۳ *Acanthophyllum bracteatum*

^۴ Na

^۵ *Capsosiphon fulvescens*

^۶ Pereira

^۷ Cashew - nut

^۸ *Coroton urucurana*

^۹ Milo

۲-۲ شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها

شناسایی ساختار ترکیبات جدید موجود در منابع طبیعی با وجود دشواری و صرف زمان زیاد، از گذشته تا امروز مورد توجه پژوهشگران بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مقالاتی که هر ساله در این زمینه در مجلات تخصصی معتبر چاپ می شود گواه این ادعا است.

مطالعات ساختاری پلی ساکارید محلول در آب حاصل از میوه گیاه لیسیموم بارباریوم توسط یوآن و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که وزن مولکولی این پلی ساکارید ۴۷۰۰۰۰ گرم بر مول است. این نوع پلی ساکارید از واحدهای مونوساکاریدی آرابینو فورانوز، گالاکتو پیرانوز، اسید گلوکورونیک و رامنو پیرانوز به ترتیب با نسبت های مولی ۹/۲، ۶/۶، ۱ و ۰/۹ تشکیل شده است. نتایج حاصل از روش های آنالیز شیمیایی و طیف سنجی NMR بیانگر وجود مونوساکاریدهای بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۶) در اسکلت اصلی ساختار این پلی ساکارید بود و واحدهای گالاکتوز موجود در زنجیر اصلی در موقعیت کربن شماره ۳ منشعب می شدند. در این ساختار شاخه های جانبی متصل به زنجیر اصلی شامل واحدهای مونوساکاریدی بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۳)، آلفا - ال - آرابینو فورانوز با اتصالات (۱→۵) و (۱→۲)، آلفا - ال - رامنو پیرانوز با اتصالات (۱→۲) و اسید بتا - د - گلوکورونیک با اتصالات (۱→۴) بودند.

یانگ و همکاران در سال ۲۰۱۶ با مطالعه بر روی پلی ساکاریدهای محلول در آب حاصل از پالپ هسته میوه لیچی چیننسیس به این نتیجه رسیدند که وزن مولکولی این نوع پلی ساکارید ۸۵۰۰۰۰۰ دالتون است. نتایج حاصل از تعیین ساختار این پلی ساکارید با روش های آنالیز شیمیایی و دستگاهی نشان دهنده وجود واحدهای اسید آلفا - د - گالاکتورونیک با اتصالات (۱→۴) و بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۶) در ساختار زنجیر اصلی پلی ساکارید بود. مونومرهای آلفا - ال - آرابینو فورانوز با اتصالات (۱→۵) و (۱→۲)، آلفا - ال - رامنو پیرانوز با اتصالات (۱→۲) واحدهای سازنده

شاخه های جانبی این پلی ساکارید بودند.

پترا^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۵ ساختار پلی ساکارید حاصل از اندام هوایی گیاه سرئوس تریانگلاریس کلاددیس^۲ را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که وزن مولکولی پلی ساکارید حاصل نسبتاً بالا و مقدار آن ۸۴۳۰۰۰۰ گرم بر مول است. نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای سازنده آن نشان داد که پلی ساکارید از نوع آرابینو گالاکتان است و عمدتاً از واحدهای مونوساکاریدی گالاکتوز و آرابینوز با نسبت های مولی ۵۵/۴ و ۳۷ تشکیل شده است. بعلاوه حضور مقدار کمی رامنوز و اسید گالاکتورونیک با نسبت های مولی ۳/۸ و ۱/۶۹ می تواند به تجزیه مقدار بسیار کمی از پلیمرهای پکتیکی نسبت داده شود. اسکلت زنجیر اصلی از باقیمانده های بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات ۴→۱ تشکیل شده، و زنجیر اصلی در موقعیت کربن شماره ۳ واحدهای گالاکتوز منشعب می شود. باقیمانده های آلفا - ال - آرابینو فورانوز با اتصالات ۵→۱ و واحدهای آلفا - ال - آرابینو فورانوزیل با اتصالات ۱→۱ ساختار شاخه های فرعی را تشکیل می دهند.

بررسی پلی ساکارید موجود در صمغ حاصل از درخت بادام پرونس آمیگدالوس^۳ توسط بو عزیز^۴ و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داد که وزن مولکولی پلی ساکارید ۹۹/۳ کیلو دالتون است. واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید توسط طیف سنج جرمی بررسی و مشخص که پلی ساکارید خالص شده یک هترو پلی ساکارید پیچیده اسیدی (آرابینو گالاکتان) متشکل از واحدهای قندی گالاکتوز، آرابینوز، زایلوز، مانوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک به ترتیب با نسبت های ۴۵، ۲۶، ۷، ۱۰، ۱ و ۱۱ است. نوع اتصالات و نحوه آرایش واحدهای مونوساکاریدی در این بررسی مشخص نشد.

^۱ Petera

^۲ *Cereus triangularis cladodes*

^۳ *Prunus amygdalus*

^۴ Bouaziz

بررسی پلی ساکارید موجود در صمغ تراوش شده از تنه درخت هلو پرونس پرسیکا^۱ توسط سیماس توسین^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که پلی ساکارید خالص شده یک آرابینو گالاکتان اسیدی بسیار پُر شاخه است که از ۵ واحد مونوساکاریدی آرابینوز، زایلوز، مانوز، گالاکتوز و اسیدهای اورونیک به ترتیب با نسبت‌های مولی ۳۷، ۱۳، ۲، ۴۲ و ۶ تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید حاصل ۳۹۳۰۰۰۰ گرم بر مول و نتایج حاصل از تعیین ساختار پلی ساکارید مذکور با روش های شیمیایی (هیدرولیز اسیدی ناقص، اکسیداسیون پریدوات و متیلاسیون) و دستگاهی (طیف سنجی جرمی و NMR) بیانگر وجود واحدهای بتا - د - گالاکتوپیرانوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۶) در ساختار زنجیر اصلی و حضور واحدهای آلفا و بتا - ال - آرابینو فورانوز و بتا - د - زایلو پیرانوز یا آلفا - د - مانو پیرانوز در شاخه های جانبی بود. زنجیرهای جانبی توسط واحدهای انتهایی غیر احیاء کننده آلفا - ال - آرابینو فورانوز و بتا - د - زایلو پیرانوز به پایان می رسند.

مطالعات ساختاری پلی ساکارید حاصل از صمغ تراوش شده از درخت گُکُلسپرمیوم گوسپیپوم^۳ توسط وینود^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که وزن مولکولی پلی ساکارید استحصال شده ۸۵۰۰۰۰۰ گرم بر مول است. نتایج حاصل از تعیین ساختار پلی ساکارید حاصل با استفاده از طیف سنجی NMR بیانگر این بود که واحدهای مونوساکاریدی این صمغ بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۶)، اسید بتا - د - گلوکورونیک با اتصالات (۱→۳)، آلفا - ال - رامنو پیرانوز با اتصالات (۱→۲) و اسید آلفا - د - گالاکتورونیک با اتصالات (۱→۴) است. در واقع اسکلت اصلی زنجیر پلی ساکارید از واحدهای بتا - د - گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۶) تشکیل شده و بقیه مونومرها واحدهای سازنده شاخه های فرعی بودند و شاخه های جانبی با واحدهای انتهایی اسید بتا -

^۱ *Prunus persica*

^۲ Simas-Tosin

^۳ *Cochlospermum gossypium*

^۴ Vinod

دی - گلوکورونیک به پایان می رسید.

مارتینز^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۳ پلی ساکارید حاصل از صمغ تراوش شده از درخت اسپوندیس دالسیس (آناکاردیاسی)^۲ را با استفاده از طیف سنجی NMR تک و دو بُعدی همراه با روش های آنالیز شیمیایی نظیر متیلاسیون و اکسیداسیون پریدوات مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنها نشان داد که پلی ساکارید استخراج شده یک آرابینوگالاکتان اسیدی متشکل از واحدهای قندی گالاکتوز، آرابینوز، مانوز و اسید گلوکورونیک به ترتیب با نسبت های مولی ۵۴، ۲۶، ۶ و ۱۴ است. نتایج حاصل از آنالیز ساختاری پلی ساکارید حاکی از وجود واحدهای بتا - د - گالاکتوپیرانوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۶) در ساختار زنجیر اصلی و حضور واحدهای آلفا - ال - آرابینو فورانوز و بتا - ال - آرابینو پیرانوز با اتصالات (۱→۳) در زنجیرهای جانبی بود. در این ساختار، اسید بتا - د - گلوکورونیک واحدهای پایانی زنجیرهای جانبی را تشکیل داد.

مایلو و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی پلی ساکارید محلول در آب حاصل از صمغ تراوش شده از تنه درخت کوروتون یوکورورانا دریافتند که پلی ساکارید مذکور بطور عمده از واحدهای مونوساکاریدی فوکوز، آرابینوز و گالاکتوز به ترتیب با نسبت های مولی ۷/۸، ۸/۱ و ۱۹ و مقادیر جزئی از واحدهای مونومری مانوز، زایلوز، گلوکز و اسید اورونیک به ترتیب با نسبت های مولی ۲/۲، ۱، ۰/۳ و ۳ تشکیل شده است. وزن مولکولی پلی ساکارید حاصل حدود ۲۴۸۰۰۰۰ دالتون بود. نتایج طیف سنجی جرمی پلی ساکارید متیله شده نسبت بالایی از واحدهای گالاکتوپیرانوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۶) و دی متیل گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۳، ۶)، (۱→۲، ۶) و (۱→۲، ۳) و تری متیل گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۲، ۳، ۶) و فوکوز و آرابینوز با اتصالات (۱→) را نشان داد. این نتایج حاکی از این است که اسکلت اصلی متشکل از واحدهای گالاکتو پیرانوز با اتصالات (۱→۳) است که برخی از آنها

^۱ Martinez

^۲ *Spondis dulcis* (Anacardiaceae)

در محل کربن شماره ۲ یا (۲ و ۶) منشعب می شوند. شاخه های جانبی در این ساختار که به زنجیر اصلی متصلند عمدتاً توسط واحدهای پایانی زایلوپیرانوزیل و گالاکتوپیرانوزیل به اتمام می رسند. این پژوهشگران در تحقیقات خود از طیف سنجی NMR استفاده نکردند و اطلاعاتی در مورد نوع آلفا یا بتا بودن قندهای سازنده این نوع پلی ساکارید ارائه ننمودند.



فصل سوم:

مواد و روشها

۳ مواد و روش ها

۳-۱ مواد اولیه و محلول های شیمیایی

۳-۱-۱ جمع آوری صمغ تراوش شده از درخت بادام کوهی (*Amygdalus scoparia spach*)

پس از شناسایی گونه درخت بادام کوهی توسط گیاه شناس معروف دکتر ولی ا... مظفریان، طی ماه های مرداد و شهریور ۱۳۹۴ صمغ های تراوش شده از تنه و شاخه درختان بادام کوهی از منطقه میان جنگل نزدیک شهرستان فسا واقع در استان فارس بطور دستی جمع آوری شد و پس از بسته بندی در کیسه های نایلونی به آزمایشگاه منتقل شدند. با توجه به درجه بندی صمغ زرد بر اساس تنوع رنگی که دارد (سفید تا قرمز)، در این پژوهش تنها قطعات کوچک و تقریباً یکنواخت صمغ های سفید رنگ مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل (۳-۱): قطعات سفید رنگ صمغ زرد

۳-۱-۲ مواد شیمیایی و استانداردهای مورد استفاده

استانداردهای مختلف مانند دکستران با اوزان مولکولی متفاوت (۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون) از شرکت فارماسیا^۱ (آپسالا^۲، سوئد)، مونوساکاریدهای استاندارد خالص (د-مانوز، ال-رامنوز، د-گلوکز،

^۱ Pharmacia

^۲ Uppsala

د - گالاکتوز، ال - آرابینوز، د زایلوز و اسید ال - گالاکتورونیک) و حلال هایی نظیر DMSO و DSS از شرکت های سیگما^۱ (آمریکا) و مرک^۲ (آلمان) تهیه شدند.

بعلاوه اسید تری فلورو استیک به کار گرفته شده برای انجام آزمون های شیمیایی از شرکت فلوکا^۳ و DEAE - سلولز و سفاکريل S-۴۰۰ و سفادکس جی - ۲۵ مورد نیاز برای خالص سازی پلی ساکارید مورد نظر نیز از شرکت فارمسیا (اُپسالا، سوئد) خریداری شدند.

۲-۳ دستگاه های مورد استفاده

طی مراحل استخراج و خالص سازی پلی ساکارید غالب محلول در آب موجود در نمونه، تجهیزاتی مانند ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم ساخت شرکت ای آند دی^۴ ژاپن، تبخیر کننده دورانی همراه با پمپ های خلاء مخصوص، ساخت شرکت هیدلف^۵ آلمان و سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ rpm و قابل استفاده در مقیاس حجمی بالا (۱ لیتری) ساخت شرکت ایندورف^۶ آلمان به کار گرفته شد.

بعلاوه تجهیزاتی مانند کروماتوگرافی غربال مولکولی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو^۷) همراه با ستون ژل - تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال^۸ ساخت توسو^۹ ژاپن، دستگاه پلاریمتر پرکین المر^{۱۰} ۳۴۳ ساخت کشور آمریکا، اسپکترو فوتومتر واریان کری ۱۰۰ - بیو^{۱۱} ساخت کشور آمریکا، طیف سنج مادون قرمز نیکولت^{۱۲} ۵۷۰۰ ساخت کشور آمریکا، کروماتوگرافی گازی واریان

^۱ Sigma

^۲ Merck

^۳ Fluka

^۴ A&D

^۵ Heidolph

^۶ Ependorf

^۷ Shimadzu

^۸ TSK-GEL G3000 PWXL

^۹ Tosoh

^{۱۰} Perkin-Elmer 343

^{۱۱} Varian Cary 100-Bio

^{۱۲} Nicolet 5700

۱۳۴۰۰ ساخت کشور آمریکا، طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای مدل بروکر آ وی - ۲۵۰۰ ساخت کشور آلمان و کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی مدل اچ پی ۳۵۸۹۰ ساخت کشور آمریکا، طی مراحل آنالیز شیمیایی و دستگاهی جهت شناسایی و تشخیص ساختار شیمیایی و مولکولی پلی ساکاریدها مورد استفاده قرار گرفتند.

از دیگر وسایل و دستگاههای مورد استفاده در این پژوهش می توان به انواع ستون های کروماتوگرافی، کیسه دیالیز با cut off ۳/۵ کیلو دالتون، کوره، آون معمولی و تحت خلاء، قیف های بوخنر و سینتر گلاس، دسیکاتور، همزن های مغناطیسی مجهز به سیستم حرارتی، سونیکاتور (آلتراسونیک)، بن ماری (حمام آب گرم) و دکانتورها اشاره کرد.

۳-۳ روش کار

۱-۳-۳ استخراج و جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

۱-۱-۳-۳ استخراج پلی ساکاریدهای محلول در آب از نمونه

در این مرحله پلی ساکاریدهای محلول در آب موجود در ۱۰ گرم از قطعات خرد شده و تقریباً یکنواخت صمغ مورد نظر با استفاده از آب داغ (75°C) به مدت ۴ ساعت استخراج شد. سپس بخش نامحلول پلی ساکارید توسط فیلتر پارچه ای جدا و در نهایت حجم محلول فیلتر شده توسط تبخیر کننده دورانی تحت خلأ کاهش یافت.

۲-۱-۳-۳ جداسازی پلی ساکاریدهای محلول در آب

جداسازی پلی ساکاریدهای مورد نظر از سایر ترکیبات موجود در نمونه، فرآیندی مهم و ضروری برای شناسایی مطلوب ساختار شیمیایی و مولکولی این پلیمرها محسوب می شود. در این مرحله از

^۱ Varian 3400

^۲ Bruker AV-500

^۳ HP 5890

پژوهش ناخالصی هایی مانند پروتئین ها توسط روش سواگ از عصاره آبی حاصل از مرحله استخراج، جدا شد و سپس پلی ساکاریدهای محلول در آب با استفاده از اتانول بصورت رسوب درآمدند که در ادامه به شرح جزئیات هر روش اشاره شد.

در روش پروتئین زدایی سواگ میزان کلروفرم افزوده شده ۲۰٪ حجم عصاره آبی و ۱- بوتانول نیز ۲۰٪ حجم کلروفرم مصرفی بود. بعلاوه پس از واسرشت شدن پروتئین های موجود در امولسیون حاوی نمونه و عملیات همزنی کلروفرم و ۱- بوتانول توسط همزن مغناطیسی به مدت یک ساعت، فرآیند سانتریفیوژ کردن با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مواد ناخالص پروتئینی به صورت یک لایه ژل مانند در حد واسط لایه های کلروفرم و عصاره آبی قرار گرفت و بصورت سه فاز متمایز از یکدیگر درآمد. در نهایت عصاره آبی پروتئین زدایی شده از بخش فوقانی جدا شد (Staub, 1965).

پلی ساکاریدهای محلول در آب عصاره آبی پروتئین زدایی شده، با افزودن اتانول ۹۶ درجه (به میزان ۳/۵ برابر حجم عصاره) به صورت رسوب درآمدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی ۴°C (دمای یخچال) رسوبات موجود در محلول حاوی اتانول توسط سانتریفیوژ کردن با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جدا شدند. سپس پلی ساکاریدهای ترسیب شده در دیواره های فالكون های شیشه ای دستگاه سانتریفیوژ توسط آب مقطر گرم (۶۰°C) شسته شد و در نهایت محلول حاصل توسط تبخیر کننده دورانی مجهز به پمپ خلاء خشک شد (جهان بین، ۱۳۹۰).

۳-۳-۲ خالص سازی پلی ساکارید محلول در آب

برای تشخیص ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب نمونه، یکنواختی و درجه خلوص آن قبل از آنالیزهای طیف سنجی از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا کوچکترین مقدار ناخالصی ممکن است اطلاعات نادرستی در مورد ساختار پلی ساکارید مورد نظر ارائه کند.

یکی از حساس ترین و بهترین روش هایی که معمولاً برای خالص سازی پلی ساکاریدها و حذف سایر آلودگی های غیر کربوهیدراتی مورد استفاده قرار می گیرد، بهره بردن از انواع مختلف روش های کروماتوگرافی است. برای جداسازی پلی ساکاریدهای خنثی و اسیدی کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ستون حاوی DEAE – سلولز بسیار مناسب است. در این روش ابتدا پلی ساکاریدهای خام حاصل از مرحله استخراج، توسط حجم کمی از آب یون زدایی شده به صورت محلول درآمد و پس از عبور از صافی های ۰/۴۵ میکرومتر به ستون کروماتوگرافی حاوی فاز ثابت DEAE – سلولز (۲/۶ سانتیمتر × ۳۰ سانتیمتر) منتقل شد. لازم به ذکر است که بطور معمول برای خالص سازی هر ۸ گرم پلی ساکارید، حدود ۲۰۰ گرم DEAE – سلولز کفایت می کند.

به دنبال وارد کردن پلی ساکاریدها به داخل ستون، ستون به ترتیب توسط آب و محلول آبی کلرید سدیم با گرادیان غلظتی بین صفر تا یک مولار شسته شد و فرآیند خالص سازی توسط روش فنل – اسید سولفوریک تحت نظارت قرار گرفت. در این روش ۵ سی سی اسید سولفوریک غلیظ و ۱ سی سی فنل به ۱ سی سی از محلول های خارج شده از ستون (فراکشن ها) در دوره های زمانی معین اضافه شدند و سپس نمونه ها پس از گذشت ۱۰ دقیقه استراحت به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۳۰°C قرار گرفتند. در کمپلکس حاصل از تجزیه قند توسط اسید سولفوریک غلیظ، حضور فنل باعث ایجاد رنگ زرد تا نارنجی متمایل به قهوه ای می شود. به عبارت دیگر شدت رنگ ایجاد شده در محلول متناسب با غلظت قند موجود در فراکشن است و غلظت قند موجود در فراکشن ها توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر در طول موج های ۴۸۰ و ۴۹۰ نانومتر قابل اندازه گیری است.

در ادامه با هدف خالص سازی بیشتر پلی ساکاریدها و جداسازی آنها بر اساس وزن مولکولی، فراکشن های جمع آوری شده از ستون DEAE – سلولز وارد ستون کروماتوگرافی ژل تراوای سفاکریل ۴۰۰ – S (۱/۶ سانتیمتر × ۷۰ سانتیمتر) شدند. شستشوی این ستون ها توسط آب یون زدایی شده با سرعت حجمی ۹ میلی لیتر بر ساعت انجام گرفت و در نهایت فراکشن های پلی ساکارید اصلی (غالب) جمع

آوری و با استفاده از تبخیر کننده دورانی مجهز به پمپ خلاء خشک شد (Whistler, 1965).

۳-۳-۱ نحوه آماده سازی ستون کروماتوگرافی حاوی DEAE - سلولز

جهت آماده سازی ستون کروماتوگرافی حاوی DEAE - سلولز برای خالص سازی پلی ساکاریدهای محلول در آب موجود در نمونه انجام برخی از مراحل ضروری است، و در صورتیکه این مراحل بدرستی انجام نشود ممکن است اختلالاتی در روند شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدها ایجاد شود.

برای این منظور DEAE - سلولز خشک پس از اینکه به ترتیب توسط اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال و سود ۰/۵ نرمال بصورت دوغاب درآمد، به داخل یک دسیکاتور تحت خلاء منتقل می شود تا ته نشین شود. این فرآیند ۳ مرتبه تکرار شده و در هر مرتبه محلول کدر رویی جدا و دور ریخته می شود. لازم به ذکر است که استفاده از دسیکاتور تحت خلاء با هدف خروج حباب های هوای به دام افتاده در بین مواد سلولزی بمنظور جلوگیری از ایجاد شکست در فاز ثابت داخل ستون انجام می شود.

پس از اتمام مراحل ذکر شده، DEAE - سلولز ترسیب شده در داخل محلول ۰/۱ نرمال سود به شکل معلق در آمده و بصورت یک لایه نازک به یک ستون کروماتوگرافی (قیف بوخنر) با ابعاد $2/6 \times 30$ سانتیمتر منتقل می شود. عمل شستشوی ستون توسط آب یون زدایی شده چندین مرتبه تکرار می شود و پس از متراکم شدن مواد سلولزی در داخل ستون، نمونه وارد ستون شده و به روشی که قبلاً اشاره شد فراکشن گیری انجام می شود (Whistler, 1965).

۳-۳-۳ شناسایی و تعیین ساختار پلی ساکاریدهای محلول در آب

همانطور که قبلاً اشاره شد روش های مورد استفاده برای آنالیز ساختار پلی ساکاریدها بطور قابل توجهی متفاوت از روش های بکار برده شده برای تجزیه و تحلیل ساختار سایر بیوپلیمرهاست و نیازمند تجهیزات و تکنیک های پیشرفته ای است. امروزه از روش های شیمیایی و دستگاهی گوناگونی جهت پی بردن به ساختار پلی ساکاریدها استفاده می شود، در ادامه تکنیک هایی که جهت شناسایی و تعیین

ساختار پلی ساکارید غالب موجود در صمغ تراوش شده از درخت بادام کوهی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت به تفصیل بیان شده است.

۳-۳-۱- تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب

با استفاده از روش های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی روی ستون سفاکریل S-۴۰۰ و سفادکس جی - ۲۵ ، کروماتوگرافی ژل تراوا و توسط سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (شیمادزو) همراه با ستون ژل - تی اس کا جی ۳۰۰۰ پی وی ایکس ال ساخت توسو ژاپن ($7/8 \times 300$ میلی متر) همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب موجود در نمونه مورد بررسی قرار گرفت. طی این روش از محلول ۰/۱ مولار سولفات سدیم با سرعت جریان حجمی ۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه برای شستشوی ستون استفاده شد و آشکار ساز مورد استفاده از نوع ضریب شکست نور مدل RID-10A (شیمادزو، ژاپن) بود. منحنی کالبراسیون با استفاده از استانداردهای دکستران با اوزان مولکولی مشخص (۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۷۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰۰ دالتون) حاصل شد و دمای ستون در طول آزمایش در درجه حرارت 40°C تنظیم شد. در نهایت وزن مولکولی پلی ساکارید محلول در آب با استفاده از منحنی کالبراسیون ذکر شده در قسمت فوق محاسبه گردید (Sun et al., 2010).

۳-۳-۲- طیف سنج مادون قرمز

از طیف سنج مادون قرمز مدل نیکولت ۵۷۰۰ (مدیسون، آمریکا) جهت تعیین طیف مادون قرمز پلی ساکارید محلول در آب نمونه و تعیین گروه های عاملی موجود در آن استفاده شد. در این مرحله پلی ساکارید کاملاً خالص (۱-۲ میلی گرم) پس از اختلاط با پودر برمور پتاسیم (درجه خلوص اسپکتروسکوپی) فشرده شد و به صورت قرص ۱ میلی متری مناسب برای آنالیز توسط دستگاه طیف سنج مادون قرمز درآمد. در نهایت نمودار تغییرات درصد نور عبور داده شده بر حسب فرکانس در محدوده 400 تا 4000 cm^{-1} رسم شد (Ray, 2006).

۳-۳-۳-۳ تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب نمونه با استفاده از دستگاه پلاریمتر پركين المير ۳۴۳ (ساخت کشور آمریکا) تعیین شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت تحت فرآیند هیدرولیز قرار گرفت. در ادامه ۵ میلی گرم از پلی ساکارید هیدرولیز شده پس از به حجم رساندن در یک بالن ژوژه ۵ میلی لیتری به لوله ۲ دسی متری دستگاه منتقل شد. اندازه گیری در دمای ۲۰°C و طول موج ۵۸۹ نانومتر انجام گرفت و در نهایت درجه چرخش نوری پلی ساکارید محلول در آب نمونه مورد نظر با قرار گرفتن عدد خوانده شده از دستگاه در رابطه زیر محاسبه گردید (Chaplin & Kennedy, 1994).

$$a = \frac{a'}{L \times C} \quad (1-3)$$

در این رابطه a' عدد خوانده شده از دستگاه، L طول لوله برحسب دسی متر، C غلظت برحسب گرم بر میلی لیتر و a درجه چرخش نوری پلی ساکارید نمونه است.

۴-۳-۳-۳ جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش

همانطور که قبلاً اشاره شد عدم جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش، بیانگر عدم حضور ناخالصی های پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید و در نتیجه عملکرد مناسب مرحله خالص سازی است. بنابراین جهت اطمینان از عدم حضور پروتئین ها و خلوص بالای پلی ساکاریدها می توان از طیف فرابنفش استفاده کرد. در این روش پس از تهیه محلولی از پلی ساکارید خالص شده (غلظت مهم نیست) و انتقال آن به سلولی از جنس کوارتز، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰ - بیو (ساخت کشور آمریکا) جذب محلول حاوی نمونه مورد نظر در ناحیه ۲۸۰ نانومتر ثبت شد (Nielsen, 2010).

۳-۳-۳-۵ تعیین قند کل و واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید

تعیین قند کل توسط روش فنل-اسید سولفوریک در طول موج ۴۹۰ نانومتر انجام گرفت و د - گلوکز بعنوان استاندارد در نظر گرفته شد. بعلاوه بمنظور تعیین کمی و کیفی مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید از کروماتوگرافی گازی مدل واریان ۳۴۰۰ (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. ستون بکار گرفته شده در این روش از نوع موئینه مدل دی ام^۱ - ۲۳۳۰ (۳۰ متر $\times$ ۰/۳۲ میلی متر $\times$ ۰/۲ میکرومتر) و آشکارساز مورد استفاده از نوع یونش شعله ای بود.

شرایط تنظیم درجه حرارت ستون به این نحو بود که در ابتدا دمای ستون در 120°C بمدت ۲ دقیقه ثابت ماند، سپس تا دمای 250°C (با نرخ 8°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۳ دقیقه در همین دما نگهداری شد. بعلاوه دمای قسمت تزریق و آشکار ساز به ترتیب 250°C و 300°C در نظر گرفته شد و از نیتروژن بعنوان گاز حامل (فاز متحرک) با سرعت جریان حجمی ۱/۲ میلی متر بر دقیقه استفاده گردید.

نمونه قبل از تزریق به دستگاه باید طی مراحل معینی آماده سازی و سپس به دستگاه منتقل شود. روش آماده سازی نمونه به این صورت بود که ابتدا ۱۵ میلی گرم پلی ساکارید در داخل لوله آزمایش توزین شد و ۲ میلی لیتر محلول ۲ مولار اسید تری فلورو استیک به آن اضافه گردید. در ادامه لوله های آزمایش بصورت درب بسته در دمای 120°C به مدت ۲ ساعت در معرض حرارت قرار گرفت. سپس اسید اضافی با استفاده از تبخیر سریع در حمام آب 40°C حذف شد و در نهایت با مصرف ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم نمونه هیدرولیز شده خنثی گردید. اسیدی کردن نمونه ها با استفاده از اسید استیک انجام گرفت و اسید بوریک اضافی با استفاده از متانول حذف شد. آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدین - انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب 90°C به مدت ۱ ساعت استیله و به استات های آلدیتول تبدیل شدند. استات های آلدیتول مونوساکاریدهای استاندارد (د - گلوکز، د -

^۱ DM-2330

– گالاکتوز، ال – رامنوز، د – مانوز، ال – آرابینوز، د – زایلوز و اسید ال – گالاکتورونیک) همراه با ۲ میلی گرم میو – اینوزیتول (بعنوان استانداردهای داخلی) همانند روش ذکر شده در بالا تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند (Chaplin & Kennedy, 1994 and Duenas -chasco et al., 1956).

مقدار اسید اورونیک با اندازه گیری میزان جذب در ۵۲۵ نانومتر توسط روش رنگ سنجی m-hydroxydiphenyl و استفاده از استاندارد اسید D-گلوکورونیک انجام شد (Filisetti-cozzi & Carpita, 1991). روش کار به این صورت بود که به ۰/۴ میلی لیتر محلول پلی ساکارید خالص در آب، ۲/۴ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شده و سپس لوله های آزمایش با درب بسته در حمام آب جوش (دمای °C ۱۰۰) به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شدند. پس از اینکه لوله های آزمایش در یک حمام یخ سرد شد ۱۵۰ میکرولیتر معرف متا-هیدروکسی دی فنیل به آنها اضافه شد و لوله های آزمایش در دمای محیط برای ۱۵ دقیقه تا یک ساعت قبل از اندازه گیری میزان جذب انکوبه شدند و در نهایت جذب محلول حاوی پلی ساکارید خالص و محلول شاهد (اسید D-گلوکورونیک) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر واریان کری ۱۰۰ – بيو (ساخت کشور آمریکا) در ناحیه ۵۲۵ نانومتر ثبت شد.

به منظور تعیین نوع و مقدار اسیدهای اورونیک در ساختار پلی ساکارید، پلی ساکارید خالص توسط NaBH_4 احیاء و تمام گروه های COOH – اسید اورونیک آن با CH_2OH – جایگزین شد. پلی ساکارید حاصل تحت عنوان پلی ساکارید احیاء شده در آزمون تعیین واحدهای مونومری سازنده مشابه با پلی ساکارید خالص اولیه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز شد.

۳-۳-۶ هیدرولیز اسیدی ملایم

از روش تانگ و همکاران (۲۰۰۸) برای انجام هیدرولیز اسیدی ملایم پلی ساکارید محلول در آب استفاده شد. در این روش ابتدا ۸۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۳ میلی لیتر از محلول ۰/۰۵ مولار

اسید تری فلورو استیک در دمای 80°C به مدت ۱۶ ساعت تحت فرآیند هیدرولیز قرار گرفت. رسوبات حاصل از فرآیند سانتریفیوژ کردن پلی ساکارید هیدرولیز شده تحت عنوان پلی ساکارید ۱ نامگذاری شدند. در ادامه سیال رویی بمدت ۲۴ ساعت تحت فرآیند دیالیز قرار گرفت و در نهایت فراکشن جدا شده، جمع آوری و تحت عنوان پلی ساکارید ۴ نامگذاری شد. سیال باقیمانده در کیسه دیالیز با اتانول رسوب داده شد و رسوب و سیال رویی به ترتیب تحت عنوان پلی ساکارید ۲ و ۳ نامگذاری شدند. تمامی فراکشن ها پس از خشک شدن، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی مطابق با روشی که قبلاً اشاره شد مورد آنالیز قرار گرفتند (Aspinall & Ferrier, 1957 and Tong et al., 2008).

۷-۳-۳-۳ اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت

ابتدا ۲۰ میلی گرم پلی ساکارید توسط ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۴ مولار پریدوات سدیم اکسید شد و پس از نگهداری در تاریکی، میزان جذب آن در ۲۳۳ نانومتر هر ۴ ساعت یکبار ثبت گردید. بعد از ۹۶ ساعت هنگامیکه میزان جذب ثابت شد و فرآیند اکسیداسیون به پایان رسید، پریدوات سدیم مازاد از طریق افزودن اتیلن گلیکول حذف شد. مصرف پریدوات و تولید اسید فرمیک به ترتیب با استفاده از روش اسپکترو فوتومتری و تیتراسیون با محلول ۰/۰۵۳ مولار سود مشخص شد. محلول حاوی محصولات حاصل از عمل پریدوات پس از دیالیز شدن به مدت ۴۸ ساعت، توسط ۵۰ میلی گرم بروهیدرید سدیم (در دمای 25°C به مدت ۱۲ ساعت) خنثی شد. در نهایت فرآیند هیدرولیز کامل با استفاده از محلول ۲ مولار اسید تری فلورو استیک، مطابق با روشی که برای آنالیز مونوساکاریدها اشاره شد، انجام گرفت و ترکیبات حاصل پس از استیله شدن توسط روش کروماتوگرافی گازی آنالیز شدند (Chaplin & Kennedy, 1994 and Aspinall & Ferrier, 1957 and zhao et al., 1956).

۸-۳-۳-۳ متیلاسیون

برای انجام متیلاسیون ۵ میلی گرم پلی ساکارید کاملاً خشک به داخل بالن ۲۵ میلی لیتری منتقل و ۱ میلی لیتر DMSO با سُرنگ شیشه ای به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰

دقیقه در دمای اتاق سونیکیت شد و مجدداً به آن (توسط سُرنگ شیشه ای) ۰/۴ میلی لیتر محلول متیل سولفینیل متیل سدیم اضافه شد. سپس ژل حاصل تحت فرآیند سونیکیت شدن در 25°C به مدت ۲۰ دقیقه به حالت مایع تبدیل شد.

در ادامه پس از افزودن ۰/۳ میلی لیتر یدید متیل خشک، مجدداً در دمای 25°C به مدت ۱۵ دقیقه تحت فرآیند سونیکیت قرار گرفت. مخلوط حاصل به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار کمی آب برای خنثی کردن متیل سولفینیل متیل سدیم مازاد، به آن اضافه گردید. پس از انتقال سوسپانسیون حاصل به لوله های سانتریفیوژی ۱۲ میلی لیتری، پلی ساکارید متیله شده موجود در سوسپانسیون توسط ۴ میلی لیتر کلروفرم استخراج شد و با استفاده از طیف سنج مادون قرمز مورد بررسی قرار گرفت. عدم پیک جذبی در نواحی مربوط به گروه هیدروکسیل (حدود 3420 cm^{-1}) نشانه کامل شدن فرآیند متیله کردن است.

محصولات متیله شده توسط اسید فُرمیک و محلول ۲ مولار اسید تری فلورو استیک هیدرولیز و پس از حذف اسید مازاد توسط بُروهیدرید سدیم خنثی شدند. آلدیتول های حاصل توسط مخلوط پیریدین - انیدرید استیک (نسبت مخلوط ۱ به ۱) در حمام آب 90°C به مدت ۱ ساعت استیله و به استات های آلدیتول مربوطه تبدیل شدند و در نهایت استات های آلدیتول پاره ای متیله شده توسط کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی مورد آنالیز قرار گرفتند.

کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی مورد استفاده مجهز به ستون موئینه کوارتزی HPS (۲۵ متر $\times$ ۰/۲۲ میلی متر $\times$ ۰/۲ میکرومتر) بود. دمای ستون در 120°C به مدت ۲ دقیقه ثابت ماند و سپس تا دمای 260°C (با نرخ 15°C بر دقیقه) افزایش یافت و به مدت ۴۰ دقیقه در همین دما نگهداری شد. سایر مشخصات مشابه با کروماتوگرافی گازی بود که در قسمت قبل برای شناسایی مونوساکاریدها مورد استفاده قرار گرفت (Chaplin & Kennedy, 1994 and Needs & Selvendran, 1993).

۳-۳-۳-۹ طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای

طیف های NMR پروتون و کربن - ۱۳ پلی ساکارید توسط طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای در ۵۰۰/۱۳ مگاهرتز برای NMR پروتون و ۱۲۵/۷۵ مگاهرتز برای NMR کربن - ۱۳ در دمای ۲۷°C ثبت شد. استاندارد مورد استفاده DSS و زمان بازداری ۲ ثانیه بود. مقداری از پلی ساکارید پس از اینکه در حلال بی اثر D₂O (۹۹/۹٪) بصورت محلول در آمد، در بین دو قطب مغناطیسی دستگاه قرار گرفت و تغییرات ایجاد شده در آن بوسیله دستگاه NMR در مقایسه با جسم استاندارد بصورت پیک هایی با ارتفاع های متفاوت ثبت و بررسی شد (Duenas -chasco et al., 1956).

فصل چہارم:

بحث و نتائج

۴ بحث و نتایج

۴-۱ استخراج، خالص سازی و شناسایی واحدهای سازنده پلی ساکارید

۴-۱-۱ استخراج و خالص سازی

راندمان استخراج پلی ساکارید ناخالص با آب داغ (75°C)، ۸/۲۱٪ بود. پس از خالص سازی پلی ساکارید خام با ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل سلولز و سفاکریل S-۴۰۰، ۱/۳۴٪ پلی ساکارید خالص (بی رنگ) حاصل شد. شکل (۴-۱) پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی را نشان می دهد. با توجه به اینکه مطالعات انجام شده روی پلی ساکارید صمغ درخت بادام کوهی کم است و در بررسی های انجام گرفته توسط سایر محققین تنها صمغ بررسی شده و پلی ساکارید آن مورد بررسی قرار نگرفته، بعلاوه در بررسی های انجام شده از صمغ کامل پس از پودر کردن استفاده شده و از روش های رایج استخراج و خالص سازی استفاده نشده است لذا نمی توان مقایسه جامعی از لحاظ راندمان حاصله از این پژوهش با سایر پژوهش های صورت گرفته ارائه داد.



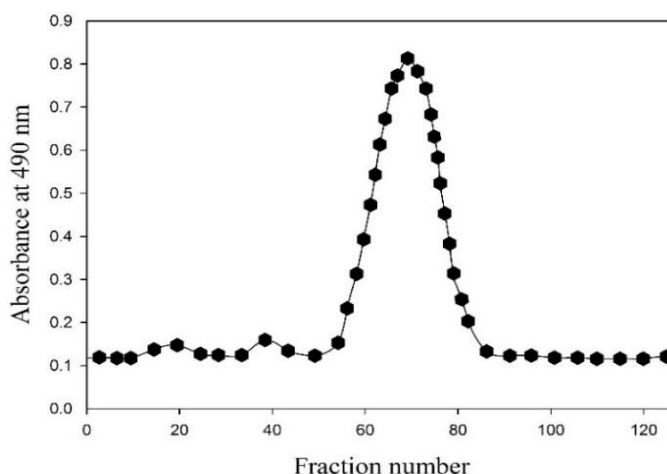
شکل (۴-۱): پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی.

پلی ساکارید خالص فاقد جذب در ناحیه ۲۸۰ نانومتر از طیف فرابنفش بود که بیانگر عدم حضور پروتئین و اسید نوکلئیک در ساختار پلی ساکارید خالص و انجام مناسب و کار آمد روش های خالص

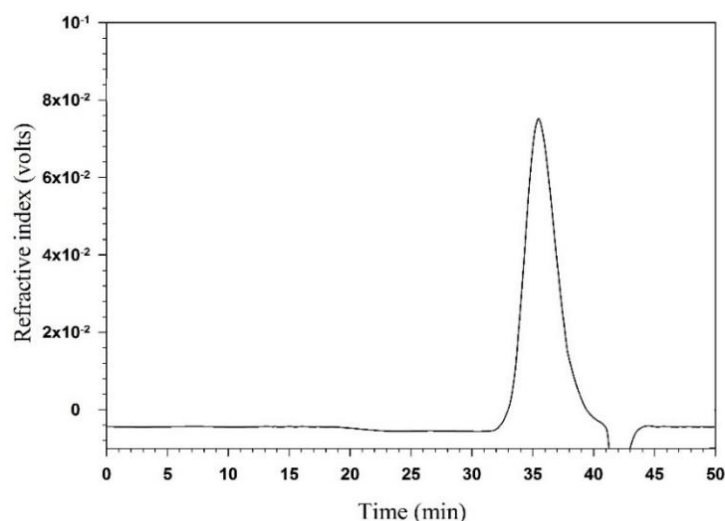
سازی استفاده شده در این پژوهش بود.

۲-۱-۴ تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص

همانطور که قبلاً اشاره شد برای تعیین همگنی و وزن مولکولی پلی ساکارید خالص، از ستون های سفاکریل S-۴۰۰ و کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا با استفاده از استانداردهای دکستران استفاده شد. منحنی پلی ساکارید خالص شسته شده از ستون کروماتوگرافی سفاکریل S-۴۰۰ دو پیک بسیار جزئی و یک پیک متقارن بزرگ را نشان داد (شکل ۲-۴) لذا فراکشن های شماره ۵۰ تا ۹۰ (پیک بزرگ متقارن) با یکدیگر ادغام و جهت تعیین وزن مولکولی توسط کروماتوگرافی غربال مولکولی با



شکل (۲-۴): منحنی پلی ساکارید خالص حاصل از جمع آوری فراکشنها پس از شستشو با ستون سفاکریل S-۴۰۰



شکل (۳-۴): کروماتوگرام پلی ساکارید خالص با استفاده از کروماتوگرافی غربال مولکولی با کارایی بالا.

کارایی بالا به همراه آشکارساز ضریب شکست نور مورد استفاده قرار گرفت.

همانطور که در شکل ۳-۴ دیده می شود پلی ساکارید خالص پیک منحصر به فرد و متفاوتی را نشان داد که بیانگر همگن بودن پلی ساکارید خالص است. با مقایسه منحنی های مربوط به پلی ساکارید خالص و منحنی استاندارد دکستران، وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی، $10^6 \times 4/86$ دالتون (4860 KDa) محاسبه شد که تقریباً مشابه با وزن مولکولی صمغ سفید رنگ ($10^6 \times 4/74$ Da) و بیشتر از وزن مولکولی نمونه های زرد ($10^6 \times 4/49$ Da) و قرمز رنگ ($10^6 \times 2/59$ Da) درخت بادام کوهی گزارش شده توسط فدوی و همکاران بود (Fadavi et al., 2014).

۲-۴ تعیین ساختار

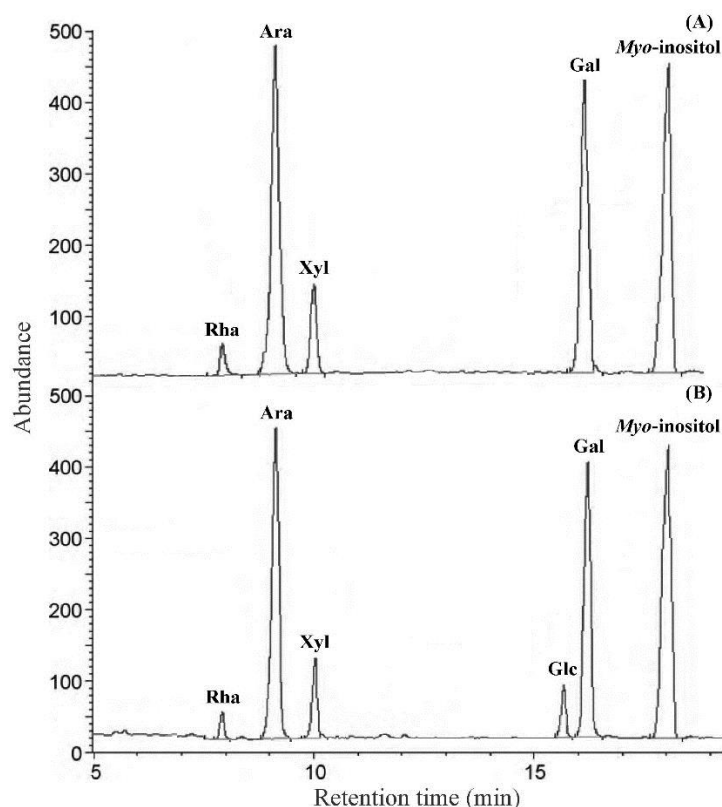
۱-۲-۴ تعیین درجه چرخش نوری

درجه چرخش نوری پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی، $+31/5^\circ$ در دمای $^\circ\text{C}$ ۲۰ توسط دستگاه پلاریمتر محاسبه شد. درجه چرخش نوری کمتر از $+100^\circ$ بیانگر وجود سهم بیشتر اتصالات نوع β نسبت به نوع α در ساختار کربوهیدرات ها است. لذا می توان نتیجه گرفت که واحدهای مونومری سازنده ساختار پلی ساکارید غالب حاصل از صمغ درخت بادام کوهی اکثراً از طریق اتصالات نوع β به یکدیگر متصل شده اند هر چند که اتصالات نوع α نیز در ساختار پلی ساکارید وجود دارد.

۲-۲-۴ تعیین قند کل و شناسایی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص

میزان قند کل پلی ساکارید خالص پس از اندازه گیری با روش فنل-اسید سولفوریک ۹۷/۶٪ تعیین شد که بیانگر درجه خلوص بسیار بالای پلی ساکارید استخراج شده و انجام خوب مراحل خالص سازی بود. برای تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید، پلی ساکارید کاملاً خالص توسط اسید تری فلورواستیک به واحدهای مونوساکاریدی سازنده خود هیدرولیز شد و پس از استیله شدن و تبدیل به استات های آلدیتول مربوط، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی آنالیز گردید. نتایج حاصل (شکل ۴-۴)

۴ A) نشان داد که پلی ساکارید کاملاً خالص از واحدهای مونومری رامنوز (Rha)، آرابینوز (Ara)، زایلوز (Xyl) و گالاکتوز (Gal)، به ترتیب با نسبت های مولی ۱/۱، ۲۰/۰، ۵/۲ و ۱۷/۹ تشکیل شده است.



شکل (۴-۴): طیف کروماتوگرام گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص (A) و پلی ساکارید خالص احیاء شده (B).

مقدار اسیدهای آرونیك با روش اسپكتروفوتومتري تعيين گرديد و نشان داد كه پلی ساكاريد خالص حاوی حدود ۶٪ اسید آرونیك است. لذا می توان نتیجه گرفت كه پلی ساكاريد خالص حاصل از صمغ درخت بادام كوهی از نوع اسیدی است.

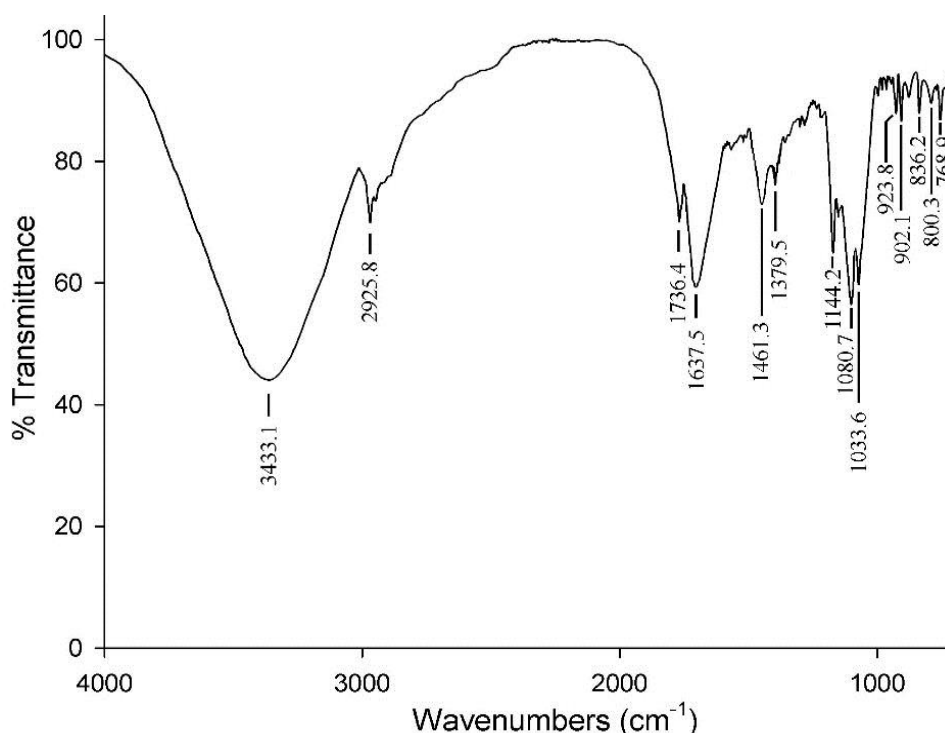
بمنظور تائید حضور اسید آرونیك در ساختار پلی ساكاريد خالص، پلی ساكاريد خالص توسط NaBH_4 احیاء شد كه در نتیجه آن تمام گروه های COOH به گروه های CH_2OH احیاء شدند سپس مجدداً توسط روش ذكر شده در بالا آماده و به دستگاه كروماتوگرافی گازی تزریق گرديد (شكل ۴-۴B). نتایج نشان داد كه پلی ساكاريد خالص احیاء شده از واحدهای مونومری رامنوز، آرابینوز، زایلوز، گلوکز

(Glc) و گالاکتوز، به ترتیب با نسبت های مولی ۱/۰، ۲۰/۳، ۴/۹، ۳/۱ و ۱۷/۸ تشکیل شده است. مقایسه بین ترکیب و نسبت واحدهای مونوساکاریدی تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص و پلی ساکارید خالص احیاء شده نشان می دهد که پلی ساکارید خالص حاوی حدود ۶/۶٪ گلوکز است که از اسید گلوکورونیک احیاء شده تولید شده است. نتایج حاصل از آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی ساکارید خالص نشان می دهد که آرابینوز و گالاکتوز مونومرهای اصلی سازنده پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی هستند و به احتمال زیاد در ساختار اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص قرار دارند. سایر واحدهای مونوساکاریدی مانند رامنوز، زایلوز و اسید گلوکورونیک از لحاظ مقدار در اولویت بعدی قرار دارند لذا می توان اینطور نتیجه گیری کرد که پلی ساکارید حاصل از نوع "آرابینو گالاکتان" است. بعلاوه پلی ساکارید حاصل به علت وجود واحدهای اسید گلوکورونیک، از نوع اسیدی است. بررسی ترکیب شیمیایی پلی ساکاریدهای اسیدی موجود در نمونه های سفید رنگ صمغ درخت بادام کوهی توسط فدوی و همکاران نشان داد که پلی ساکارید مذکور از نوع آرابینوگالاکتان بوده و از واحدهای مونوساکاریدی آرابینوز، رامنوز، زایلوز، اسید گلوکورونیک، مانوز، گالاکتوز و O-متیل-گلوکورونیک اسید به ترتیب با نسبت های مولی ۶۱/۱، ۱/۱، ۶/۸، ۰/۶، ۰/۳، ۲۸/۴ و ۱/۷ تشکیل شده است (Fadavi et al., 2014). بنابراین در بین واحدهای مونوساکاریدی پلی ساکاریدهای صمغ درخت بادام کوهی همانند پلی ساکارید خالص حاصل از این صمغ آرابینوز و گالاکتوز بالاترین و اسید گلوکورونیک و مانوز از کمترین سهم برخوردارند.

۴-۲-۳ طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص

طیف مادون قرمز جهت شناسایی گروه های عاملی موجود در ساختار پلی ساکارید حاصل از صمغ درخت بادام کوهی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴-۵). وجود یک پیک قوی در ناحیه $3433/1 \text{ cm}^{-1}$ و یک پیک ضعیف در ناحیه $2925/8 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب نشان دهنده گروه های هیدروکسیل متصل به اتم های کربن و اتصالات C-H کربن شماره ۶ قند است. جذب در ناحیه $1736/4 \text{ cm}^{-1}$ بیانگر وجود گروه

های کربوکسیل در ساختار پلی ساکارید خالص می باشد. این نتیجه با نتایج حاصل از آنالیز مونوساکاریدهای تشکیل دهنده پلی ساکارید خالص همخوانی داشت زیرا همانطور که قبلاً ذکر شد پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی حاوی ۶/۶٪ اسید گلوکورونیک بود.



شکل (۴-۵): طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی.

پیک پهن موجود در محدوده $1637/5 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده اتصالات آب پیوسته است. بعلاوه جذب در نواحی $1080/7$ و $1033/6 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به اتصالات الکلی C-O (C-O-H) و جذب در ناحیه $800/3 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده اتصالات اتری C-O (C-O-C) می باشد. باندهای موجود در نواحی $1144/2$ و $836/2 \text{ cm}^{-1}$ به ترتیب بیانگر وجود هر دو شکل کانفورماسیون آنومری آلفا (α) و بتا (β) در واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص است. جذب در نواحی $923/8$ و $800/3 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده وجود حلقه های فورانوزی و جذب در ناحیه $768/9 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به وجود حلقه های پیرانوزی در ساختار پلی ساکارید خالص می باشد. با جمع بندی اطلاعات ذکر شده از طیف مادون قرمز پلی ساکارید خالص می توان عنوان کرد که پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی از نوع اسیدی است و از

واحدهای مونوساکاریدی با اشکال پیرانوزی و فورانوزی به همراه هر دو نوع اتصالات آنومری آلفا (α) و بتا (β) تشکیل شده است.

۴-۲-۴ اکسیداسیون پریدوات و تجزیه اسمیت

نتایج مربوط به اکسیداسیون پریدوات نشان داد که ۵۷٪ مول پریدوات مصرف شد و در حدود ۲۹٪ مول اسید فرمیک تولید گردید. مقدار مصرف پریدوات در حدود ۲ برابر اسید فرمیک تولید شده بود که بیانگر وجود مقادیر زیادی از اتصالات نوع ($1 \rightarrow 6$) یا ($1 \rightarrow 1$) در ساختار پلی ساکارید خالص است. مقدار مصرف پریدوات (۵۷٪ مول) نشان می دهد که اتصالات ($1 \rightarrow 2$) و ($1 \rightarrow 4$) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود ندارد یا مقدار آنها بسیار بسیار کم است. مقدار اسید فرمیک تولید شده (۲۹٪ مول) نشان می دهد که اتصالات دیگری مانند ($1 \rightarrow 2$)، ($1 \rightarrow 4$)، ($1 \rightarrow 3$)، ($1 \rightarrow 3, 6$)، ($1 \rightarrow 2, 3$)، ($1 \rightarrow 3, 4$) و ($1 \rightarrow 3, 6$) ممکن است در ساختار پلی ساکارید خالص وجود داشته باشند زیرا اتصالات ذکر شده قادر به تولید اسید فرمیک نیستند. با جمع بندی نتایج حاصل از این مرحله می توان استنباط کرد که در حدود ۲۹٪ از ساختار پلی ساکارید خالص دارای اتصالات نوع ($1 \rightarrow 6$) یا ($1 \rightarrow 1$) است، اتصالات نوع ($1 \rightarrow 2$) و ($1 \rightarrow 4$) و مشتقات آنها احتمالاً در ساختار پلی ساکارید خالص وجود ندارند و در حدود ۷۱٪ از اتصالات موجود در ساختار را اتصالاتی مانند ($1 \rightarrow 3$) و ($1 \rightarrow 3, 6$) تشکیل می دهند. آنالیز کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریدوات کاملاً هیدرولیز شده نشان دهنده وجود یا حضور گالاکتوز و آرابینوز و عدم حضور زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک بود (جدول ۴-۱). حضور آرابینوز و گالاکتوز بیانگر این است که برخی از واحدهای مونومری نام برده دارای اتصالاتی مانند ($1 \rightarrow 3$)، ($1 \rightarrow 2, 3$)، ($1 \rightarrow 2, 4$)، ($1 \rightarrow 3, 4$)، ($1 \rightarrow 3, 6$) و ($1 \rightarrow 2, 3, 4$) هستند که نمی توانند اکسید شوند. عدم حضور زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک نشان می دهد که تمامی واحدهای مونوساکاریدی نامبرده در ساختار پلی ساکارید خالص حاوی اتصالاتی هستند که توسط پریدوات اکسید می شوند مانند ($1 \rightarrow 1$)، ($1 \rightarrow 6$)، ($1 \rightarrow 2$)، ($1 \rightarrow 2, 6$)، ($1 \rightarrow 4$) و ($1 \rightarrow 4, 6$). عدم حضور اریتریتول

در محصولات حاصل از پریودات بیانگر عدم وجود اتصالات نوع (۱→۴) و (۱→۴,۶) در ساختار پلی ساکارید خالص و حضور گلیسرول و اسید گلیسریک^۱ (تولید شده از اسید گلوکورونیک) بیانگر وجود اتصالات نوع (۱→۶) و (۱→) در ساختار پلی ساکارید خالص است.

جدول (۱-۴): نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی.

فراکشن ها	نسبت های مولی						
	گلیسرول	اسید گلیسریک	آرابینوز	زایلوز	گالاکتوز	رامنوز	اسید گلوکورونیک
محصولات اکسیداسیون پریودات							
هیدرولیز کامل اسیدی	۰/۱۹	۰/۱۴	۱/۰۰	_____	۰/۶۹	_____	_____
تجزیه اسمیت							
بیرون کیسه دیالیز	۰/۱۵	۰/۱۱	_____	_____	_____	_____	_____
روی کیسه دیالیز	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
رسوب در کیسه دیالیز	_____	_____	۱/۰۰	_____	۰/۷۱	_____	_____

آنالیز محصولات رسوب کرده در کیسه دیالیز نشان دهنده وجود گالاکتوز و آرابینوز بود که بیانگر این واقعیت است که اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص توسط پریودات کاملاً اکسید نشده است. لذا از جمع بندی نتایج این مرحله می توان عنوان نمود که ساختار اسکلت اصلی پلی ساکارید خالص حاصل از درخت بادام کوهی حاوی واحدهای گالاکتوز و آرابینوز با اتصالاتی مانند (۱→۳) و (۱→۳,۶) است که نمی توانند توسط پریودات اکسید شوند.

۴-۲-۵ متیله کردن

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی حضور ۷ پیک متفاوت را نشان داد. این پیک ها پس از شناسایی با طیف سنج جرمی به به شرح زیر هستند:

^۱ Glyceric Acid

۵، ۲ - دی متیل آرابینوز، ۴، ۳، ۲ - تری متیل گالاکتوز، ۴، ۲ - دی متیل گالاکتوز، ۶، ۴، ۲ - تری متیل گالاکتوز، ۴، ۳، ۲ - تری متیل زایلوز، ۴، ۳، ۲ - تری متیل رامنوز و ۶، ۴، ۳، ۲ - تترا متیل گلوکز که به ترتیب با نسبت های مولی ۱۹/۸۹، ۳/۹۳، ۹/۲۱، ۵/۱۰، ۵/۰۵، ۰/۹۷ و ۲/۸۶ (حدود ۲۰، ۴، ۹، ۵، ۵، ۱ و ۳) در ساختار پلی ساکارید خالص وجود داشتند (جدول ۴-۲).

جدول (۴-۲): نتایج کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی پلی ساکارید خالص متیله شده.

نوع اتصال	(m/z) فراگمنت های جرمی	نسبت مولی	قند متیله شده
→3)-Araf-(1→	۴۳، ۵۹، ۷۱، ۱۰۱، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۷۴، ۲۰۱، ۲۳۳	۱۹/۸۹	2,5-Me ₂ -Ara
→6)-Galp-(1→	۴۳، ۷۱، ۱۰۱، ۱۲۹، ۱۶۱، ۱۸۹، ۲۳۳	۳/۹۳	2,3,4-Me ₃ -Gal
→3,6)-Galp-(1→	۴۳، ۸۷، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۸۹	۹/۲۱	2,4-Me ₂ -Gal
→3)-Galp-(1→	۴۳، ۴۵، ۸۷، ۱۰۱، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۶۱	۵/۱۰	2,4,6-Me ₃ -Gal
Xylp-(1→	۴۳، ۱۰۱، ۱۱۷، ۱۶۱	۵/۰۵	2,3,4-Me ₃ -Xyl
Rhap-(1→	۴۳، ۸۷، ۱۰۱، ۱۲۹، ۱۴۳، ۱۸۹، ۲۰۳	۰/۹۷	2,3,4-Me ₃ -Rha
GlcA-(1→	۱۰۱، ۱۱۷، ۱۲۹، ۱۶۱، ۱۸۹، ۲۳۳	*۲/۸۶	2,3,4,6-Me ₄ -Glc

*محاسبه شده از آنالیز مونوساکاریدهای فراکشن احیاء شده

نسبت های مولی حاصل از آزمون متیله کردن با نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی واحدهای مونومری سازنده پلی ساکارید خالص مطابقت داشت. بعلاوه نتایج حاصل با نتایج مربوط به اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت سازگاری داشت و بیانگر سهم بالای آرابینوز با اتصال (۱→۳) و گالاکتوز با اتصالات (۱→۳) و (۱→۳، ۶) در ساختار پلی ساکارید خالص است. نسبت مولی گالاکتوز با اتصال (۱→۳، ۶) که نقطه انشعاب را نشان می دهد تقریباً مشابه با مجموع نسبت های مولی زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک با اتصال (۱→) است که در انتهای شاخه های جانبی به عنوان واحد مونومری غیر احیاء کننده قرار گرفته اند. لذا می توان استنباط کرد که شاخه های جانبی پلی ساکارید خالص حاصل

از صمغ درخت بادام کوهی تماماً توسط واحدهای مونومری زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک به انتها می‌رسند. عدم قرارگیری گروه متیل بر روی کربن شماره ۵ واحدهای مونومری گالاکتوز، زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک نشان می‌دهد که تمام واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده دارای ساختار حلقه‌های ۶ ضلعی (پیرانوزی) بوده و قرارگیری گروه متیل بر روی کربن شماره ۵ آرابینوز نشان دهنده ساختار حلقه‌های ۵ ضلعی (فورانوزی) در آنهاست.

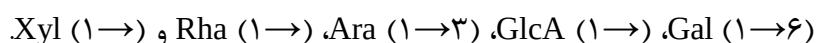
۴-۲-۶ هیدرولیز ناقص اسیدی

همانطور که قبلاً در بخش مواد و روش‌ها (فصل ۳) اشاره شد چهار فراکشن پلی‌ساکارید ۱ (رسوب پس از هیدرولیز)، پلی‌ساکارید ۲ (رسوب در کیسه دیالیز)، پلی‌ساکارید ۳ (سیال رویی در کیسه دیالیز) و پلی‌ساکارید ۴ (فراکشن بیرون از کیسه دیالیز) پس از انجام هیدرولیز ناقص اسیدی از پلی‌ساکارید خالص بازیافت و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (پس از هیدرولیز کامل توسط اسید تری فلورواستیک) آنالیز شدند. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی (جدول ۴-۳) نشان داد که گالاکتوز و آرابینوز موجود در پلی‌ساکارید ۱ و ۲ سازنده اسکلت اصلی ساختار پلی‌ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی است. آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده پلی‌ساکارید ۳ و ۴ بیانگر حضور گالاکتوز، زایلوز، آرابینوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از آرابینوز و گالاکتوز و تمام زایلوز، رامنوز و اسید گلوکورونیک تشکیل دهنده اجزای مونومری شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید خالص هستند.

جدول (۴-۳): نتایج کروماتوگرافی گازی محصولات حاصل از هیدرولیز ناقص اسیدی پلی‌ساکارید خالص.

فراکشن‌ها	نسبت‌های مولی				
	گالاکتوز	زایلوز	آرابینوز	رامنوز	گلوکورونیک اسید
پلی‌ساکارید ۱	۱/۳۸	—	۱/۰۰	—	ناچیز
پلی‌ساکارید ۲	۱/۴۱	—	۱/۰۰	—	—
پلی‌ساکارید ۳	۰/۴۱	۰/۴۸	۱/۰۰	۰/۰۹	۰/۲۷
پلی‌ساکارید ۴	۰/۳۹	۰/۴۶	۱/۰۰	۰/۱۱	۰/۳۳

این نتایج با نتایج حاصل از متیلاسیون و اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت مطابقت داشت. جهت پی بردن به نوع سکانس واحدهای مونومری تشکیل دهنده شاخه های جانبی و پیوند بین آنها پلی ساکارید ۳ و ۴ با هم ادغام و مجدداً توسط ستون کروماتوگرافی سفادکس جی-۲۵ شسته و تفکیک شدند. ۳ فراکشن در نتیجه شستشوی ستون حاصل شد که پس از آنالیز واحدهای مونوساکاریدی سازنده مشخص شد که فراکشن های ۱، ۲ و ۳ حاوی واحدهای مونومری سازنده رامنوز، زایلوز، آرابینوز، گالاکتوز و اسید گلوکورونیک به ترتیب با نسبت های مولی (۰/۹۸ : ۳/۴۱ : ۷/۰۲ : ۱/۹۹ : ۱/۰۳)، (۰/۱۴ : ۳/۱۱)، (۰/۲۹ : ۴/۳۳ : ۱/۲۰) و (۱/۰۴ : ۱/۱۳ : ۰/۲۵ : ۶/۲۵ : ۵/۱۹) هستند. با توجه به نتایج آنالیز متیلاسیون نوع اتصال بین واحدهای مونومری به صورت زیر بود:

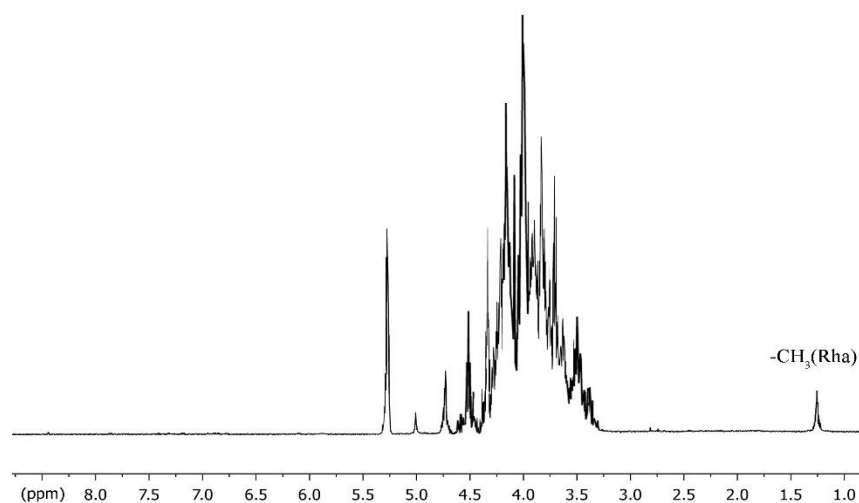


با توجه به نسبت های حاصل از هر سه فراکشن می توان پی برد که نسبت بین آرابینوز و زایلوز در هر سه فراکشن ثابت است لذا به احتمال زیاد شاخه های جانبی حاوی آرابینوز، توسط زایلوز به اتمام می رسد. بنابراین ساختار یکی از شاخه های جانبی می تواند بصورت $Ara (1 \rightarrow) Ara (1 \rightarrow 3) Ara (1 \rightarrow 3)$ باشد. بخلاف نسبت مجموع رامنوز و اسید گلوکورونیک در هر سه فراکشن تقریباً برابر با نسبت گالاکتوز است لذا اینطور نتیجه گیری می شود که نصف شاخه های حاوی گالاکتوز توسط اسید گلوکورونیک و نصف دیگر توسط رامنوز به انتها می رسد بنابراین ساختار شاخه های جانبی دیگر پلی ساکارید می تواند بصورت $Gal (1 \rightarrow) GlcA (1 \rightarrow 6) Gal (1 \rightarrow 6) Rha (1 \rightarrow 6)$ باشد.

۴-۲-۷ طیف رزونانس مغناطیس هسته های پروتون و کربن

الف) طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص

با توجه به شکل (۴-۶) وجود سیگنال در نواحی ۴/۴۸، ۴/۵۴، ۴/۵۶، ۴/۵۷، ۴/۷۱، ۵/۰۳ و ۵/۲۷ ppm به ترتیب نشان دهنده پروتون های آنومری β -D-GlcA، β -D-Gal، β -D-Xyl، α -L-Rha و -Ara است.



شکل (۴-۶): طیف NMR پروتون پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی.

سیگنال های مربوط به ناحیه ۱/۲۵ ppm مشخصه هیدروژن های متصل به کربن شماره ۶ Rha-

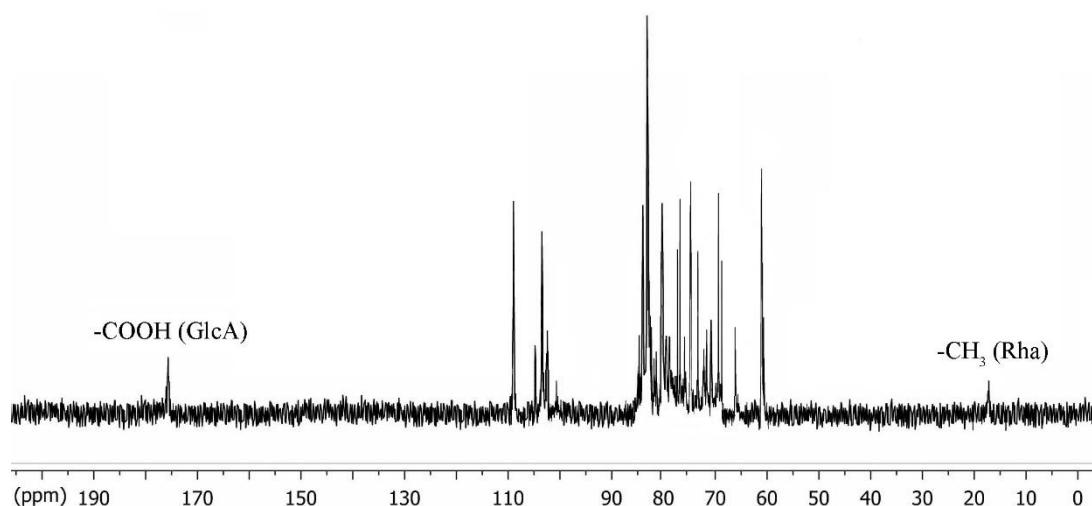
α -L است. سیگنال های مربوط به پروتون های متصل به سایر کربن ها در جدول (۴-۴) آمده است.

جدول (۴-۴): مقادیر جابجایی شیمیایی NMR پروتون پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی.

واحدهای قندی	δ (ppm) جابجایی شیمیایی					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
$\rightarrow 3$)- α -L-Araf-(1 $\rightarrow$	۵/۲۷	۴/۳۶	۳/۹۶	۴/۲۱	۳/۷۰	—
$\rightarrow 6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	۴/۵۷	۳/۵۱	۳/۶۵	۳/۹۰	۳/۸۹	۳/۷۸
$\rightarrow 3,6$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	۴/۵۶	۳/۷۶	۳/۸۵	۴/۱۸	۳/۹۱	۳/۷۹
$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 $\rightarrow$	۴/۵۴	۳/۷۷	۳/۸۶	۴/۱۹	۳/۷۲	۳/۶۴
β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$	۴/۷۱	۳/۳۴	۳/۴۸	۳/۶۱	۳/۷۵	—
α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$	۵/۰۳	۴/۱۴	۳/۷۶	۳/۴۵	۴/۰۱	۱/۲۵
β -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$	۴/۴۸	۳/۳۱	۳/۴۶	۳/۵۰	۳/۷۷	—

(ب) طیف NMR کربن- 13 پلی ساکارید خالص

شکل (۷-۴) سیگنال های مربوط به کربن های پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی را نشان می دهد.



شکل (۷-۴): طیف NMR کربن- 13 پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی.

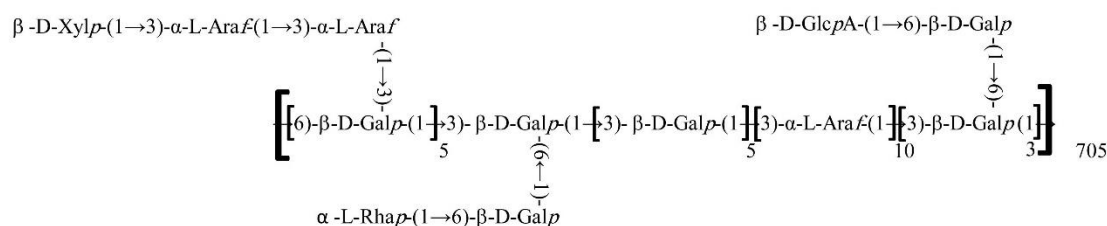
وجود سیگنال در نواحی ۱۰۴/۱، ۱۰۴/۳ و ۱۰۴/۶ ppm بیانگر کربن های آنومری β -D-Galp است. سیگنال در نواحی ۱۰۳/۶ و ۱۰۴/۲ ppm به ترتیب نشان دهنده β -D-Xylp و β -D-GlcpA است. سیگنال در ۱۰۱/۵ ppm کربن آنومری α -L-Rhap را نشان می دهد. علت شناسایی آنومرهای بتا (β) در واحدهای مونومری ذکر شده این است که کربن آنومری فرم آلفا (α) واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده در محدوده ۱۰۱-۱۰۰ ppm ظاهر می شود. بعلاوه تمام واحدهای مونوساکاریدی ذکر شده دارای اشکال پیرانوزی هستند زیرا سیگنال کربن شماره ۱ اشکال فورانوزی قندها در محدوده ۱۱۰-۱۰۵ ppm ظاهر می شود لذا وجود سیگنال آنومری در ناحیه ۱۰۹/۱ ppm بیانگر این واقعیت است که واحدهای آرابینوز به صورت اشکال فورانوزی در ساختار پلی ساکارید خالص قرار دارند. نتایج حاصل از این مرحله با نتایج حاصل از مراحل متیله کردن و FTIR همخوانی داشت. مشاهده سیگنال در نواحی (۶۸/۷ و ۶۸/۵ ppm) و (۸۲/۷ و ۸۳/۱ ppm) به ترتیب کربن های شماره ۶ و ۳ β -D-Galp را در نقاط

اتصال نشان می دهد. بعلاوه وجود سیگنال در ناحیه ۸۳/۲ ppm مربوط به کربن شماره ۳ α -L-Araf در نقطه تشکیل پیوند است. وجود سیگنال در نواحی ۱۷/۳ و ۱۷۶/۳ ppm به ترتیب بیانگر کربن های شماره ۶ α -L-Rhap و β -D-GalpA است. لذا وجود رامنوز و اسید گلوکورونیک مجدداً اثبات گردید. سیگنال های مربوط به سایر کربن های واحدهای قندی در جدول ۴-۵ آمده است.

جدول (۴-۵): مقادیر جابجایی شیمیایی NMR کربن-۱۳ پلی ساکارید خالص صمغ درخت بادام کوهی.

واحدهای قندی	δ (ppm) جابجایی شیمیایی					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -L-Araf-(1 $\rightarrow$ 3)-	۱۰۹/۱	۸۰/۰	۸۳/۲	۸۵/۶	۶۱/۹	—
β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 6)-	۱۰۴/۶	۷۱/۷	۷۳/۶	۶۹/۹	۷۲/۷	۶۸/۵
β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3,6)-	۱۰۴/۱	۷۲/۵	۸۲/۷	۶۹/۷	۷۴/۲	۶۸/۷
β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-	۱۰۴/۳	۷۲/۶	۸۳/۱	۶۹/۹	۷۶/۰	۶۱/۹
β -D-Xylp-(1 $\rightarrow$ 3)-	۱۰۳/۶	۷۴/۲	۷۷/۱	۷۱/۴	۶۶/۵	—
α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)-	۱۰۱/۵	۷۱/۰	۷۱/۴	۷۲/۴	۶۹/۳	۱۷/۳
β -D-GlcpA-(1 $\rightarrow$ 3)-	۱۰۴/۲	۷۳/۸	۷۵/۹	۷۳/۸	۷۷/۱	۱۷۶/۳

با جمع بندی نتایج حاصل از طیف سنج مادون قرمز، تعیین واحدهای مونوساکاریدی سازنده، درجه چرخش نوری، هیدرولیز ناقص اسیدی، اکسیداسیون پرپودات و تجزیه اسمیت، آنالیز متیله کردن همراه با نتایج حاصل از طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته های پروتون و کربن، ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی به شکل ۴-۸ می باشد.



شکل ۴-۸: ساختار پیشنهادی پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی.

نتیجه گیری

در این پژوهش پلی ساکارید خام حاصل از صمغ های سفید رنگ درخت بادام کوهی پس از فرآیند استخراج توسط آب داغ 75°C ، پروتئین زدایی به روش سواگ و ترسیب با اتانول با استفاده از ستون های کروماتوگرافی دی اتیل آمینو اتیل – سلولز و سفاکريل S-۴۰۰ خالص سازی شد. پلی ساکارید خالص حاوی ۹۷/۶٪ قند و فاقد پروتئین بود. میانگین وزن مولکولی پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی $10^6 \times 4/86$ و پیک آن کاملاً متقارن و همگن بود.

آنالیز مونوساکاریدهای سازنده پلی ساکارید خالص نشان داد که واحدهای مونومری رامنوز، آرابینوز، زایلوز، اسید گلوکورونیک و گالاکتوز به ترتیب با نسبت های مولی حدود ۱، ۲۰، ۵، ۳، ۱۸ ساختار پلی ساکارید خالص را تشکیل می دهند.

ساختار پلی ساکارید خالص با استفاده از ترکیبی از روش های شیمیایی و دستگاهی مانند متیله کردن، اکسیداسیون پریودات و تجزیه اسمیت، هیدرولیز ناقص اسیدی، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، طیف سنج مادون قرمز، طیف سنج رزونانس مغناطیس هسته ای و تعیین درجه چرخش نوری بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که آرابینوز و گالاکتوز مونومرهای اصلی سازنده پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی هستند که به ترتیب با اتصالات $\beta(1\rightarrow3)$ و $\beta(1\rightarrow3,6)$ در ساختار اسکلت اصلی قرار می گیرند و زنجیره اصلی در نقاط کربن شماره ۳ و ۶ گالاکتوز دارای انشعاب است. بخشی از مونوساکاریدهای گالاکتوز با اتصالات $\beta(1\rightarrow6)$ و آرابینوز با اتصالات $\alpha(1\rightarrow3)$ و تمام

مونومرهای β زایلوز، α رامنوز و اسید β گلوکورونیک در ساختار شاخه های جانبی پلی ساکارید خالص حضور دارند. شاخه های جانبی حاوی آرابینوز توسط مونوساکاریدهای غیر احیاء کننده β زایلوز و نیمی از شاخه های جانبی حاوی گالاکتوز توسط مونومرهای اسید β گلوکورونیک و نیم دیگر با واحدهای غیر احیاء کننده α رامنوز به انتها می رسند. به غیر از آرابینوفورانوز مابقی واحدهای مونومری به شکل پیرانوزی بودند.

همانطور که در بخش کلیات بحث شد، شناسایی ساختار پلی ساکاریدها از اهمیت ویژه ای برخوردار است زیرا نوع ساختار این ترکیبات بر روی نقش و عملکرد آنها تأثیر بسزایی دارد. با توجه به اینکه ساختار پیشنهادی برای پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی دارای درجه بالایی از انشعاب است می توان چنین استنباط کرد که این پلی ساکارید نسبت به همتایان خطی خود با وزن مولکولی برابر و غلظت یکسان در آب محلولترند و باعث تولید محلول های چسبناکتری می شوند. بنابراین برخلاف پلی ساکاریدهای خطی خنثی که قادر به تشکیل فیلم های مطلوب بر روی سطوح خشک هستند، پلی ساکاریدهای منشعب حاصل از صمغ درخت بادام کوهی به دلیل درگیر شدن وسیع زنجیره های جانبی آنها می توانند به منظور تثبیت امولسیون، احتباس آب و بهبود بافت و ... در فرمولاسیون بسیاری از ترکیبات از جمله مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. بعلاوه پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی به علت وزن مولکولی بالا و حضور گروه های کربوکسیل در ساختار خود می تواند به عنوان یک عامل فلوکاسیون از ایجاد اجتماع های بین مولکولی جلوگیری کند. در نهایت با توجه به اینکه پلی ساکارید خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی از نظر ساختار کانفورماسیونی یک هتروگلیکان از نوع نامتناوب است و این نوع ساختارها از نظر عملکردهای بیولوژیکی مهم تلقی می شوند، پیشنهاد می شود بر روی انواع فعالیت های بیولوژیکی پلی ساکاریدهای خالص حاصل از صمغ درخت بادام کوهی مانند خاصیت آنتی اکسیدانی، آنتی توموری، آنتی ویروسی، ضد انعقاد و ... بررسی بیشتری صورت گیرد.

فهرست منابع

۱. جعفر نژاد ا، (۱۳۹۰)، "مجموعه اصول بیوشیمی لنینجر (ساختمان و متابولیسم کربوهیدرات ها)"، جلد ۴، چاپ اول، انتشارات جعفری، تهران.
۲. جهان بین ک، (۱۳۹۰)، رساله دکتری: "استخراج و خالص سازی یک پلی ساکارید جدید از ریشه های گیاه چوبک تماشایی"، دانشگاه تهران.
۳. خالصی ه،، علیزاده م. و رضا زاد م، (۱۳۹۱)، "بررسی ویژگی های فیزیکیوشیمیایی و عملکردی صمغ زدو تراوش شده از گیاه (*Amygdalus scoparia* spach)"، نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی / ایران، جلد ۸، شماره ۳، ص ۳۲۶ - ۳۱۷.
۴. خانوی م،، حاجی آخوندی ع،، امین غ. و شمس اردکانی م، (۱۳۸۹)"نگرشی بر جاذبه های گیاهان دارویی در ایران و جهان"، فصلنامه طب سنتی / اسلام و ایران، شماره ۱، ص ۵۸ - ۵۵.
۵. خرمی ب، (۱۳۸۵)، "زدو - صمغ فارسی"، ماهنامه دام، کشت و صنعت، جلد ۷، شماره ۸۰، ص ۲۳.
۶. دهقانی شورکی ی،، رحمانی ا. و جایمند ک، (۱۳۸۵)، "مطالعه مقدماتی رشد و توسعه مجاری مولد رزین در نهال های یکساله گیاه پسته وحشی"، فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر / ایران، جلد ۱۴، شماره ۲، ص ۹۹ - ۹۲.
۷. رحیمی س،، عباسی س،، سحری م. و عزیزی م، (۱۳۹۲)، "جداسازی و تعیین برخی ویژگی های شیمیایی و کاربردی بخش های محلول و نامحلول صمغ تراوشی درخت بادام کوهی (صمغ فارسی)"، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۰، ص ۱-۱۰.
۸. صمصام شریعت س، (۱۳۸۶)، "عصاره گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی"، چاپ دوم، انتشارات مانی.
۹. عباسی ش،، افشار زاده س. و مهاجری ع، (۱۳۹۱)، "معرفی گونه های گیاهی با خواص دارویی"، فصلنامه داروهای گیاهی، شماره ۳، ص ۱۵۶ - ۱۴۷.
۱۰. عماد م، (۱۳۷۹)، "شناسایی گیاهان دارویی و صنعتی جنگلی و مرتعی و موارد مصرف آنها"، جلد پنجم، چاپ اول، انتشارات مؤسسه توسعه روستایی.
۱۱. مظفریان و، (۱۳۸۳)، "درختان و درختچه های ایران"، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ص ۶۶۱.
۱۲. مظفریان و، (۱۳۷۵)، "فرهنگ نامهای گیاهان ایران"، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران.

13. Abbasi, S., & Mohammadi, S. (2013). Stabilization of milk–orange juice mixture using Persian gum: Efficiency and mechanism. *Food Bioscience*, **2**, 53-60.
14. Angyal, S. J. (1969). "The composition and conformation of sugars in solution." *Angewandte Chemie International Edition in English* **8.3**, 157-166.
15. Anatole, S. & Marchessault, R. H. (1967). "Crystalline structure of amylose triacetate I. Stereochemical approach." *Journal of the American Chemical Society* **89.25**, 6454-6462.
16. Aspinall, G. O. (1972). "*The Polysaccharides I*." Academic Press, New York.
17. Aspinall, G. & Ferrier, R. (1957). "A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrates." *Chemical Industry* (London), **7**, 1216 - 1221.
18. Bagchi, S. & Jayaram Kumar, K. (2016). "Studies on water soluble polysaccharides from *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth seeds." *Carbohydrate Polymers*, **138**, 215-221.
19. Barton, D. H. R. (1953). "The stereochemistry of cyclo hexane derivatives." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1027-1040.
20. Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). "*Food Chemistry*." Fourth Edition. Springer-Verlag, New York.
21. Berg, J. M., Tymosko, J. L. & Stryer, L. (2012). "*Biochemistry*." Seventh Edition. W. H. Freeman and Company New York.
22. Bender, H. (1986). "Production, characterization and applications of cyclodextrins." *Advanced Biotechnology Processes*, **6**, 31–71.
23. Bochkov, A. F. & Zaikov, G. E. (1979). "*Chemistry of the O-Glycosidic Bond: Formation and Cleavage*." Pergamon Press, Oxford.
24. Bouaziz, F., Koubaa, M., Clarie, B., Kallel, F., Driss, D., Kacem, I., Ghorbel, R. & Chaabouni, S. (2015). "Purification, structural data and biological properties of polysaccharide from *Prunus amygdalus* gum." *International Journal of Food Science & Technology*, **50**, 578-584.
25. Butterworth, Roger F., and Stephen Hanessian. (1971). "Tables of the properties of deoxy sugars and their simple derivatives." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **26**, 279-296.
26. Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F. (1994). "*Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*." New York: Oxford University Press.

27. Chanamai, R. A. D. J. M., & McClements, D. J. (2002). "Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: influence of pH, CaCl_2 and temperature." *Food Science*, **67**(1), 120–125.
28. Cui, S. W. (2005). *"Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and application."* CRC press, New York.
29. Carraher, C. E. (2000). *"Seymour/Carraher's Polymer Chemistry."* New York: Marcel Dekker, 52–95.
30. Deman, J. (1999). *"Principles of Food Chemistry."* Springer-Verlag, New York.
31. Dey, P. M. & Haborne, J. B. (1990). *"Methods in plant biochemistry."* Academic Press, New York.
32. Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." *Food Hydrocolloids*, **17**(1), 25–39.
33. Dickinson, E. (2009). "Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers." *Food Hydrocolloids*, **23**(6), 1473–1482.
34. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry*, **28**(3), 350–356.
35. Dueñas-Chasco, M.T., Rodríguez-Carvajal, M.A., Mateo, P.T., Franco- Rodríguez, G., Espartero, J., Irastorza-Iribas, A. & Gil-Serrano, A.M. (1997). "Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus*." *Carbohydrate research*, **303**(4), 453–458.
36. Eliasson, A. C. (2006). *"Carbohydrates in food."* CRC press, New York.
37. El Khadem, H. S. (1988). *"Carbohydrate Chemistry; Monosaccharides and Their Oligomers."* Academic Press, San Diego.
38. Fadavi, G., Mohammadifar, M. A., Zargarran, A., Mortazavian, A. M., & Komeili, R. (2014). Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from *Amygdalus scoparia*. *Carbohydrate polymers*, **101**, 1074-1080.
39. Figueira, A., Janick, J., & BeMiller, J.N. (1994). "Partial characterization of cacao pod and stem gums." *Carbohydrate Polymers*, **24**, 133, 1994.
40. Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C. (1991). "Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars." *Analytical biochemistry*, **197**(1), 157-162.
41. Garleb, K. A., Bourquin, L. D., & Fahey, G. C. Jr. (1989). "Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: a comparison of hydrolytic procedures and use of anion-exchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric

- detection of monosaccharides." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 1287–1293.
42. Golkar, A., Nasirpour, A., & Keramat, J. (2015). β -lactoglobulin-Angum gum (Amygdalus Scoparia Spach) complexes: Preparation and emulsion stabilization. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **36**(5), 685-694.
43. Hakomori, S. (1964). "A rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethylsulfoxide." *Journal of Biochemistry* (Tokyo), **55**, 205–208.
44. Harris, P., Morrison, A., & Dacombe, C. (1995). "A practical approach to polysaccharide analysis." Stephan, A. M., Ed. *Food Polysaccharides and Their Application*. 463–500. New York, Marcel Dekker Inc.
45. Harris, P., Dyks, S.J., Ingram, A.J., & Morrison, A. (1984). "The use of amyloglucosidase in polysaccharide analysis, in *Gums and Stabilisers for the Food Industry 2*." Phillips, G.O., Wedlock, D.J., and Williams, P.A., Eds., Pergamon Press, Oxford, 21–31.
46. Hashtjin, A. M., & Abbasi, S. (2015). Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocolloids*, **44**, 40-48.
47. Hassel, O. and Ottar, B. (1947). *Acta Chemistry Scandinavia*, **1**, 929.
48. Hay, G. W., Lewis, B. A., & Smith, F. (1965). "Determination of the average chain length of polysaccharides." *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **5**, 377–380.
49. Heinze, T. (2005). "*polysaccharides I: structure, characterisation and use*." Springer-Verlag, New York.
50. Hu, H., Liang, H. & Wu, Y. (2015). "Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from *Acanthopanax brachypus*." *Carbohydrate Polymers*, **127**, 94-100.
51. Hu, P., Li, Z., Chena, M., Suna, Z., Lingc, Y., Jiangb, J. & Huang, H. (2016). "Structural elucidation and protective role of a polysaccharide from *Sargassum fusiforme* on ameliorating learning and memory deficiencies in mice." *Carbohydrate Polymers*, **139**, 150-158.
52. Islam, A. M., Phillips, G. O., Sljivo, A., Snowden, M. J., & Williams, P. A. (1997). "A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic." *Food Hydrocolloids*, **11**(4), 493–505.
53. Jafari, S. M., Beheshti, P., & Assadpour, E. (2013). Emulsification properties of a novel hydrocolloid (Angum gum) for d-limonene droplets compared with Arabic gum. *International journal of biological macromolecules*, **61**, 182-188.

54. Jahanbin, K., Gohari, A. R., Moinic, S., Emam-Djomehc, Z. & Masi, P. (2011). "Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a new water-soluble polysaccharide from *Acanthophyllum bracteatum* roots." *International Journal of Biological Macromolecules*, **49**(4), 567-572.
55. Jin, M., Zhao, K., Huang, Q., Xua, C. & Shanz, P. (2012). "Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review." *Carbohydrate Polymers*, **89**(3), 713-722.
56. Kang, J., Cui, S. W., Guo, Q., Chen, J., Wang, Q., Phillips, G. O., & Nikiforuk, J. (2012). Structural investigation of a glycoprotein from gum ghatti. *Carbohydrate Polymers*, **89**(3), 749–758.
57. Lapasin, R. & Pricl, S. (1995). "Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications." Springer-Science+Business Media, B.V.
58. Li, J.-M. & Nie, S.-P. (2016). "The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods." *Food Hydrocolloids*, **53**, 46-61.
59. Lindberg, B. L., Lönnngren, J., & Svensson, S. (1975). "Specific degradation of polysaccharides." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **31**, 185–240.
60. Lim, J. D., Yu, C. Y., Kim, S. H. & Chung, I. M. (2016). "Structural characterization of an intestinal immune system-modulating arabino-3,6-galactan-like polysaccharide from the above-ground part of *Astragalus membranaceus* (Bunge)." *Carbohydrate Polymers*, **136**, 1265-1272.
61. Martinez, M., Pinto, G. L. D., Sanabria, L., Beltnin, O., Igartuburu, J. M. & Bahsas, A. (2003). "Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae)." *Carbohydrate Research*, **338**(7), 619-624.
62. Mhinzi, G. S. (2002). "Properties of gum exudates from selected Albizia species from Tanzania." *Food Chemistry*, **77**, 301–304.
63. Milo, B., Risco, E., Vila, R., Iglesias, J. & Canigueral, S. (2002). "Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *croton urucurana*". *Natural products*, **65**(8), 1143–1146.
64. Mirhosseini, H. & Amid, B. T. (2012). "A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums." *Food Research International*, **46**(1), 387-398.
65. Miyoshi, E. & Nishinari, K. (2000). "Rheological and thermal properties near the sol-gel transition of gellan gum aqueous solutions." in: Williams, P. A., Phillips, G. O. (Eds.), gums and stabilizers, for food industry 10, *The Royal Society of Chemistry*, 111–128.
66. Nakauma, M., Funami, T., Noda, S., Ishihara, S., Al-Assaf, S., Nishinari, K. (2008). "Comparison of sugar beet pectin, soybean soluble polysaccharide, and gum arabic as

- food emulsifiers. 1. Effect of concentration, pH, and salts on the emulsifying properties." *Food Hydrocolloids*, **22**(7), 1254–1267.
67. Na, Y. S., Kim, W. J., Kim, S. M., Park, J. K., Lee, S. M., Kim, S. O., Synytsya, A. & Park, Y. I. (2010). "Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*." *International Immunopharmacology*, **10**(3), 364-370.
68. Needs, P. W. & Selvendran, R. R. (1993). "Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide." *Carbohydrate Research*, **245**(1), 1-10.
69. Nielsen, S. S. (2010). "*Food Analysis*." Fourth Edition. Springer-Verlag, New York.
70. Nussinovitch, A. (2010). "*Plant gum exudates of the world*." CRC press, New York.
71. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & vyvyan, J. R. (2002). "*Intruduction to spectroscopy*." Books Cole, United States of America.
72. Pereira-Netto, A. B., Pettolino, F., Cruz-Silva, C., Fogagnoli Simas, F., Bacic, A., Iacomini, M. & Bello Baron Maurer, J. (2007). "Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis." *Plant Science*, **173**, 468-477.
73. Petera, B., Delattre, C., Pierreb, G., Wadouachid, A., Elboutachfaitie, R., Engelf, E., Poughonb, L., Michaudb, P. & Fenoradosoa, T.A. (2015). "Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis cladodes*." *Carbohydrate Polymers*, **127**, 372-380.
74. Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2000). "Handbook of hydrocolloids." CRC Press, North and South America.
75. Pigman, W. and Horton, D. (1980). "The Carbohydrates." Vol. IB, p. 643. Academic Press, New York.
76. Preuss, A. & Thier, H.P. (1983). "Isolation of natural thickeners from food for determination by capillary column gas chromatography." *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, **176**, 5.
77. Rao, V.S.R, Sundararajan, P.R, Ramakrishnan, C. & Ramachandran G.N. (1967). "In *Conformation of Biopolymers*." ed. G.N. Ramachandran, Academic Press, New York, Vol.2.
78. Ray, B. (2006). "Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features." *Carbohydrate Polymers*, **66**(3), 408-416.
79. Rees, D. A. (1977). "*Polysaccharide Shapes*." John Wiley & Sons, New York.

80. Rees, D. A, & W. E. Scott. (1971). "Polysaccharide conformation. Part VI. Computer model-building for linear and branched pyranoglycans. Correlations with biological function. Preliminary assessment of inter-residue forces in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation." *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*, 469-479.
81. Reeves, P. (1951). "Cuprammonium-glycoside complexes." *Advanced Carbohydrate Chemistry*, **6**, 107-134.
82. Robyt, J. F. (1998). *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Springer Advanced Texts in Chemistry." Springer-Verlag, New York.
83. Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). "Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review." *Food Science and Technology*, **47**(6), 587-597.
84. Schwarz, J. C. P. (1973). "Rules for conformation nomenclature for five-and six-membered rings in monosaccharides and their derivatives." *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **14**, 505-508.
85. Settineri, W. J. & Marchessault, R. H. (1965). "Derivation of possible chain conformations for poly C β -1 $\rightarrow$ 4-anyhydroxylose." *Journal of Polymer Science, Part C*, **11**, 253-264.
86. Schwendig, P., Camps, G., & Thier, H.P. (1989). "Isolation of agar, carrageenan, and alginate from protein-containing foods." *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, **188**, 545.
87. Shallenberger, R. S. (1982). *Advanced Sugar Chemistry. Principles of Sugar Stereochemistry*." AVI Publishing Co. Westport.
88. Simas-Tosin, F.F., Wagner, R., Stantos, E. M. R., Sassaki, G. L., Gorin, P. A. J. & Iacomini, M. (2009). "Polysaccharide of nectarine gum exudate: comparison with that of peach gum". *Carbohydrate Polymers*, **76**, 485-487.
89. Singthong, J., Ningsanond, S. & Cui, S. W. (2009). "Extraction and physicochemical characterization of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves." *Food Chem*, **114**, 1301-1307.
90. Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., & Goff, H. D. (2004). "Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Kruio Ma Noy pectin." *Carbohydrate Polymers*, **58**, 391-400.
91. Stab, A. M. (1965). *Removal of protein - Sevag metod*" *Methods in Carbohydrate Chemistry*: Academic Press, New York.
92. Stick, R. V. & Williams, S. J. (2009). *Carbohydrates: The Essential Molecules of life*." Second Edition. Elsevier Ltd. All rights reserved.
93. Stick, R. V. (2001). *Carbohydrates: The Sweet Molecules of Life*." Academic Press, San Diego.

94. Stoddart, IF. (1971). "*Stereochemistry of Carbohydrates*." John Wiley & Sons, New York.
95. Sun, L., Feng, K., Jiang, R., Chen, J., Zhao, Y., Ma, R. & Tong, H. (2010). "Water-soluble polysaccharide from *Bupleurum chinense* DC: Isolation, structural features and antioxidant activity." *Carbohydrate Polymers*, **79**(1), 180-183.
96. Tong, H., Liang, Z. & Wang, G. (2008). "Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L." *Carbohydrate Polymers*, **71**(2), 316-323.
97. Vinod, V. T. P., Sashidhar, R. B., Sureshc, K.I., Rama Raoc, B., Vijaya Saradhic, U.V.R. & Prabhakar Rao T. (2008). "Morphological, physico-chemical and structural characterization of gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*): A tree gum from India." *Food Hydrocolloids*, **22**(5), 899-915.
98. Wang, F., Wang, W., Huang, Y., Liu, Z. & Zhang, J. (2015). "Characterization of a novel polysaccharide purified from a herb of *Cynomorium songaricum* Rupr." *Food Hydrocolloids*, **47**, 79-86.
99. Wang, Q., Ellis, P. R., & Ross-Murphy, S. B. (2003). "Dissolution kinetics of guar powders - II. Effects of concentration and molecular weight." *Carbohydrate Polymers*, **53**, 75–83.
100. Wang, Q., Wood, P. J., Huang, X., & Cui, W. (2003). "Preparation and characterization of molecular weight standards of low polydispersity from oat and barley (1, 3) (1,4)- β -D-glucan." *Food Hydrocolloids*, **17**, 845–853.
101. Wang, Q., Wood, P. J., & Cui, W. (2002). "Microwave assisted dissolution of betaglucan in water — implications for the characterization of this polymer." *Carbohydrate Polymers*, **47**, 35–38.
102. Whistler, R. L. (1965). "*Methods in Carbohydrate Chemistry*", Volume 5: General Polysaccharides. Academic Press, New York.
103. Whistler, R. L. & Sanella, J.L. (1965). "Fractional precipitation with ethanol." *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **5**, 34.
104. Wrolstad, R. E. (2012). "*Food Carbohydrate Chemistry*." JohnWiley & Sons, Inc. and Institute of Food Technologists, New Delhi, India.
105. Yalpani, M. (1988). "*Polysaccharides; Synthesis, Modifications and Structure/Property Relationships*." Elsevier, Amsterdam.
106. Yang, B., Prasad, K. N. & Jiang, Y. (2016). "Structure identification of a polysaccharide purified from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp." *Carbohydrate Polymers*, **137**, 570-575.

107. Yin, J., Lin, H., Li, J., Wang, Y., Cui, S., Nie, S. & Xiea, M. (2012). "Structural characterization of a highly branched polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L." *Carbohydrate Polymers*, **87**(4), 2416-2424.
108. Yuan, Y., Wang, Y.-B., Jianga, Y., Prasad, K. N., Yanga, J., Qua, H., Wanga, Y., Jiaa, Y., Moa, H. & Yanga, B. (2016). "Structure identification of a polysaccharide purified from *Lycium barbarum* fruit." *International Journal of Biological Macromolecules*, **82**, 696-701.
109. Zeng, H., Zhang, Y., Zhao, Y., Tian, Y., Miao, S. & Zheng, B. (2015). "Extraction optimization, structure and antioxidant activities of *Fortunella margarita* Swingle polysaccharides." *International Journal of Biological Macromolecules*, **74**, 232-242.
110. Zhang, T., Tian, Y., Jiang, B., Miao, M. & Mu, W. (2014). "Purification, preliminary structural characterization and in vitro antioxidant activity of polysaccharides from *Acanthus ilicifolius*." *LWT - Food Science and Technology*, **56**, 9-14.
111. Zhang, W., Li, P., Song¹, D., Niu¹, H., Shi, S., Wang, S. & Duan¹, J. (2016). "Structural characterization and biological activities of two α -glucans from *Radix Paeoniae Alba*." *Glycoconjugate Journal*, **33**(2), 147-157.
112. Zhao, G., Kan, J., Li, Z. & Chen, Z. (2005). "Structural features and immunological activity of a polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb roots." *Carbohydrate Polymers*, **61**(2), 125-131.
113. Zheng, C., Dong, Q., Chen^b, H., Cong^b, Q. & Ding, K. (2015). "Structural characterization of a polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* flowers and its antioxidant activity." *Carbohydrate Polymers*, **130**, 113-121.
114. Zhu, Z.-y., Dong, F., Liua, X., Lva, Q., Yanga, Y., Liua, F., Chena, L., Wanga, T., Wanga, Z. & Zhang, Y. (2016). "Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia." *Carbohydrate Polymers*, **140**, 461-471.

Abstract

A new water-soluble polysaccharide with molecular weight of 4.86×10^6 Da and a specific optical rotation of $+31.5^\circ$ (c 1.0, H₂O), was isolated from the exudate gum of *Amygdalus scoparia spach* by extraction with hot water (75 °C) and purified by DEAE-cellulose A52 and Sephacryl S-400 HR columns, respectively. Total yields of crude and purified polysaccharides were 8.21% and 1.34 % respectively, and the total carbohydrate content of purified polysaccharides was about 97.6%, as determined by the phenol-sulfuric acid method. Monosaccharide composition analysis indicated that purified polysaccharides composed of Rha, Ara, Xyl, GlcA and Gal in a molar ratio of 1.0 : 20.3 : 4.9 : 3.1 : 17.8, and the uronic acid content of purified polysaccharide was about 6%. The structural feature of purified polysaccharides was investigated by a combination of optical rotation, partial acid hydrolysis, methylation analysis, periodic oxidation and smith degradation, Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The results obtained from the analyses indicated that main water-soluble polysaccharide of exudate gum from *Amygdalus scoparia* was an highly branched arabinogalactan with a backbone consisting of (1→6)-linked β-D-Galp residues, (1→3)-linked β-D-Galp residues and (1→3)-linked α-L-Araf residues, and side chains β-D-Xylp-(1→3)-α-L-Araf-(1→3)-α-L-Araf-(1→), α-L-Rhap-(1→6)-β-D-Galp-(1→) and β-D-GlcAp-(1→6)-β-D-Galp-(1→) were attached to the backbone chain at O-3 and O-6 positions of 1,3,6-linked β-D-Galp residues.

Keywords: Exudate gum of *Amygdalus scoparia spach*, Polysaccharide, Extraction, Purification, Structure elucidation.



Faculty of Agriculture Department

MSc thesis in Food Science and Technology

Isolation and structural characterization of a main water-soluble
polysaccharide of exudate gum from *Amygdalus scoparia*

By: Hamideh Molaei

Supervisor:

Dr. Kambiz Jahanbin

September 2016