مروری بر روش‌های استخراج و شناسایی پلی‌ساکاریدهای غیرسلولزی محلول در آب

مریم آهنگ[1]، علی عباسیان[1*]، کامبیز جهان بین[2]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه مهندسی پلیمر، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

مریم آهنگ

علی عباسیان

کامبیز جهان بین

ویرایش نشده

چکیده:

امروزه یافتن بسپارهای طبیعی با خواص مطلوب برای استفاده در صنعت یکی از محورهای مهم پژوهش‌ها در دنیاست. پلی‌ساکاریدها یکی از انواع بسپارهای طبیعی هستند که کاربردهای گوناگونی در صنایع مختلف و همچنین در زمینه‌ی دارویی دارند. به علت فراوانی، زیست تخریب پذیری، طبیعی بودن و تجدید پذیری، گزینه‌ی مناسبی برای جایگزینی برخی از مواد پایه نفتی بوده و همچنین برای کاربردهای نیازمند زیست سازگاری مطلوب هستند. تنوع ساختاری بسیار زیاد پلی‌ساکاریدها در طبیعت سبب ایجاد طیف وسیعی از خواص گوناگون شده است. به همین دلیل شناسایی ساختار پلی‌ساکاریدها برای توجیه و بهبود خواص آن‌ها لازم است و یکی از علوم مورد توجه محققان در عصر حاضر قلمداد می‌شود. شناسایی ساختار پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی محلول در آب به دلیل تنوع ساختاری بسیار زیاد و هم‌چنین برای تعیین خواص و اثرات دارویی آن‌ها به طور گسترده در پژوهش‌ها و مقالات سراسر دنیا انجام می‌شود. قدم اول برای شناسایی ساختار پلی‌ساکاریدها خالص کردن و جداسازی آن از هر گونه ناخالصی دیگر درون بافت طبیعی است زیرا پلی‌ساکاریدها در طبیعت توسط گیاهان، جانوران و باکتری‌ها تولید می شوند و در کنار ناخالصی‌های دیگر قرار دارند که هر کدام نیازمند روش خاصی برای جداسازی هستند. در این مقاله مروری انواع روش‌ها و آزمون های متداول مورد استفاده برای جداسازی و خالص‌سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب و شناسایی ساختار آن‌ها معرفی شده‌اند.

Isolation, purification and characterization of non-cellulosic water-soluble polysaccharides: A review

Maryam Ahang[1], Ali Abbasian[1*], Kambiz Jahanbin[2]

1. Department of polymer Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, School of Agricultural Engineering, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

Abstract:

Nowadays, finding the biopolymers with desirable properties for the industry is one of the important issues to research around the world. Polysaccharides are the biopolymers which have a variety of applications in the different industries and in the field of medicine. Abundance, biodegradability, renewability and being natural make them appropriate materials to replace some of petroleum-based products and to be used for the applications requiring biocompatibility. Due to their structural variations in the nature, polysaccharides' properties are immense. In order to explain and improve the properties, structural characterization of polysaccharides is necessary and is of interest for the researchers nowadays. Because of structural varieties of non-cellulosic water-soluble polysaccharides, identification of the polysaccharides' structure for finding their medical properties is also of importance in the researches. The first step for water-soluble polysaccharide the structural characterization is to isolate and purify the polysaccharide. Various sources of the polysaccharides made by the plants, animals and bacteria have different impurities which should be removed before the characterization. Every non-polysaccharide material in the samples has a specific method to be isolated. Different method and tools exist to characterize the chemical structure of these biopolymers. This review introduces the common methods and tests used for isolation, purification and structural characterization of the water-soluble polysaccharides.

واژگان کلیدی:

زیست بسپار، پلی‌ساکارید، جداسازی، خالص سازی، شناسایی ساختار

Key words:

Biopolymer, polysaccharide, isolation, purification, structural characterization

ویراستی نشده

پیام نگار مؤلف مسئول مکاتبات: abbasian.a@srbiau.ac.ir

۱-مقدمه

امروزه، با توجه به ملاحظات زیست محیطی یافتن جایگزینی با منشأ طبیعی برای بسپارهای نفتی اهمیت پیدا کرده است و بسپارهای جایگزین باید از نظر قیمت و خواص توان رقابت با بسپارهای پایه نفتی را داشته باشند[۱]. در بین انواع بسپارهای طبیعی، پلی‌ساکاریدها توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند زیرا موادی غیر سمی، زیست‌تخریب‌پذیر و زیست سازگار هستند و به وفور از منابع تجدیدپذیر در طبیعت تهیه می‌شوند. این دسته از بسپارهای زیستی، در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی و سوخت‌های زیستی کاربرد دارند[۲]. برخی از پلی‌ساکاریدها از نظر دارویی دارای خواص ضد سرطانی، پاداکسندگی[1] و ضد میکروبی هستند و هر نوعِ خاصی از پلی‌ساکارید می‌تواند نوعی سلول سرطانی را از رشد بازدارد[۳]. پلی‌ساکاریدهایی نظیر گلوکومانان به دلیل داشتن قابلیت ژل شدن و زیست‌تخریب‌پذیر بودن به طور گسترده در دارورسانی[2] برای ساخت کپسول‌ها استفاده می‌شوند. بعضی از پلی‌ساکاریدها نیز قابلیت تشکیل فیلم دارند. به عنوان مثال تا کنون فیلم-های ترانما[3] به صورت آمیزه‌ای از گلوکومانان با کیتوسان، سلولز، ژلاتین، پلی آکریل آمید و ... ساخته شده است[۴]. در صنعت نیز پلی‌ساکاریدهایی نظیر نشاسته به عنوان پرکننده در لاستیک و پلاستیک [۵] و یا به عنوان چسب طبیعی به منظور استفاده در کاغذ و مقوا و بسته‌بندی فرآوری می‌شوند.

نکته‌ی مهم در رویارویی با بسپارهای طبیعی آنست که با توجه به منبع استحصال، پلی‌ساکاریدهایی با ساختار گوناگون و در نتیجه خواص متفاوت به دست خواهند آمد. برای مثال فعالیت زیستی پلی‌ساکاریدها به خواص فیزیکی-شیمیایی از جمله وزن مولکولی و نوع تک‌ساکاریدها بستگی دارد. تشخیص ساختار پلی‌ساکاریدِ به دست آمده، قطبیت، شاخه‌ها، طول زنجیر و وزن مولکولی برای استفاده‌ی صنعتی بسیار حائز اهمیت است[۶] و برای دستیابی به ساختار پلی‌ساکارید دانستن نوع تک-ساکاریدهای سازنده، نوع اتصال گلیکوزیدی، محل شاخه‌ها و وزن مولکولی لازم است. در پژوهش‌ها، بررسی ساختار

ویرایش نشده

---

[1] antioxidant properties

[2] drug delivery

[3] transparent

پلی‌ساکارید با چنین دقتی در مورد پلی‌ساکاریدهایی با ساختار نامعلوم انجام می‌شود. پلی‌ساکاریدهای شناخته شده‌تر مانند نشاسته و سلولز به دلیل مشخص بودن ساختار به طور پیش فرض، در پژوهش‌های روز دنیا دیگر مورد شناسایی دقیق ساختار قرار نمی‌گیرند. نقطه‌ی تمرکز این مقاله‌ی مروری بررسی روش‌های استخراج و شناسایی ساختار آن‌دسته از پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی محلول در آب است که ساختار از قبل شناخته شده‌ای ندارند و بناست به منظور شناسایی، خالص سازی شوند. سعی شده است پس از توضیح مختصری در مورد ویژگی‌های ساختار پلی‌ساکارید، روش‌های جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی پلی‌ساکاریدهای غیرسلولزی محلول در آب شرح داده شوند. پلی‌ساکاریدها در طبیعت (در منابع گیاهی یا غیر آن) در کنار مواد دیگری قرار گرفته‌اند که از منظر شناسایی، ناخالصی محسوب می‌شوند و باید جدا شوند. به همین دلیل پلی-ساکاریدها ابتدا استخراج و سپس طی مراحل مختلف خالص می‌شوند و در نهایت با روش‌های مختلف شیمیایی، سوانگاری و طیف‌سنجی مورد شناسایی قرار می‌گیرند.

۲-تعریف پلی‌ساکاریدها

پلی‌ساکاریدها دسته‌ای از کربوهیدرات‌ها محسوب می‌شوند که می‌توانند نقش ذخیره‌ای یا نقش ساختاری داشته باشند. هر سال تقریباً ۴×۱۰^{۱۱} تن کربوهیدرات در طبیعت توسط گیاهان، حیوانات یا باکتری‌های فتوسنتزکننده تولید می‌شود. سهم عمده‌ای از کربوهیدرات تولید شده به پلی‌ساکاریدها اختصاص دارد. دانستن ویژگی‌های ساختاری آن‌ها برای فهم و درک مراحل شناسایی لازم است. پلی‌ساکاریدها بسپارهایی هستند که از واحدهای ساکارید ساخته شده‌اند و گاه با نام گلیکان نیز از آن‌ها یاد می‌شود. تک‌ساکاریدها با ساختار حلقوی در زنجیر پلی‌ساکارید قرار می‌گیرند[۷]. تک‌ساکاریدها هم‌چنین ممکن است با الگوی خطی و یا به صورت شاخه‌دار با شاخه‌های کوتاه یا بلند به هم متصل شده باشند. برهم‌کنش زنجیره‌ها و نیروهای بین مولکولی در پلی‌ساکاریدهای خطی باعث می‌شود تا به سختی در آب حل شوند اما پلی‌ساکاریدهای شاخه‌دار

ویرایش نشده

انحلال بهتری در آب دارند و در غلظت مناسب خمیری چسبناک شکل می‌دهند که احتمالاً به دلیل نفوذ و گوریدگی[4] زنجیره‌هاست بنابراین پلی‌ساکاریدهای شاخه‌دار گزینه‌ی مناسبی برای ساخت چسب یا پیونده[5] هستند[۸].

برای پلی‌ساکاریدها نیز مانند هر بسپار دیگری وزن مولکولی مشخصی نمی‌توان تعیین کرد و برای آن وزن مولکولی میانگین تعریف می‌شود. وزن مولکولی پلی‌ساکاریدها بین ۱۶ تا ۱۶۰۰۰ کیلودالتون متغیر است[۷].

۱-۲-اتصال تک‌ساکاریدها به یکدیگر

تک‌ساکاریدها دارای دو شکل خطی و حلقوی هستند. در حالت محلول طی واکنش درون مولکولی بین گروه آلدهید و یک گروه هیدروکسیل شکل حلقوی به خود می‌گیرند و همی‌استال تشکیل می‌دهند. شکل حلقوی تک‌ساکاریدهای ۶ کربنه می‌تواند حاوی ۶ اتم کربن در حلقه باشد که پیرانوز نامیده می‌شود و یا ۵ اتم کربن در حلقه داشته باشد که فورانوز نامیده می‌شود. تنها، شکل حلقوی تک‌ساکاریدها می‌تواند در زنجیره‌ی پلی‌ساکارید قرار بگیرد[۹].

هنگامی که گروه هیدروکسیلِ یک تک‌ساکارید (یا همی‌استالِ حلقوی) با همی‌استالِ بعدی واکنش می‌دهد، اتصال گلیکوزیدی تشکیل می‌شود. این اتصال می‌تواند بین کربن اول (کربن سر هم‌پار یا آنومر) از یک تک‌ساکارید با هرکدام از کربن‌های همی‌استالِ مجاور تشکیل شود. بسته به اینکه اتصال در موقعیت کربن اول چگونه باشد، پیکربندیِ سرهمپاری از نوع α یا β به خود می‌گیرد و به واسطه‌ی یک اتم اکسیژن به کربنی از تک‌ساکارید بعدی متصل می‌شود. طبیعت اتصال گلیکوزیدی اثر بسزایی در ساختار و خواص پلی‌ساکارید نظیر انحلال، گرانروی و خواص ژل شدن خواهد داشت.

شکل ۱ سه نوع بسپار متشکل از گلوکز را نشان می‌دهد که با وجود داشتن تک‌ساکاریدهای یکسان و اختلاف در نوع اتصال گلیکوزیدی، خواص متفاوتی دارند. سلولز با اتصال‌های $\beta(۱\rightarrow۴)$، نامحلول در آب است و ساختار بلورین منظم با پیوندهای هیدروژنی قوی دارد. در مقابل آمیلوز با اتصال‌های $\alpha(۱\rightarrow۴)$، بلورهای ضعیفی دارد. با حرارت در آب حل می-

[4] entanglement

[5] binder

ویرایش نشده

شود، ساختار مارپیچ و ژل تشکیل می‌دهد. کوردلان نیز با اتصال (۳→۱)β، پلی‌ساکارید ژل شونده‌ی دیگری با ساختار مارپیچ است[۹].

شکل ۱. ساختار پلی‌ساکاریدهای متشکل از گلوکز ۱)سلولز، ۲)کوردلان و ۳)آمیلوز [۹]

دانستن تمام ویژگی‌های ذکر شده برای پلی‌ساکاریدها از جمله نوع تک‌ساکاریدها، لگوی قرارگیری تک‌ساکاریدها در زنجیر اصلی و شاخه‌ها، وزن مولکولی، تعداد اتم‌های حلقه و نوع اتصال گلیکوزیدی در تعیین ساختار پلی‌ساکارید نقش دارند.

ویرایش نشده

۳-استخراج و خالص سازی پلی‌ساکارید محلول در آب

به طور کلی پلی‌ساکاریدها مولکول‌هایی آبدوست هستند. روش‌های استخراج و خالص سازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب با کوچک مولکول‌ها متفاوت است. با توجه به خواص متفاوت پلی‌ساکاریدها در منابع مختلف، روش‌هایی متناسب با ویژگی‌های هر پلی‌ساکارید برای جداسازی و خالص سازی آن به کار گرفته می‌شود. روش‌های مختلفی برای جداسازی و خالص‌سازی پلی‌ساکاریدها وجود دارند. مبنا و اساس انتخاب این روش‌ها برای خالص سازی پلی‌ساکارید به صورتی که برای شناسایی ساختار مناسب باشد، حفظ ویژگی‌های ذاتی پلی‌ساکارید و جلوگیری از تغییر ساختار آن حین فرآیند جداسازی و خالص‌سازی است[۱۰]. پلی‌ساکاریدها همراه با چربی، پروتئین و مواد کربوهیدراتی دیگر در گیاهان یا منابع دیگر پلی‌ساکاریدی وجود دارند. برای شروع مراحل جداسازی و خالص‌سازی به منظور تماس بیشتر حلال، اولین گام پیش از استخراج پلی‌ساکارید محلول در آب، خرد کردن بافت حاوی پلی‌ساکارید است. علاوه بر روش‌های سنتی رایج برای خرد کردن، در سال‌های اخیر استفاده از فناوری فراصوت نیز برای افزایش بازده استخراج پلی‌ساکارید به کار گرفته شده است[۱۱]. در مراحل جداسازی و خالص‌سازی باید چربی، رنگدانه‌های قطبی و غیرقطبی، پروتئین، بافت نامحلول و هرگونه ماده ی دیگری از پلی ساکارید مورد شناسایی جدا شود. در اینجا به روش‌های متداول در این زمینه اشاره خواهیم کرد.

۱-۳-چربی‌زدایی و رنگبری

چربی در کنار پلی ساکارید ناخالصی محسوب می‌شود و باید جداسازی روی آن انجام گیرد. هم‌چنین رنگدانه‌های موجود در بعضی از بافت‌های حاوی پلی‌ساکارید نیز، در انجام برخی از آزمون‌های شناسایی اختلال ایجاد می‌کنند و باید طی مراحل استخراج و خالص سازی جدا شوند.

پس از خرد کردن، نمونه‌های حاوی چربی و مواد غیرقطبی (نظیر رنگدانه‌های غیرقطبی) با حلال‌های مختلفی تحت بازشارش[6] در دستگاه سوکسله قرار می‌گیرند. اتانول با خلوص بالا برای استخراج مواد معدنی و قندهای کوچک مولکول، رنگدانه‌ها، اسیدهای آلی، آمینواسیدها و پپتیدهای با وزن مولکولی کم به کار می‌رود. فایده‌ی دیگر استفاده از اتانول غیرفعال کردن آنزیم‌های موجود در بافت حاوی پلی‌ساکارید است. مخلوط کلروفرم:متانول (۵:۹۵) و هگزان نیز از جمله حلال‌های مورد استفاده در چربی‌زدایی هستند. در بین حلال‌های چربی‌زدا، اتانول خطر آتش‌گیری کمتری دارد[۱۲].

رنگدانه‌ها را هم‌چنین با کربن فعال و هیدروژن پراکسید[7] می‌توان جدا کرد. کربن فعال در کنار رنگدانه، جذب کننده‌ی پلی-ساکارید نیز هست و باید توجه داشت که استفاده از آن بازده استخراج پلی‌ساکارید را کم می‌کند. هیدروژن پراکساید نیز ممکن است در ساختار پلی‌ساکارید آبکافت ناقص ایجاد کند و این امر برای استخراج پلی‌ساکارید به منظور شناسایی ساختار مطلوب نیست[۱۳،۱۴].

پس از چربی‌زدایی و رنگ‌بری، نمونه آماده‌ی استخراج پلی‌ساکارید است. در مرحله‌ی بعد، استخراج پلی‌ساکاریدِ محلول در آب انجام می‌گیرد. حلال‌های مختلفی برای این منظور استفاده می‌شوند. چند مورد از رایج‌ترین روش‌های استخراج عبارتند از:

۲-۳-استخراج با آب

[6] reflux

[7] Hydrogen peroxide

ویرایش نشده

آب با دماهای مختلف اولین انتخاب برای استخراج پلی‌ساکاریدهای محلول در آب خنثی است. اساس این روش انحلال-پذیری پلی‌ساکاریدها در آب داغ است. طبیعتاً با افزایش دمای آب، بازده استخراج بیشتر می‌شود. با این روش کمترین آسیب به ساختار پلی‌ساکارید وارد می‌شود. نحوه‌ی درست استفاده از این روش، استخراج در چند مرحله (معمولاً سه مرحله و با نسبت آب:نمونه برابر با ۱:۱۰) و سپس ترکیب و تغلیظ محصولات استخراج است[۱۰].

۳-۳-استخراج قلیایی و اسیدی

بعضی از پلی‌ساکاریدهای اسیدی یا پلی‌ساکاریدهایی با جرم مولکولی زیاد به سادگی در آب داغ حل نمی‌شوند و انحلال آن‌ها در محلول قلیایی رقیق بسیار بیشتر از آب داغ است. به همین دلیل، محلول‌های قلیایی برای استخراج پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی یاخته استفاده می‌شوند. به نظر می‌رسد در شرایط قلیایی پیوند استری و دیگر پیوندهای اشتراکی و غیر اشتراکی شکسته می‌شوند و پلی‌ساکاریدهای غیرقابل استخراج را از شبکه‌ی پیچیده‌ی دیواره‌ی یاخته آزاد می‌کنند.[۱۵]. بنابراین، محلول آبی ٪۱۵-۵ درصد وزنی از $NaCO_3$ یا NaOH اغلب در موارد خاص به جای آب داغ استفاده می‌شود[۱۶]. شایان ذکر است که پلی‌ساکاریدهای آزاد شده با قلیا محلول در آب خواهند بود[۱۵].

در استخراج قلیایی دمای محلول باید کمتر از $^{\circ}C$ ۱۰ نگه داشته شود. در غیر اینصورت ساختار پلی‌ساکارید تخریب می‌شود. در عمل، استخراج با آب داغ اولین گزینه برای استخراج پلی‌ساکاریدهاست و پس از آن استخراج قلیایی برای باقیمانده‌ی پلی‌ساکاریدها در نمونه استفاده می‌شود.

استخراج اسیدی نیز برای بعضی از پلی‌ساکاریدها کاربرد دارد. برای مثال پلی‌ساکارید اسیدی پکتین به صورت تجاری با محلول آبی اسیدی استخراج می‌شود. البته برای شناسایی ساختار از استخراج با محلول‌های اسیدی به دلیل امکانِ آبکافت اتصال‌های گلیکوزیدی، معمولاً اجتناب می‌شود[۱۵].

۴-۳-پروتئین زدایی از پلی‌ساکارید محلول در آب

محصول مراحل قبلیِ استخراج، ترکیبی شامل پلی‌ساکارید محلول در آب و دیگر مواد مانند پروتئین خواهد بود. برای جداسازی پروتئین نیز روش‌های مختلفی مانند روش سواگ، استفاده از آنزیم ها و اسید وجود دارند:

ویرایش نشده

۱-۴-۳-پروتئین زدایی با روش سواگ

یکی از متداول‌ترین روش‌های پروتئین‌زدایی پلی‌ساکارید محلول در آب که اثر تخریبی بر اتصال گلیکوزیدی ندارد، روش سواگ است. در این روش مخلوطی از کلروفرم و ۱-بوتانول با نسبت ۴ به ۱ به نمونه اضافه شده و سبب واسرشته شدن پروتئین و رسوب کردن آن می‌شود و می‌توان محلول پلی‌ساکارید را از آن به راحتی جدا کرد. تکرار روش سواگ پروتئینِ نمونه را به طور کامل استخراج می‌کند[۱۷].

۲-۴-۳-پروتئین زدایی با روش آنزیمی

آنزیم‌ها موادی هستند که به صورت انتخابی عمل می‌کنند. آنزیم‌های گوارنده‌ی پروتئین مانند پروتئاز نیز بدون آسیب رساندن به ساختار پلی‌ساکارید می‌تواند با گوارش پروتئین آن را از پلی‌ساکارید جدا کند. معمولاً در شرایطی که آمایش‌های شیمیایی سبب تخریب ساختار و یا گروه‌های عاملی می‌شود، استفاده از آنزیم‌ها مورد توجه قرار می‌گیرند[۱۸]. اما، هزینه‌ی بالای پروتئین زدایی با آنزیم‌ها سبب می‌شود روش‌های دیگر ترجیح داده شوند.

۳-۴-۳-پروتئین زدایی با روش‌های دیگر

پروتئین را می‌توان با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) رسوب داد اما TCA ممکن است سبب رسوب کردن پلی-ساکاریدهایی مانند آلژینات شود و ضمناً احتمال آبکافت و تغییر ساختار پلی‌ساکارید نیز وجود دارد. عبور محلول از روی نوعی رزین تبادل یون کاتیونی نیز می‌تواند پروتئین را از نمونه جدا کند. از آنجاکه پروتئین دارای بار مثبت است با ستون پیوند برقرار می‌کند و پلی‌ساکاریدها همراه با سیال خروجی از درون ستون عبور می‌کنند. جذب پروتئین بر سِلیت[۸]، خاک دیاتومه[۹] و انواع رس نیز از روش‌های دیگر برای جدایش پروتئین هستند[۱۵].

۵-۳- رسوب دهی پلی ساکارید محلول در آب

[8] celit

[9] diatomaceous earth

ویرایش نشده

محلول به دست آمده پس از مرحله‌ی پروتئین زدایی، حاوی پلی‌ساکارید محلول در آب است. با رسوب دهی می‌توان به پلی‌ساکارید موجود در آن دست یافت. پلی‌ساکاریدها در اَستون یا اتانول نامحلول‌اند و معمولاً پس از پروتئین‌زدایی با افزودن اتانول با نسبت حجمی ۳ یا ۴ برابر به محلول آبی پلی‌ساکاریدی، رسوب می‌کنند[۱۵].

۶-۳-خالص سازی نهایی پلی‌ساکارید محلول در آب

پلی‌ساکارید رسوب کرده باید از طریق ستون‌های سوانگاری خالص شود. سوانگاری ژل صافشی با استفاده از ستون‌های سفارز[۱۰]، سفادکس[۱۱] و سفاکریل[۱۲] می‌توانند پلی‌ساکاریدهای مختلف را بر اساس وزن مولکولی به خوبی از هم جدا کنند[۱۵] و شرکت‌هایی مانند سیگما و فارماسیا چنین موادی را با همین نام تجاری عرضه می‌کنند. برای مثال ماده‌ی سفادکس ژلی است که از شبکه‌ای کردنِ دکسترانِ محلول در آب با اپی کلروهیدرین به دست می‌آید. بسپار نامحلول در آبِ به دست آمده، اتصالات عرضی گلیسیرین-اتری خواهد داشت. از آنجا که این ژل به شدت آبدوست است، در حضور آب متورم می‌شود. دانه‌های متورم شده می‌توانند مواد را بر اساس اندازه از هم جدا کنند. درجه‌ی متورم شدن بر خواص جداسازی این ژل اثر می‌گذارد. هرچه ژل چگال‌تر باشد محدوده‌ی برخه[۱۳]ها تنگ‌تر خواهد شد. در سری G از سفادکس، عدد مقابل G مقدار آب جذبی را نشان می‌دهد برای مثال G-15، ۱/۵ ml/g (بر اساس وزن دانه‌های خشک) و G-100، ۱۰ ml/g آب جذب می‌کنند. G-15 چگال‌تر از G-100 است و برای جداسازی ترکیبات کوچک‌تر استفاده می‌شود و سفادکس G-100 وزن مولکولی بین ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ را جدا می‌کند[۱۹]. نوع دیگر سوانگاری که در خالص‌سازی پلی-ساکاریدها کاربرد دارد، سوانگاری تبادل یونی است که برای جداسازی، از ترکیبات باردار یا یونی استفاده می‌کند و به صورت انتخابی مولکول‌های مورد نظر را استخراج می‌کند. اساس کار سوانگاری تبادل یونی برقراری پیوند برگشت پذیر بین مولکول‌های باردار با ماتریس نامحلول دارای بار مخالف است. مواد ماتریس نامحلول به صورت شیمیایی با گروه‌های باردار

---

[10] sepharose

[11] sephadec

[12] sephacryl

[13] fraction

ویرایش نشده

مثبت و منفی عامل‌دار می‌شوند. این مواد می‌تواند بسپارهای مصنوعی، سیلیکا یا انواع پلی‌ساکارید باشند که گروه‌های عاملی مختلفی از جمله کواترنری آمونیوم، تری‌متیل بنزیل آمونیوم، دی‌اتیل آمینو اتیل، دی‌متیل آمینو اتیل و ... به آن‌ها افزوده می‌شود[۱۹]. ستون دی‌اتیل‌آمینواتیل‌سلولز برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای محلول در آب خنثی از اسیدی مناسب است[۱۵].

۴-شناسایی

برای مطالعه ساختار پلی‌ساکارید باید ویژگی‌های ساختاری آن با استفاده از روش‌های شیمیایی و دستگاهی مشخص شود. اولین پارامتر مهم در تشخیص ساختار پلی‌ساکارید، مشخص کردن نوع تک‌ساکاریدها یا قندهای سازنده‌ی زنجیر است. انواع مختلف قندها می‌توانند در زنجیر پلی‌ساکارید با نسبت های مولی متفاوتی به هم متصل شوند. این اطلاعات را می‌توان از روش‌های سوانگاری و آبکافت اسیدی ناقص به دست آورد.

اینکه اتم اتصال در تک‌ساکاریدهای مجاور، کدام اتم حلقه باشد و اینکه حلقه‌های پلی‌ساکارید از نوع فورانوزی باشند یا پیرانوزی، تأثیر زیادی روی خواص پلی‌ساکارید دارد. برای شناسایی این موارد نیز از روش‌هایی از جمله سوانگاری، طیف سنجی فروسرخ و اکسایش با پریدات استفاده می‌شود.گروه‌های عاملی و نوع اتصالات آلفا و بتا نیز پارامترهای بسیار مهمی در تشخیص ساختار پلی‌ساکارید هستند که با استفاده از درجه چرخش نوری، طیف فروسرخ و NMR سنجیده می شوند. نکته‌ی مهم این است که نتایج حاصل از تمام این آزمون ها در کنار هم منجر به پیش بینی ساختار احتمالی پلی ساکارید می‌شوند و یک آزمون به تنهایی نمی‌تواند ساختار پلی‌ساکارید را معین کند.

۴-۱-اطمینان از خلوص پلی‌ساکارید مورد شناسایی

روش‌های جداسازی و خالص سازی که در بخش ۳ شرح داده شد برای پلی‌ساکاریدهای محلول در آب کاربرد دارند و در ادامه برای اینکه جواب‌های دقیقی از آزمون‌های شناسایی شیمیایی و دستگاهی به دست بیاید، باید از خلوص پلی ساکارید به دست آمده اطمینان حاصل شود. وجود هرگونه ناخالصی اعم از پروتئین یا رنگدانه‌ها در دقت آزمون و تحلیلِ درستِ جواب‌ها اختلال ایجاد می کنند. بررسی خلوص پلی‌ساکارید از این جهت اهمیت دارد که در صورت دقیق و درست نبودن

ویرایش نشده

مراحل خالص‌سازی از انجام بی دلیل آزمون‌های شناسایی و صرف وقت و هزینه‌ی نابجا جلوگیری می‌کند. خلوص پلی ساکارید محلول در آب را در انتهای مراحل خالص سازی با روش‌های زیر می‌توان تأیید کرد.

پلی‌ساکاریدها در حضور معرف فنول-سولفوریک اسید به رنگ آجری تیره درمی‌آیند. روش فنول-سولفوریک اسید برای تعیین قند کل استفاده می‌شود. قند کل با این روش و با استفاده از D-گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری می‌شود به این صورت که برای اندازه‌گیری آن با استفاده از منحنی واسنجی [14] به دست آمده از نمونه‌های استاندارد قندی، شدت جذب آن در طول موج ۴۹۰ (برای هگزوزها) و ۴۸۰ نانومتر (برای پنتوزها و اورونیک اسیدها) اندازه‌گیری شده و میزان قند کل به دست می‌آید[۲۰]. هر چه درصد قند کل به دست آمده بالاتر باشد به معنی بالا بودن خلوص پلی‌ساکارید است.

روش دیگری که با آن نبود ناخالصی پروتئین مشخص می‌شود، سنجش میزان پروتئین با روش UV-Bradford است. در این روش ابتدا محلولی با غلظت مشخص از نمونه ساخته شده و سپس با استفاده از منحنی واسنجی (رسم شده از روی محلول‌های استاندارد ساخته شده از آلبومین گاوی)، میزان دقیق پروتئین موجود در نمونه مشخص می‌شود. در این روش از کوماسی بلو[15] که معرف پروتئین است استفاده شده و دستگاه UV در واقع جذب نور آبی در ۲۸۰ nm را می‌سنجد. درصورت عدم جذب در این طول موج، نبود ناخالصی پروتئین در نمونه تأیید می‌شود[۲۱].

بررسی طیف فروسرخ نیز یکی از راه‌های اطمینان از خلوص پلی‌ساکارید به دست آمده است. در طیف فروسرخ باید تنها قله‌های مربوط به پیوندها و گروه‌های عاملی مربوط به پلی‌ساکارید وجود داشته باشند.

۲-۴-سوانگاری

انواع سوانگاری مایع و گازی به تنهایی برای تعیین وزن مولکولی، شناسایی واحدهای تک‌ساکاریدی و نسبت مولی‌شان کاربرد دارند، هم‌چنین در ترکیب با طیف‌سنج جرمی برای شناسایی ویژگی‌های بیشتری از پلی‌ساکارید استفاده می‌شوند که در ادامه شرح داده خواهد شد.

---

[14] Calibration

[15] Coomassie blue

ویرایش نشده

سوانگاری ژل تراوایی جداسازی را بر اساس اندازه‌ی مولکول‌ها انجام می‌دهد و از طریق واسنجی ستون با استانداردهایی با وزن مولکولی مشخص نظیر پولولان و دکستران می‌توان وزن مولکولی پلی‌ساکارید مورد آزمون را به دست آورد[۲۲].

سوانگاری گازی برای شناسایی مواد تبخیر شدنی کاربرد دارد و از آنجا که پلی‌ساکاریدها به گاز تبدیل نمی‌شوند ابتدا به واحدهای تک‌ساکاریدی آبکافت شده و سپس مورد شناسایی با سوانگاری گازی قرار می گیرند. به این منظور با استفاده از اسید پلی‌ساکارید آبکافت می‌شود و با افزودن سدیم بروهیدرید احیا شده به آلدیتول تبدیل می‌شوند. آلدیتول‌های تشکیل شده با استفاده از مخلوط پیریدین-استیک انیدرید استیله شده و به آلدیتول استات‌های متناظر تبدیل می‌شوند. از طرفی آلدیتول استات تک‌ساکاریدهای استاندارد همراه با استاندارد داخلی به دستگاه سوانگاری تزریق می‌شوند و به این صورت با استفاده از سوانگاری گازی تک‌ساکاریدهای سازنده و نسبت مولی آن‌ها به دست می‌آید[۲۳].

سوانگاری گازی در ترکیب با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) ابزار شناسایی قدرتمندی است. در این روش، تجزیه با ایجاد مشتقات تبخیر شدنی نظیر اترهای دی متیل سیلیل انجام می‌پذیرد. طیف‌های حاصل، برای نشان دادن ساختار حلقه‌ی تک-ساکاریدها (پیرانوز و فورانوز) و تشخیص نوع برخی از اتصالات گلیکوزیدی سودمند است. برای اینکه بتوان از چنین روشی استفاده کرد نیاز به پیش‌آمایش وجود دارد ۱)پرمتیله کردن با سود و متیل یدید، ۲) متانول‌کافت با هیدروکلریک اسید و متانول و ۳) سایلیله کردن با استفاده از ترکیباتی نظیر هگزامتیل دی سیلازان. پس از سایلیله کردن، سوانگار چند قله از سرهمپارهای آلفا و بتا مربوط به حلقه های پیرانوز و فورانوز را نشان می‌دهد و هر کدام از قله‌ها پس از خروج از ستون یک طیف جرمی می‌دهد.

قدرت و حساسیت GC-MS این امکان را فراهم می‌کند که مشتق سازی و شناسایی با مقادیر کمی از نمونه امکان‌پذیر باشد. مطابق شکل ۲ با متیله کردن، گروه متیل روی تمام هیدروکسیل‌های قند می‌نشیند. متانول‌کافت باعث آبکافت زنجیره‌ی قند شده و گروه هیدروکسیلی آزاد می‌کند که حالا می‌تواند سایلیله بشود. موقعیت گروه تری متیل سیلیل (TMSi) نشان

ویرایش نشده

می‌دهد که قند از کجا به همسایه‌اش اتصال داشته است. ساختار قند حاوی گروه متیل و TMSi را می‌توان با GC-MS تعیین کرد و موقعیت اتصال را فهمید[۲۵،۲۴].

روش دیگری که تحت عنوان متیله کردن از آن یاد می‌شود نیز وجود دارد که با آن اطلاعاتی در خصوص موقعیت جانشینی پیوندهای گلیکوزیدی به دست می‌آید. در این روش ابتدا قندها به طور کامل متیله می‌شوند. سپس با آبکافت به آلدوز تبدیل شده و با $NaBH_4$ به آلدیتول‌های متناظر احیاء می‌شوند. سپس تحت واکنش استیله شدن قرار گرفته و به آلدیتول‌های استات تبدیل می‌شوند. در این مرحله محصولات را به خوبی می توان با GC-MS شناسایی کرد[۲۶].

شکل ۲. الف) ساختار اصلی، ب) جانشینی گروه‌های هیدروکسیل با متیل در اثر متیله شدن، پ) متانول کافت و ت) جانشینی گروه های هیدروکسیل جدید با تری متیل سیلیل ئر اثر سایلیله شدن[۲۴]

۳-۴-آبکافت اسیدی ناقص

در آبکافت اسیدی ناقص طبق روشی که در ادامه توضیح داده می‌شود ۴ برخه از پلی‌ساکارید خالص شده به دست می‌آید. آنالیز هر کدام از برخه‌ها می‌تواند نوع واحدهای سازنده‌ی زنجیر اصلی و شاخه‌ها را مشخص کند. اساس روش آبکافت اسیدی آن است که ابتدا شاخه‌ها و پیوندهای ضعیف تر در حضور اسید شکسته می‌شوند و پیوندهای قوی زنجیر اصلی پلی-ساکارید کم‌تر تحت تأثیر آبکافت قرار می‌گیرند. ۸۰ mg پلی‌ساکارید با ۳ ml از محلول ۰/۰۵ مولار تری فلوئورو استیک اسید در دمای ۸۰ °C به مدت ۱۶ ساعت تحت آبکافت قرار می‌گیرد. پلی‌ساکارید آبکافت شده برای حذف رسوبات مرکزگریزانی (سانتریفیوژ) می‌شود و رسوبات جدا شده تحت عنوان پلی‌ساکارید ۱ هستند. سپس سیال رویی به مدت ۲۴ ساعت دیالیز می‌شود و در انتها برخه‌ی جدا شده جمع‌آوری و پلی‌ساکارید ۴ نامیده می‌شود. سیال باقی‌مانده در کیسه‌ی دیالیز با اتانول رسوب‌دهی شده و رسوب و سیال روی آن به ترتیب پلی‌ساکارید ۲ و ۳ نامیده می‌شوند. تمام برخه‌ها پس از خشک شدن با سوانگاری گازی (طبق روند مخصوص به سوانگاری، پس از آبکافت کامل با تری فلوئورواستیک

ویرایش نشده

اسید و مشتق سازی به آلدیتول استات) آنالیز می‌شوند. پلی‌ساکارید ۱ و ۲، پلی‌ساکارید تشکیل دهنده‌ی زنجیر اصلی هستند و پلی‌ساکاریدهای ۳ و ۴ نیز تشکیل‌دهنده‌ی اجزای تکپاری شاخه‌های جانبی پلی‌ساکارید خالص هستند[۲۷]. نتایج آنالیز محصولات آبکافت اسیدی نسبت مولی تک‌ساکاریدهای موجود در هر بخش پلی ساکارید (شاخه و زنجیر اصلی) را نیز مشخص می کند.

۴-۴-اکسایش با پریدات

در ساز و کار اکسایش با پریدات، درصورتی‌که دو کربن مجاور در حلقه‌ی قند دارای گروه OH باشند شاهد مصرف ۱ مول پریدات خواهیم بود (شکل ۳) و در صورتی‌که سه کربن مجاور دارای گروه OH باشند ۲ مول پریدات مصرف می‌شود و با شکست پیوند ۱ مول فرمیک اسید نیز تولید می‌شود (شکل ۴). اگر به علت نحوه‌ی برقراری پیوند در کل زنجیر و یا وجود شاخه‌ها در مجاور شدن گروه‌های OH تداخل ایجاد شود مشخص می‌شود که حلقه‌ی قندی قابلیت اکسید شدن با پریدات را نداشته است[۲۲]. به این ترتیب می‌توان احتمالاتی را برای وجود انواع اتصالات در نظر گرفت. برای مثال اتصال ۶←۱ (اتصال بین کربن شماره ۱ با کربن شماره ۶ تک‌ساکارید مجاور) یا اتصال ←۱ (تک‌ساکارید انتهای زنجیر که فقط کربن شماره ۱ آن درگیر اتصال است) دارای ۳ گروه OH مجاور هستند و با اکسایش آن، ۲ مول پریدات مصرف شده و یک مول فرمیک اسید تولید می‌شود. به همین دلیل اگر مصرف پریدات دو برابر فرمیک اسید باشد می‌توان احتمال داد که بیشتر اتصالات موجود از نوع ۶←۱ و ←۱ هستند.

ویرایش نشده

شکل ۳. مصرف یک مول پریدات به ازای دو گروه هیدروکسیل مجاور حین اکسایش با پریدات[۲۲]

شکل ۴. مصرف ۲ مول پریدات و تولید ۱ مول فرمیک اسید به ازای سه گروه هیدروکسیل مجاور حین اکسایش با پریدات[۲۲]

محصولات حاصل از اکسایش با پریدات هم‌چنین کاملاً آب‌کافت شده و با سوانگاری گازی تحلیل می‌شوند. واحدهایی که قابلیت اکسید شدن نداشته‌اند پس از آب‌کافت در نتایج سوانگاری دیده می‌شوند و برای مثال اتصالاتی نظیر ۳←۱ داشته‌اند که دو گروه OH مجاور نداشته و قابل اکسید شدن نبوده است. احتمالات به دست آمده از اکسایش با پریدات، نتایج حاصل از GC-MS را تأیید خواهد کرد.

۵-۴-طیف‌سنجی فروسرخ

طیف فروسرخ به دست آمده از پلی‌ساکارید خالص طیف جامعی از انواع گروه‌های عاملی و دیگر مشخصات یک پلی-ساکارید است[۱۵]. این طیف شامل یک قله‌ی پهن است که مربوط به گروه‌های هیدروکسیل پلی‌ساکارید هستند. در طیف فروسرخ حلقه‌های تک‌ساکاریدی با تعداد اتم حلقه‌ی مشخص، طول موج‌های متفاوتی برای بروز قله‌های خود دارند و حلقه‌های فورانوزی و پیرانوزی در طول موج خاص خود جذب نشان می‌دهند[۱۵]. وجود اتصالات نوع آلفا یا بتا نیز در این طیف جذب مخصوص به خود را دارند. اطلاعات به دست آمده از طیف فروسرخ مؤید آزمون‌های دیگر برای تشخیص ساختار پلی‌ساکارید است. برای مثال طیف نشان داده شده در شکل ۵ مربوط به پلی‌ساکارید خالص شده از ریشه‌ی گیاه چوبک تماشایی است که قله‌های مربوط به گروه‌های هیدروکسیل، پیوند C-H، حلقه‌های پیرانوز، پیکربندی آلفا و بتا به ترتیب در $۳۴۱۶\ cm^{-1}$، $۲۹۲۵\ cm^{-1}$، $۱۱۵۱\ cm^{-1}$، $۸۴۶\ cm^{-1}$ و $۸۷۲\ cm^{-1}$ در آن دیده می شود[۲۸]. نبود قله‌های مربوط به پیوندهایی غیر از پیوندهای موجود در ساختار یک پلی‌ساکارید بیانگر خلوص نمونه‌ی به دست آمده است. اطلاعات مشخص شده در طیف فروسرخ در روش‌های تجزیه و شناسایی دیگر نیز به دست می آید.

شکل۵. طیف فروسرخ مربوط به پلی‌ساکارید محلول در آب خالص شده از ریشه‌ی چوبک تماشایی[۲۸]

۶-۴-درجه چرخش نوری

سابقاً قطبیت‌سنجی یکی از ضروریات در تجزیه تک‌ساکاریدها بوده است. اگرچه اکنون نیز میزان چرخش نوری در مقالات ذکر می‌شود، از کمترین اهمیت در شناسایی برخوردار است. قندها مانند هر ترکیب نامتقارن دیگری در صفحه‌ی نور قطبیده

ویرایش نشده

شده‌ی خطی، از خود چرخش نشان می‌دهند و فعالیت نوری نمونه با قطبش‌سنج مشاهده و تحت عنوان درجه‌ی چرخش α اندازه‌گیری می‌شود. امروزه، درجه‌ی چرخش نوری در تخمین خلوص سرهمپاری (آنومری) گلیکوزیدها نقش دارد زیرا پیوندهای گلیکوزیدی α و β چرخش بسیار متفاوتی نشان می‌دهند[۷].

NMR-۴-۷

طیف‌سنجی NMR نیز یکی از روش‌های بسیار سودمند برای تعیین ساختار پلی‌ساکاریدهاست و می‌تواند اطلاعات ساختاری از جمله ترکیب تک‌ساکاریدها، پیکربندی سرهم‌پار یا الگوی پیوندها و توالی واحدهای تک‌ساکاریدی را مشخص کند.

هر پلی‌ساکارید طیف منحصر به فردی در ^{13}C-NMR و ^{1}H-NMR دارد. ممکن است ^{1}H-NMR در محدوده‌ی ۳ تا ۵ ppm طیف شلوغی نشان بدهد، در نتیجه تفسیر چنین طیفی دشوار خواهد بود. در طیف ^{1}H-NMR پلی‌ساکاریدها، تمام جابه‌جایی‌ها در محدوده‌ی ppm ۱-۶ دیده می‌شود. پروتون سرهم‌پار در هر تک‌ساکارید سیگنال مشخصی با توجه به پیکربندی α یا β دارد. برای مثال بیشتر پروتون‌های سرهم‌پار α در محدوده‌ی ppm ۵-۶ و پروتون‌های سرهم‌پار β در ppm ۴-۵ دیده می‌شوند. طیف ^{1}H-NMR به دلیل فراوانی بیشتر، نسبت به ^{13}C-NMR سیگنال‌های حساس‌تری دارد در نتیجه سیگنال‌های بلند ^{1}H-NMR گاه برای محاسبات کمّی نیز استفاده می‌شود. اما طیف ^{13}C-NMR با وجود سیگنال-های ضعیف مزیت مهمی نسبت به طیف ^{1}H-NMR دارد. جابه جایی شیمیایی در این طیف در محدوده‌ی بزرگتری بروز می‌کند و هم‌پوشانی طیف قبلی را نخواهد داشت. در طیف ^{13}C-NMR سیگنال کربن سرهم‌پار در محدوده‌ی ppm ۹۰-۱۱۰ و سیگنال کربن‌های غیرسرهم‌پار در ppm ۶۰-۸۵ ظاهر می‌شود. درکل، هم‌پوشانی زیاد سیگنال‌ها موجب شده است NMR یک بعدی به تنهایی برای شناسایی ساختار پلی‌ساکاریدها و چندساکارید[۱۶]های پیچیده کافی نباشد[۲۲].

۸-۴-جمع بندی

[16] oligosaccharide

ویرایش نشده

تمام روش‌ها و آزمون‌های ذکر شده منجر به پیش بینی ساختار پلی‌ساکارید می‌شوند جمع بندی کلی از آزمون‌ها و نتایج به دست آمده از آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. آزمون‌های مربوط به شناسایی ساختار پلی‌ساکارید در صورتی به درستی پاسخ می‌دهند که پلی‌ساکارید خالص باشد. از طرفی تطابق نتیجه‌ی آزمون‌ها با یکدیگر صحت شناسایی را ثابت می‌کند. برای مثال، نسبت مولی به دست آمده از سوانگاری گازی و طیف سنجی جرمی باید برابر باشند یا مثلاً نوع اتصالات آلفا یا بتا که از آزمون‌های IR، درجه چرخش نوری و NMR به دست می آیند، باید با همدیگر تطابق داشته باشد. با دانستن نوع تک‌ساکاریدهای سازنده، تک‌ساکاریدهای زنجیره‌ی اصلی و شاخه‌ها و نسبت مولی آن‌ها مشخص می‌شود که پلی‌ساکارید موجود از چه نوعی است و می‌توان آن را نام گذاری کرد. با استفاده از وزن مولکولی به دست آمده از سوانگاری و وزن مولکولی واحدهای سازنده (طبق نسبت مولی) درجه بسپارش پلی‌ساکارید نیز محاسبه می‌شود و ساختار پلی‌ساکارید به دست خواهد آمد.

جدول ۱- جمع بندی کلی از روش‌های مورد استفاده در شناسایی ساختار پلی‌ساکارید و نتایج حاصل از آن‌ها

ویرایش نشده

۵-نتیجه گیری

پلی‌ساکاریدهای محلول در آب بسیاری با ساختار ناشناخته در طبیعت وجود دارند که به علت تفاوت ساختارشان ممکن است خواص ویژه و منحصر به فردی نیز داشته باشند. به همین دلیل دانستن ساختار این پلی‌ساکاریدهای جدید برای تعریف کاربردهای جدید و هم‌چنین درک و بهبود خواص پلی‌ساکاریدها مورد توجه پژوهشگران است. روش‌های جداسازی و خالص سازی مختلفی برای استحصال پلی‌ساکاریدهای غیر سلولزی محلول در آب وجود دارد که بنا به فراخور منبع پلی-ساکارید و موقعیت مصرف می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. پلی‌ساکارید ناشناخته پس از خالص سازیِ کامل امکان شناسایی ساختار را خواهد داشت. انواع آزمون‌های شیمیایی و دستگاهی روی پلی‌ساکارید خالص انجام می‌شود. هر کدام از

آزمون‌ها قسمتی از ویژگی‌های ساختاری پلی‌ساکارید را مشخص خواهد کرد. نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف در کنار هم، با مشخص کردن نوع و تعداد واحدهای تکرار شونده، گروه‌های عاملی، نوع پیوندها، نوع اتصالات و اتم محل اتصال منجر به پیش بینی ساختار شیمیایی پلی‌ساکارید محلول در آب خواهد شد.

مراجع

1. Norström E., Fogelström L., Nordqvist P., Khabbaz F. and Malmström E., Xylan – A Green Binder for Wood Adhesives, *Eur. Polym. J.,* **67**, 1–11, 2015
2. Liu J., Willför S. and Xu C., A Review of Bioactive Plant Polysaccharides: Biological Activities, Functionalization, and Biomedical Applications, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*., **5,** 31–61, 2015
3. Jia X., Zhang C., Qiu J., Wang L., Bao J., Wang K., Zhang Y., Chen M., Wan J., Su H, Han J. and He C., Purification, Structural Characterization and Anticancer Activity of The Novel Polysaccharides from Rhynchosia minima Root, *Carbohydr. Polym.*, **132,** 67–71, 2015
4. An N. T., Thien D. T., Dong N. T., Dung P. L. and Du N. Van., Characterization of Glucomannan from Some Amorphophallus Species in Vietnam, *Carbohydr. Polym.*, **80,** 308–311, 2010
5. Vilpoux O. and Averous L., *Starch-based Plastics, in Technology, Use and Potentialities of Latin American Starchy Tubers,* NGO Raizes and Cargill Foundation, Sao Paolo, 521–553, 2002
6. Byern J. V. and Grundwald I., *Biological Adhesive Systems from Nature to Technical and Medical Applications*, Springer, Wien/NewYork, 189-199, 2010
7. Lindhorst T. K., *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, WILEY-VCH verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 258-310. 2003
8. Belitz H. D., Grosch W. and Schieberle P., *Food Chemistry*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, Germany, 248-339, 2009
9. Walter R., *Polysaccharide Association Structures in Food*, Marcel Dekker, USA, 336-337, 1998
10. Chaplin M. F. and Kennedy J. F., *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 1994

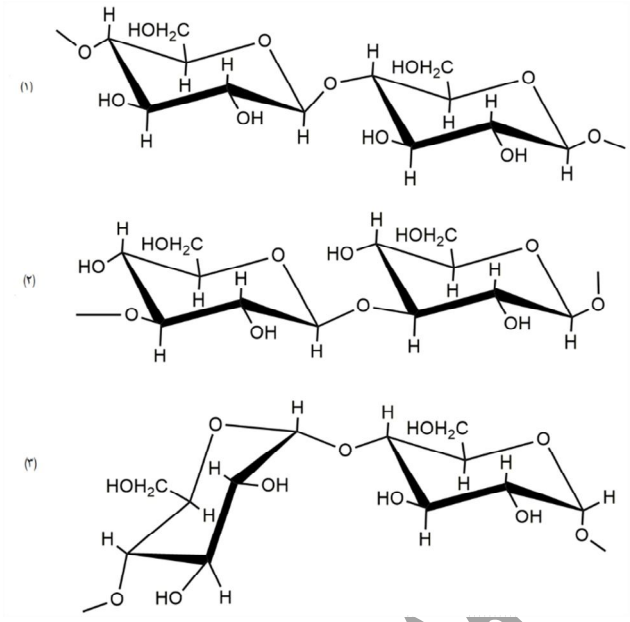
ویرایش شده

11. Du N., Tian W., Zheng D., Zhang X. and Qin P., Extraction, Purification and Elicitor Activities of Polysaccharides from Chrysanthemum indicum, *Int. J. Biol. Macromol.*, **82,** 347–354, 2016
12. *Food Polysaccharides and Their Applications*, Alistair S., PHilips M.G., Wiliams P. (Eds.), CRC Press, USA, 320-350, 2006
13. Yang R., Meng D., Song Y., Li J., Zhang Y., Hu X., Ni Y. and Li Q., Simultaneous Decoloration and Deproteinization of Crude Polysaccharide from Pumpkin Residues by Cross-linked Polystyrene Macroporous Resin, *J. Agric. Food Chem.*, **60,** 8450–8456, 2012
14. Liu J., Luo J., Sun Y., Ye H., Lu Z. and Zeng X., A Simple Method for the Simultaneous Decoloration and Deproteinization of Crude Levan Extract from Paenibacillus Polymyxa EJS-3 by Macroporous Resin, *Bioresour. Technol.*, **101,** 6077–6083, 2010
15. Izydorczyk M., *Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates,* CRC Press, USA, 1–64, 2005
16. Liu J., Sun Y., Liu L. and Yu C., A Water-Soluble Polysaccharide (EFP-AW1) from the Alkaline Extract of the Roots of a Traditional Chinese Medicine, Euphorbia fischeriana: Fraction and Characterization, *Carbohydr. Polym.*, **88,** 1299–1303, 2012
17. Staub A. M., Removal of Proteins from Polysaccharides, *Methods Carbohydr. Chem.*, **5,** 5–7, 1965
18. Younes I. Gorbel-Bellaaj O., Nasri R., Chaabouni M., Rinaudo M. and Nasri M., Chitin and Chitosan Preparation from Shrimp Shells Using Optimized Enzymatic Deproteinization, *Process Biochem.*, **47,** 2032–2039, 2012
19. *Natural Products Isolation*, Sarker S. D., Latif Z. and Gray A. I. (Eds), Humana Press Inc, New Jersy, 159–169, 2006
20. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance, *Anal. Chem.*, **28,** 350–356, 1956
21. Bradford M. M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72,** 248–254, 1976
22. *Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties and Applications,* Cui S. W. (Ed), Taylor and Francis Group, USA, 58–167, 2005
23. Liu Y. and Wang F., Structural Characterization of An Active Polysaccharide from

Phellinus ribis, *Carbohydr. Polym.*, **70,** 386–392, 2007

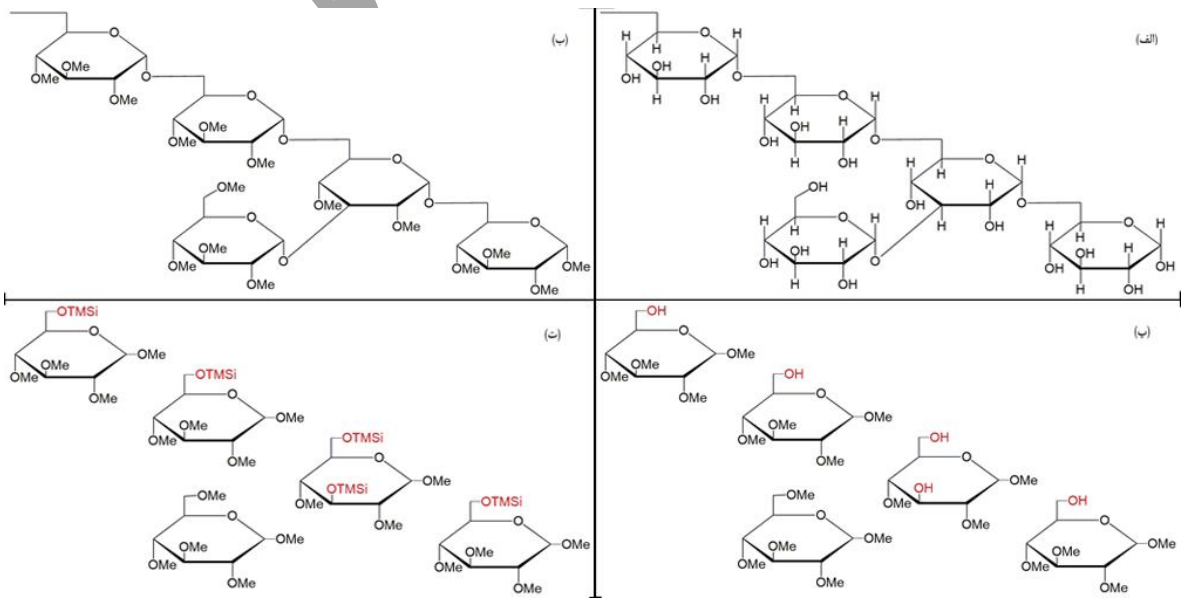
24. Walford S. N., Gc-Ms As a Tool for Carbohydrate Analysis in a Research Envirnoment, *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, **27,** 1–15, 2010
25. Du Clou H. and Walford S. N., An Introduction to Gas Chromatography Mass Spectroscopy for the Structural Elucidation of Polysaccharides from Sugar Processing Streams, *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.*, **83,** 392–409, 2010
26. Sassaki G. L., Iacomini M. and Gorin P. A. J., Methylation-GC-MS Analysis of Arabinofuranose- and Galactofuranose-Containing Structures: Rapid Synthesis of Partially O-Methylated Alditol Acetate Standards, *An. Acad. Bras. Cienc.*, **77,** 223–234, 2005
27. Sun Y., Li T. and Liu J., Structural Characterization and Hydroxyl Radicals Scavenging Capacity of a Polysaccharide from the Fruiting Bodies of Auricularia polytricha, *Carbohydr. Polym.*, **80,** 378–381, 2010
28. Jahanbin K., Gohari A. R., Moini S., Emam-Djomeh Z. and Masi, P., Isolation, Structural Characterization and Antioxidant Activity of a New Water-Soluble Polysaccharide from Acanthophyllum bracteatum Roots, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49,** 567–572, 2011

ویرایش شده

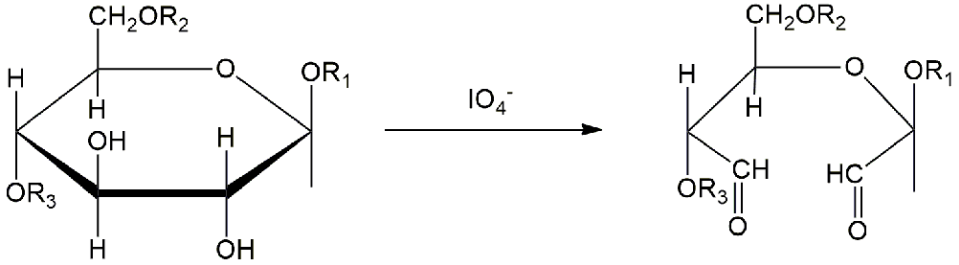


شکل ۱. ساختار پلی‌ساکاریدهای متشکل از گلوکز ۱)سلولز، ۲)کوردلان و ۳)آمیلوز [۹]

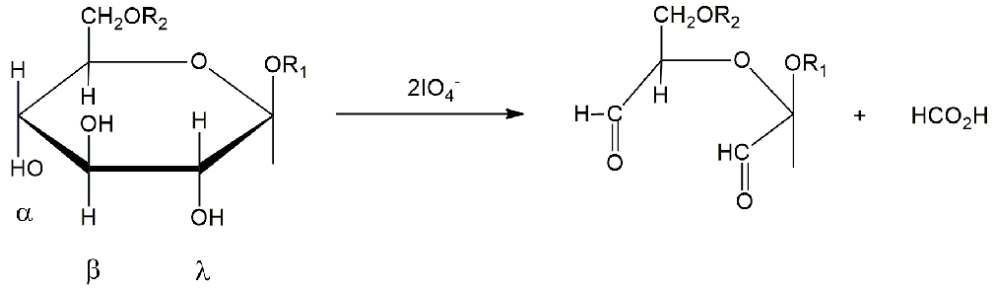
ویرایش نشده



شکل ۲. الف) ساختار اصلی، ب) جانشینی گروه‌های هیدروکسیل با متیل در اثر متیله شدن، پ) متانول کافت و ت) جانشینی گروه های هیدروکسیل جدید با تری متیل سیلیل ئر اثر سایلیله شدن[۲۴]

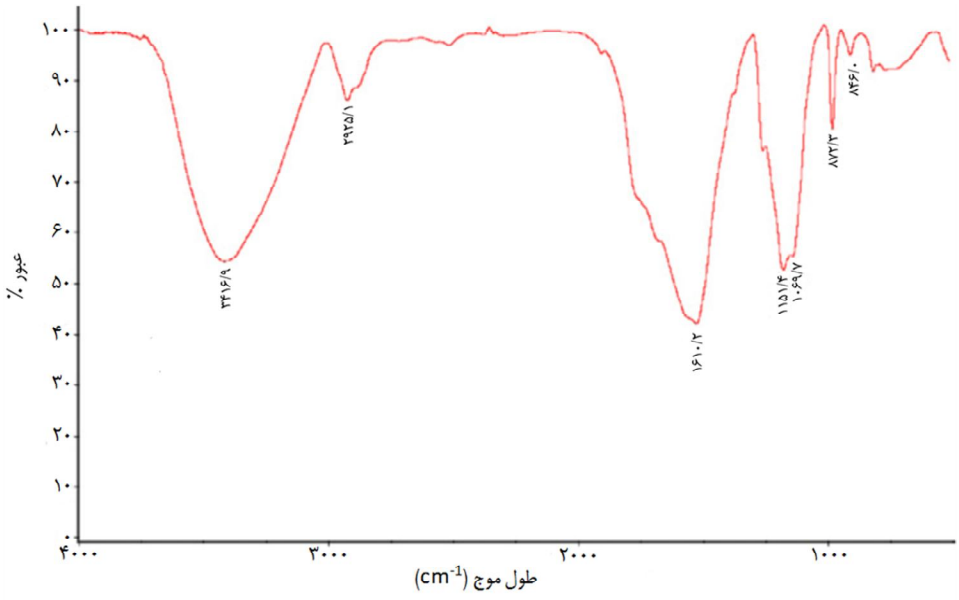


شکل ۳. مصرف یک مول پریدات به ازای دو گروه هیدروکسیل مجاور حین اکسایش با پریدات[۲۲]



شکل ۴. مصرف ۲ مول پریدات و تولید ۱ مول فرمیک اسید به ازای سه گروه هیدروکسیل مجاور حین اکسایش با پریدات[۲۲]

ویرایش نشده



شکل۵. طیف فروسرخ مربوط به پلی‌ساکارید محلول در آب خالص شده از ریشه‌ی چوبک تماشایی[۲۸]

ویرایش نشده

جدول ۱- جمع بندی کلی از روش‌های مورد استفاده در شناسایی ساختار پلی‌ساکارید و نتایج حاصل از آن‌ها

روش یا دستگاه	نتایج حاصل
GC	نوع تک ساکاریدها و نسبت مولی آنها
HPGPC	وزن مولکولی
GC-MS	نسبت مولی تک ساکاریدها-شماره اتم اتصال-نوع تک ساکاریدها-تعداد اتم حلقه
درجه چرخش نوری	تعیین کثرت اتصالات نوع آلفا یا بتا
طیف سنجی فروسرخ	گروه های عاملی-تعداد اتم حلقه-نوع اتصالات-پیوندهای اتری و...
آبکافت اسیدی ناقص	تعیین ننوع واحدهای سازنده زنجیر اصلی و شاخه ها-نسبت مولی آنها در هر بخش ساختار
اکسایش با پریدات	مشخص کردن احتمال وجود برخی از اتصالات
NMR	ترکیب تک ساکاریدها- پیکربندی سرهم پار-الگوی پیوندها-توالی واحدهای تک ساکاریدی