

مطالعه طیف‌سنجی برهم‌کنش زانتان-قرمز کنگو و عوامل مؤثر بر آن

سیده زهرا موسوی‌نژاد^۱

شیرین محمودی^۲

محمد رضا صعودی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۰۳

تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۲۲

چکیده

زانتان، پلی‌ساکارید خارج‌سلولی باکتری بیماری‌زای گیاهی *Xanthomonas campestris*، در صنایع گوناگون به ویژه نفت، غذا و دارو کاربردهای فراوانی پیدا نموده است. از این رو دستیابی به روش‌های ساده و ارزان برای اندازه‌گیری غلظت زانتان در محلول‌ها بسیار ارزشمند است. در این پژوهش تاثیر کمی اتصال زانتان بر روی طیف جذبی قرمز کنگو بررسی شده است. نتایج نشان دادند که حضور زانتان سبب هیپوکروموسیتی (کاهش شدت جذب در طول موج ماکزیمم) در طیف جذبی قرمز کنگو می‌شود. همچنین مشاهده شد که پیش از انجام اسپکتروفتومتری، نگاه داشتن محلول زانتان برای مدت یک روز برای پایداری آن لازم بوده و وارونه کردن ساده همزنی سریع و مناسبی را برای اختلاط محلول‌های رنگی و زانتان فراهم می‌آورد. بهترین نتایج در غلظت‌های ۴۰ تا ۸۰ میکروگرم در لیتر قرمز کنگو و طول موج ۴۹۲ نانومتر در تمامی غلظت‌های مورد بررسی از زانتان بدست آمد. گرمادهی به محلول زانتان در 121°C

۱. دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

۲. دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی

۳. دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی (نویسنده مسئول) / msoudi@yahoo.com

جذب آن را بدون تغییرات قابل توجه در الگوی آن تحت تأثیر قرار داد. این اطلاعات پایه می‌تواند زمینه را برای ارائه یک روش طیف‌سنجی به منظور اندازه‌گیری پلیمر زیستی زانتان فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: زانتان، پلی ساکارید، قرمزکنگو، برهم‌کنش، طیف‌سنجی

۱- مقدمه

در صنایع گوناگون کاربردهای فراوانی یافته است (Sharma, 2006). علاوه بر این، زانتان فعالیت‌های زیستی دیگری مانند کاهش دادن اسیداوریک، اوره و کلسترول نیز دارد (Soh, et al. 2003). در پزشکی و داروسازی زانتان به عنوان جزئی از هیدروژل‌ها به کار می‌رود. به‌طور کلی زانتان می‌تواند ژل‌های فیزیکی و شیمیایی تشکیل دهد. ژل‌های فیزیکی معمول که در محلول‌های غلیظ این پلی‌ساکارید ایجاد می‌شوند، ناپایدارند. فرآیند ژله‌ای شدن زانتان معمولاً برگشت پذیر است و با گرم‌دادن یا رقیق کردن ژل‌های فیزیکی، زانتان می‌تواند به راحتی در محلول‌های آبی حل شود (Capron, et al. 2001 و Sharma, 2006). در صنایع کشاورزی نیز زانتان در قارچ‌کش‌ها، حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها به کار می‌رود (Garcia et al., 2003). از آنجا که زانتان در صنایع گوناگون مانند نفت، غذا و دارو کاربردهای فراوانی یافته است، اندازه‌گیری مقدار زانتان در محلول‌ها بسیار ارزشمند است. روش‌های مختلفی برای این منظور وجود دارد: روش‌های دقیق ولی وقت‌گیر و پرهزینه مانند NMR و FTIR (Tavallaie et al., 2011)، روش‌های آسان و کم‌هزینه مانند سنجش جرمی زانتان

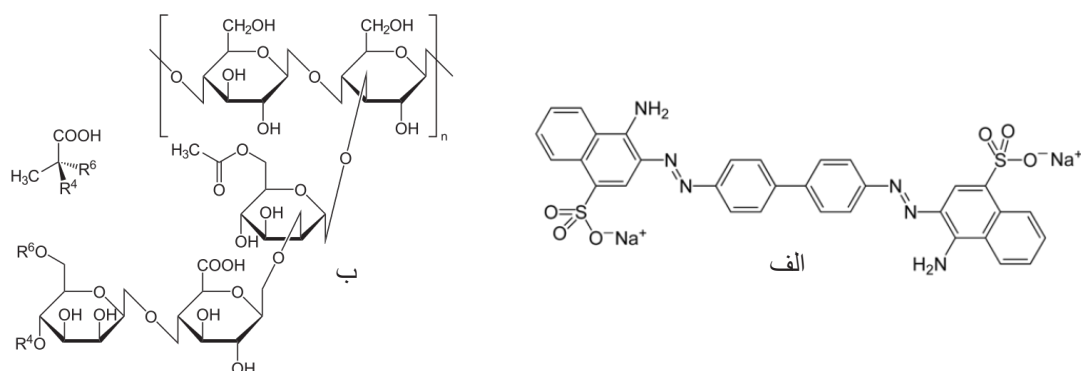
زانتان پلی‌ساکارید خارج‌سلولی باکتری بیماری‌زای گیاهی *Xanthomonas campestris* و برخی دیگر از گونه‌های منسوب به آن است (Kang, 1979 و Rogovin, et al. 1969). اسکلت سلولزی این پلی‌ساکارید پیوندهای $\beta(1\rightarrow4)$ دارد و بر روی کربن شماره ۳ گلوکز، دارای شاخه جانبی متشکل از ۳ قند مانوز (داخلی)، گلوکورونیک اسید و مانوز (انتهایی) است که مانوزهای داخلی و انتهایی، به ترتیب استیله و پیروویله هستند (Jansson, 1975). مقدار استیل‌دار شدن و پیروویل‌دار شدن، به سویه باکتریایی و شرایط رشد آن بستگی دارد. اما به طور کلی در حدود ۶۰٪ از واحدهای دور پیروویله شده‌اند. گلوکورونیک اسید و گروه پیرووات شاخه جانبی به ساختار زانتان بار آنیونی می‌دهند. برهم‌کنش این شاخه‌های آنیونی با اسکلت پلیمر و با خودشان موجب پیدایش خواص منحصر به فردی در محلول‌های زانتان می‌شود (Jansson, et al. 1976). به علت آن‌که این پلی‌ساکارید در گستره وسیعی از دما و pH خواص رئولوژیکی^۱ و پایداری بسیار زیادی دارد،

۱. علم مربوط به مطالعه تغییر شکل مواد

رنگ‌ها می‌توان به قرمز کنگو، اشاره کرد که یک ساختار دی‌آزونمک‌سدیم و محلول در آب است. حلالیت این ماده در حلال‌های آلی مانند اتانول بیشتر از آب است و در این حلال‌ها ایجاد یک محلول کلوئیدی قرمز می‌کند (Zhang, et al. 2006). این رنگ دارای کاربردهای عمده‌ای در صنعت نساجی و همچنین در روش‌های آزمایشگاهی بیوشیمی و میکروبیولوژی است. قرمز کنگو (شکل ۱ الف) علاوه بر حساسیت به تغییرات pH، یکی از رنگ‌های رایج در بافت‌شناسی نیز هست و مدتی است که به خصوص به دلیل میانکنش ویژه‌اش با فیبرهای آمیلوئیدی، کاربرد بسیاری در بررسی بیماری‌های تخریب‌کننده بافت عصبی (neurodegenerative diseases) پیدا کرده است (Wood, 1980). علاوه بر این، کاربرد قدیمی‌تر آن در مطالعات مربوط به پلی‌ساکاریدها بوده است به طوری که اتصال سلولز، باعث تغییراتی در طیف جذبی آن می‌شود (Kasana, et al. 2008). گزارشی نیز از اثر اتصال زانتان بر طیف فلئورسانس قرمز کنگو وجود دارد (Wood, 1980). در این پژوهش تاثیر اتصال زانتان (شکل ۱ ب) به عنوان یک پلی‌ساکارید کاربردی، بر روی طیف جذبی قرمز کنگو به طور کمی بررسی شده است. در صورت وجود چنین تأثیری، می‌توان از قرمز کنگو به عنوان ابزاری برای اندازه‌گیری مقدار زانتان در محلول‌ها و همچنین بررسی تغییرات تراکم آن تحت تأثیر فعالیت آنزیم‌های مربوط به زانتان استفاده نمود.

قرمز کنگو ویژگی‌های طیف‌سنجی مهمی دارد که آن را برای کاربردهای فوق مناسب ساخته است: طیف جذبی آن در محلول‌های

به وسیله حلال آلی، اندازه‌گیری میزان ویسکوزیته و استفاده از برخی رنگ‌ها که به صورت اختصاصی به ساختارهایی با پیوندهای D-β گلوکان متصل می‌شوند. از میان این رنگ‌ها می‌توان به قرمز کنگو اشاره کرد (Roy, 2009). برخی از رنگ‌ها به صورت اختصاصی به ساختارهایی با پیوندهای D-β گلوکان، یا پلی‌ساکاریدهای آنیونی متصل می‌شوند. به عنوان مثال در جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده کربوکسی متیل سلولز، از ترکیب هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برومید استفاده می‌شود، این ترکیب در اطراف کربوکسی متیل سلولز تجزیه نشده رسوب می‌کند ولی در صورت تجزیه این ترکیب ایجاد یک هاله شفاف می‌کند (Steensma, 2001). علاوه بر این ترکیب، آلسیان بلو نیز یک رنگ کاتیونی هیدروفیل است که شاخه جانبی آن با گروه‌های کربوکسیل پلی‌ساکاریدهای اسیدی مانند زانتان واکنش می‌دهد و ایجاد یک ترکیب رنگی نامحلول می‌کند. انتخاب‌پذیری رنگ می‌تواند از طریق تغییر دادن pH آن و یا مقدار نمک رنگ کنترل شود (Hankin, 1977). به طوری که این رنگ در حالت محلول در pH 2/5، بدون حضور الکترولیت‌های دیگر، گروه‌های کربوکسیل پلی‌ساکاریدهای اسیدی و پلی‌ساکاریدهای سولفات‌ی را رنگ نموده ولی بر ترکیبات پلی‌ساکاریدی خنثی بی‌اثر است. این رنگ در پزشکی و زیست‌شناسی برای رنگ‌آمیزی ترکیبات گلیکوزآمین در خون یا ادرار و ترکیبات پلی‌ساکاریدی خارج سلولی جلبک‌ها و کپسول باکتری‌ها به کار می‌رود (Whiteman, 1973 و Ramus, 1977) و (Lomnol, 1995 و Reinke, 2011). از دیگر



شکل ۱. ساختار شیمیایی مولکول‌های مورد واکنش / الف. قرمز کنگو، ب. زانتان

زانتان و اثر آنها بر طیف جذبی قرمز کنگو، اطلاعات پایه به منظور ارائه یک روش کمی برای اندازه‌گیری تراکم زانتان به وسیله قرمز کنگو فراهم شود. برقراری رابطه کمی بین جذب مرئی قرمز کنگو و مقدار زانتان، منجر به ارائه روشی ساده و ارزان برای اندازه‌گیری تغییرات تراکم زانتان در محلول‌های آن خواهد شد.

۲- مواد و روش‌ها

قرمز کنگو از شرکت سیگما و نمونه زانتان (food grade) از شرکت گام تک (تبریز) تهیه شد.

نظر به این‌که زانتان خشک به سختی در آب حل می‌شود، محلول‌های زانتان به مدت ۱-۳ ساعت در دمای 35°C روی هم‌زن مغناطیسی همزده شدند. در محلول‌های غلیظ‌تر، به دلیل خاصیت فیزیکی محلول زانتان، حباب‌های بسیاری تشکیل می‌شود که اندازه‌گیری حجم برداشت‌شده را دشوار و پر خطا می‌کند. این حباب‌ها در محلول‌های رقیق زانتان وجود ندارند. محلول قرمز کنگو در آب با غلظت $200 \text{ M}\mu$ تهیه شد.

آبی در طول موج 492 nm دارای یک قله است. اتصال این رنگ به فیبرهای آمیلوئیدی سبب جابه‌جایی قرمز، در این طول موج می‌شود. همچنین به دلیل برهم‌کنش قرمز کنگو با فیبرهای سلولزی، در روش رنگ‌آمیزی محیط کشت جامد در ظروف پتری از آن استفاده می‌شود (Steensma, et al. 2001). به جز سلولز، پلی‌ساکارید زانتان نیز با داشتن اسکلت $\beta\text{-D}$ -گلوکان، هدف خوبی برای اتصال قرمز کنگو است و به همین جهت، برای شناسایی سویه‌های میکروبی که آنزیم‌های تجزیه‌کننده زانتان را تولید می‌کنند، از رنگ‌آمیزی قرمز کنگو استفاده می‌شود. این روش رنگ‌آمیزی یک روش کیفی شناسایی زانتان است. حسن استفاده از این رنگ این است که برهم‌کنش مستقیم آن با پیوندهای $\beta\text{-D}$ -گلوکان سبب ایجاد یک سیستم سریع و حساس برای سنجش فعالیت سویه‌های باکتریایی دارای فعالیت‌های $(1\rightarrow4)$ β و $(1\rightarrow3)$ $\beta\text{-D}$ -گلوکانو هیدرولازی می‌شود (Zhang, et al. 2006).

در این مقاله تلاش شده است با بررسی عوامل مؤثر روی برهم‌کنش قرمز کنگو و

۲-۱- طیف‌سنجی محلول‌های زانتان

همه آزمایش‌های طیف‌سنجی و اندازه‌گیری جذب با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر دو پرتوی (Shimadzu-model TCC-240AO) در دمای 25 °C انجام شد. با توجه به اینکه طول موج جذبی مورد نظر در گستره طول موج‌های مرئی است و محلول‌ها نیز خورنده نبوده‌اند، در همه آزمایش‌ها از کووت‌های یک بار مصرف استفاده شد. محلول‌های رقیق زانتان و قرمز کنگو با استفاده از رقیق‌کردن محلول‌های مادر با آب مقطر به دست آمد و پس از اختلاط در حجم‌های برابر (400 μl) در زمان معین (حداکثر ۱۵ دقیقه) طیف‌سنجی شدند.

۲-۲- بررسی اثر عوامل محیطی بر سنجش زانتان

آزمون‌های جذب قرمز کنگو توسط زانتان در دو حالت بیو پلیمر گرمادیده (اتوکلاو شده در 121 °C به مدت ۱۵ دقیقه) و بدون گرما و با زمان‌های متفاوت برای به تعادل رسیدن برهم کنش (تا ۱ هفته) و در غلظت‌های مختلف (-1g.L) از محلول زانتان ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۷۵، ۲، ۳، بررسی شدند. از آب مقطر به عنوان شاهد استفاده شد و همه آزمایش‌ها حداقل با دو بار تکرار انجام شدند.

۲-۳- محاسبات طیف‌ها

برای ارزیابی اثر حضور زانتان بر طیف جذبی قرمز کنگو، ابتدا دو طیف جذبی، یکی مربوط به محلول ۰/۱۵ درصد زانتان (X) و دیگری طیف جذبی مخلوط قرمز کنگو و زانتان (CR+X) با غلظت‌های به ترتیب Mμ و 100 و ۰/۱۵ درصد به دست آمد و سپس

طیف تفاضل آنها (CR_{cal}) محاسبه شد:

$$(CR+X) - (X) = CR_{cal}$$

تفاضل طیف محاسبه شده قرمز کنگو (CR_{cal}) با طیف حقیقی قرمز کنگو 100 Mμ (CR_{ex}) به عنوان ΔCR برای ارزیابی اثر حضور زانتان استفاده شد.

$$\Delta CR = CR_{ex} - CR_{cal}$$

مقدار صفر ΔCR به معنی بی اثر بودن حضور زانتان بر طیف قرمز کنگو است. دارا بودن علامت مثبت یا منفی مقادیر، به ترتیب به معنی هیپوکروموسیتی و هیپرکروموسیتی است.

۳- بررسی اثر عوامل محیطی بر سنجش

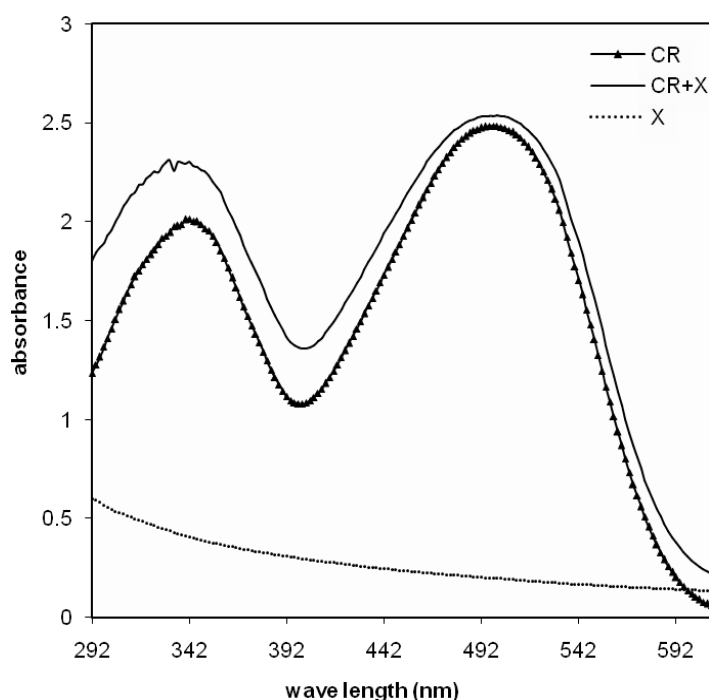
۳-۱- آنالیز داده‌ها

همه آزمایش‌ها حداقل ۲ بار تکرار شدند. آنالیز آماری آنها برای ترسیم خطا (error bar) و تعیین ضریب رگرسیون (R²) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

۴- نتایج و بحث

۴-۱- اثر حضور زانتان بر طیف جذبی قرمز کنگو

اولین مرحله در این پژوهش مشخص نمودن این بود که آیا حضور زانتان بر طیف جذبی قرمز کنگو اثر می‌گذارد و در این صورت کیفیت آن چگونه می‌باشد. به این منظور طیف جذبی محلول زانتان در آب (۰/۱۵ درصد) و قرمز کنگو ۱۰۰ (میکرومولار) به طور جداگانه به دست آمد و سپس طیف آنها با طیف مخلوط زانتان و قرمز کنگو با همین غلظت‌ها مقایسه شد (شکل ۲). همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود حضور زانتان باعث تغییر در طول موج



شکل ۲. تغییرات پیوسته در طیف جذبی محلول‌های قرمز کنگو، زانتان و مخلوط قرمز کنگو-زانتان در طول موج‌های ۲۹۲ تا ۶۰۰ نانومتر

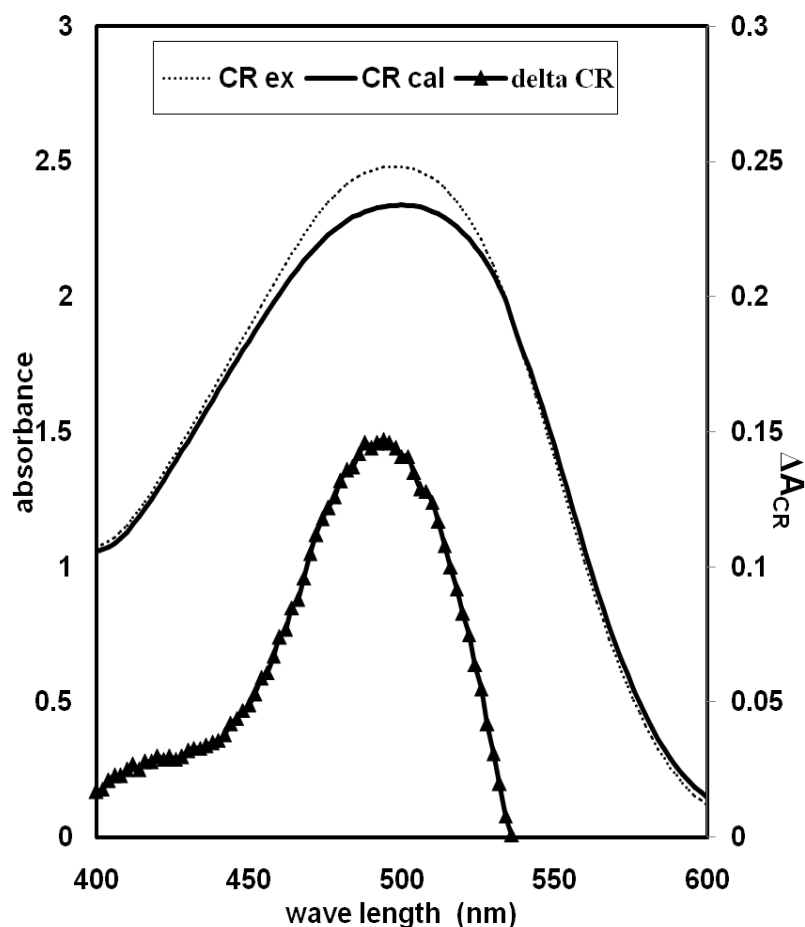
به قرمز کنگو باعث کاهش جذب قرمز کنگو در بیشتر طول موج‌ها می‌شود ($CR_{cal} < CR_{ex}$). مقدار این کاهش در طول موج ۴۹۲ نانومتر بیشترین مقدار را نشان داد (شکل ۳، طیف ΔCR). بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که وجود زانتان باعث هیپوکروموسیتی در طیف جذبی قرمز کنگو به خصوص در طول موج ۴۹۲ نانومتر می‌شود و طول موج ۴۹۲ نانومتر برای بررسی حضور زانتان مناسب است. در آزمایش‌های بعد اثر عوامل مختلف بر افت جذب ۴۹۲ نانومتر طیف قرمز کنگو، ناشی از زانتان ارزیابی شد.

۴-۲- اثر روش مخلوط کردن با زانتان بر

طیف جذبی قرمز کنگو

یکی از ویژگی‌های مهم فیزیکی بیوپلیمر زانتان، ویسکوزیته بسیار زیاد آن است و

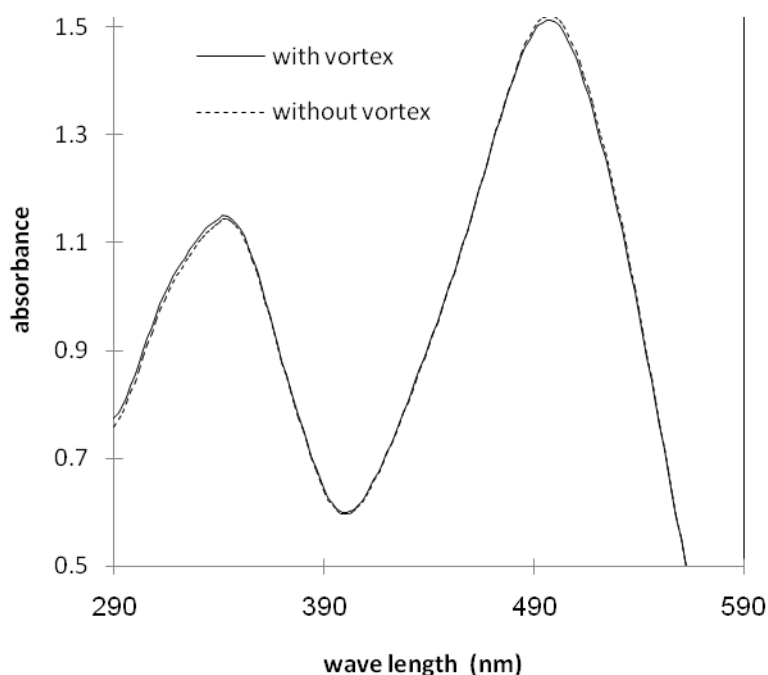
حداکثر جذب (λ_{max}) قرمز کنگو نشد و به عبارت دیگر انحراف بسوی طول موج‌های بلند یا کوتاه (جابه‌جایی قرمز یا جابه‌جایی آبی) رخ نداد. اما بررسی‌های فراتر احتمال رخداد هیپوکروموسیتی (hypocromicity) یا هیپرکروموسیتی (hyperchromicity) را نشان داد. در صورتی که زانتان و قرمز کنگو با هم میان‌کنشی نداشته باشند، طیف جذبی مخلوط آنها باید حاصل جمع جبری طیف‌های هر یک به تنهایی باشد. به عبارت دیگر، طیف واقعی قرمز کنگو (CR_{ex}) بر تفاضل طیف مخلوط قرمز کنگو-زانتان ($CR+X$) و طیف زانتان (X) که آن را طیف محاسباتی (CR_{cal}) می‌نامیم، منطبق باشد ($CR_{ex} = CR_{cal}$). در شکل ۳ این مقایسه انجام شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود طیف CR_{ex} و CR_{cal} بر هم منطبق نیستند و افزودن زانتان



شکل ۳. تغییرات طیف جذبی قرمز کنگو تحت تأثیر حضور زانتان در طول موج‌های ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر. طیف تجربی محلول قرمز کنگو (ex)، طیف هیپوکروم محاسباتی محلول قرمز کنگو ناشی از اختلاط با زانتان (cal) و میزان تفاضل (ΔA_{CR}).

ورتکس، مخلوط دو ماده فوق به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. شکل ۴ طیف جذبی قرمز کنگو را پس از مخلوط کردن با دو روش فوق نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نوع مخلوط کردن اثری بر طیف جذبی قرمز کنگو ندارد و با روش وارونه‌کردن نیز محلول ویسکوز زانتان به خوبی با محلول قرمز کنگو در آب مخلوط می‌شود. از این روش مخلوط کردن در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

بسیاری از کاربردهای آن در صنایع دارویی و غذایی مبنی بر همین ویژگی است (Garcia, et al. 2003). به این دلیل رقیق کردن محلول مادر (stock) نیازمند دقت بسیار است. به منظور بررسی شرایط اپتیمم مخلوط کردن محلول غلیظ زانتان با محلول قرمز کنگو در آب، دو روش مخلوط کردن شامل وارونه کردن و ورتکس کردن و تأثیر آنها بر طیف جذبی قرمز کنگو با ۲ روش مقایسه شدند. در روش وارونه کردن پس از افزودن دو ماده به یکدیگر با وارونه کردن مکرر ظرف، مخلوط یکنواختی حاصل شد. در روش



شکل ۴. مقایسه طیف جذبی زانتان- قرمز کنگو با ورتکس کردن و بدون ورتکس

رنگ در ژل آگار لازم باشد. با توجه به این‌که در آزمون‌های این پژوهش هر دو ماده قرمز کنگو و زانتان به حالت محلول و آزاد هستند و به راحتی به یکدیگر دسترسی دارند، ممکن است نیازی به زمان ۱۵ دقیقه برای مشاهده اثر زانتان بر طیف قرمز کنگو نباشد. از سوی دیگر این احتمال نیز وجود دارد که ۱۵ دقیقه، زمان لازم برای تکمیل میانکنش بین مولکول‌های زانتان با قرمز کنگو باشد. در این صورت، آزاد بودن مولکول‌های آنها در محلول، اثری بر سینتیک واکنش نداشته و باز هم ۱۵ دقیقه زمان برای میانکنش آنها لازم خواهد بود. پیگیری طیف جذبی قرمز کنگو پس از افزودن زانتان تا ۱۵ دقیقه نشان داد که اثر حضور زانتان در ثانیه اول رخ می‌دهد و پس از آن طیف قرمز کنگو تغییر نمی‌کند، به طوری که جذب 0.932 در طول موج 492 نانومتر مربوط به قرمز کنگو، با گذشت زمان

۳-۴- اثر زمان مجاورت با زانتان بر طیف جذبی قرمز کنگو

در غالب پژوهش‌های مربوط به میانکنش رنگ پلی‌ساکارید از جمله جداسازی سویه‌های مولد زایلاناز، سلولاناز، زانتاناز آزمایش سنجش کیفی پلی‌ساکارید مربوط در مخلوط آن با آگار در پلیت (plate assay)، پس از افزودن محلول قرمز کنگو به سطح پلیت، ۱۵ دقیقه زمان داده می‌شود تا واکنش رنگ با پلی‌ساکارید انجام گیرد (Parker, et al. 1966 و Steensma, et al. 2001). اگرچه بر اساس پژوهش‌های انجام شده بین پلیمرهای زیستی مانند زانتان و گالاکتومانان و زانتان و کیتوزان برهم‌کنش رخ می‌دهد (Hamcerence, 2007, Alwinpremanand, et al. 2008)، اما اطلاعاتی در مورد میانکنش زانتان و آگار بدست نیامده است. لذا فرض بر این است که زمان مزبور فقط برای نفوذ

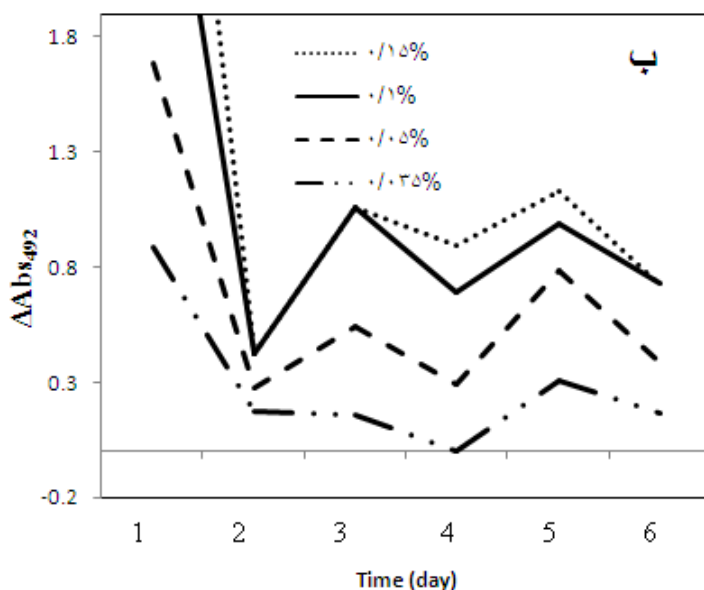
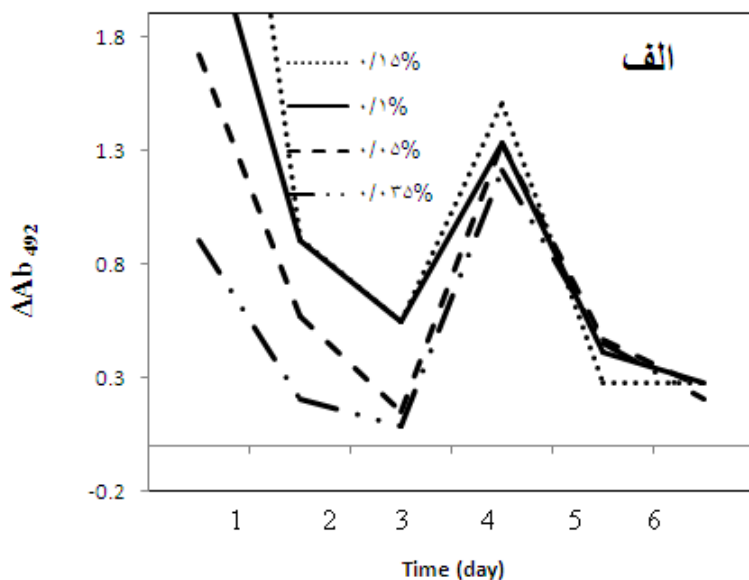
است و با نگهداری آن به مدت یک هفته، بعضی از پارامترهای فیزیکی شیمیایی آن تغییر می‌کند (Jeffrey, 1980). با فرض آنکه هر سه پارامتر فوق (اتوکلاو کردن، غلظت زانتان و زمان نگهداری آن) بر روی میانکنش آن با قرمز کنگو اثر می‌گذارد، تغییر جذب $492\Delta A$ نانومتر (قرمز کنگو در حضور غلظت‌های متفاوت زانتان (اتوکلاو شده و نشده) بررسی شد و این اثر، تا یک هفته پس از تهیه محلول‌های زانتان پیگیری شد (شکل ۵). محور Y تغییر A_{492} قرمز کنگو را پس از افزودن زانتان نشان می‌دهد. محور X زمان‌های نگهداری محلول زانتان و اعداد روی نمودار، مربوط به روز تهیه محلول زانتان است. همان‌طور که در شکل (۵ الف) و (۵ ب) دیده می‌شود، بیشترین تغییر جذب در $492\Delta A$ نانومتر، مربوط به روز اول (روز تهیه محلول زانتان) است. اما با توجه به دشواری و زمان‌بر بودن عملیات حل کردن زانتان، روز اول به عنوان بهترین روز استفاده از محلول زانتان معرفی نمی‌شود، به ویژه آنکه محلول‌های زانتان هر کدام جداگانه تهیه شدند و محلول‌های با غلظت‌های متفاوت حاصل رقیق‌سازی محلول‌های غلیظ‌تر نیستند. از سویی هر دو شکل (۵ الف) و (۵ ب) (به خصوص شکل ۵ الف) در روزهای متوالی، نوسان زیادی در $492\Delta A$ نشان می‌دهند. با توجه به کنفورماسیون‌های مختلف سه‌بعدی و شبکه‌ای این پلیمر، نوسانات فوق می‌توانست قابل پیش‌بینی باشد. بنابراین با توجه به نتایج بالا و حباب‌هایی که در محلول‌های غلیظ زانتان باعث خطا در اندازه‌گیری حجم می‌شوند، برای میانکنش با قرمز کنگو، غلظت ۰/۰۷ درصد برای محلول

ثابت بوده و بنابر این نمایش نتایج ضرورت نداشت. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که سینتیک میانکنش این دو ماده با یکدیگر بسیار سریع است و زمان ۱۵ دقیقه تنها به منظور نفوذ رنگ در ژل بهنگام سنجش پلیت لازم بوده و رعایت آن در مورد محلول‌ها ضرورت ندارد. در آزمایش‌های بعدی این مقاله، طیف مخلوط زانتان و قرمز کنگو بلافاصله پس از تهیه مخلوط آنها گرفته شد.

۴-۴- اثر دما و غلظت بر میانکنش زانتان با قرمز کنگو

همه هیدروژل‌های بیولوژیک از جمله پلی‌ساکاریدزانتان می‌توانند شبکه سه‌بعدی از ساختارهای مارپیچی تشکیل دهند (Davidm, 1986). این شکل‌های مختلف پلیمری (شامل پلیمر تک‌زنجیره، دو زنجیره مارپیچ و شبکه‌ای)، خواص فیزیکی شیمیایی متعددی به زانتان می‌دهند که تفسیر آزمایش‌ها و تکرارپذیری آن‌ها را دشوار می‌کند. کنفورماسیون زانتان به شدت تابع عوامل مختلف محیطی مانند دما است (Zhang, et al. 2006). در این پژوهش اثر اتوکلاو کردن زانتان بر میانکنش زانتان با قرمز کنگو ارزیابی شد. از سوی دیگر، نظر به این‌که بر اساس گزارش‌های قبلی، اثر دما بر کنفورماسیون زانتان و شبکه سه‌بعدی حاصل از آن تابع غلظت زانتان است (Bejenariu, et al. 2010, Matsuda, et al. 2009)، آزمایش فوق با استفاده از غلظت‌های مختلف زانتان تکرار شد. علاوه بر عامل دما و غلظت زانتان، گزارش‌ها نشان می‌دهند که برخی از تغییرات در ساختار سه‌بعدی و شبکه‌ای زانتان، برگشت‌پذیر

استوک زانتان اتوکلاو نشده (غلظت نهایی ۰/۰۳۵ درصد) در روز دوم پس از تهیه آن، انتخاب شد و پس از آن، در آزمایش‌های بعدی از چنین محلول زانتان استفاده شد.



شکل ۵. اثر دما بر روی طیف جذبی زانتان، قرمز کنگو / (الف: زانتان اتوکلاو نشده، ب: زانتان اتوکلاو شده)

درصد) میانگینش داده شد و جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۹۲ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. با توجه به این‌که قرمز کنگو، خود در این طول موج جذب دارد

۴-۵- اثر غلظت‌های مختلف قرمز کنگو برای یافتن غلظت(های) مناسب قرمز کنگو در میانگینش با زانتان، غلظت‌های مختلف قرمز کنگو با غلظت ثابتی از زانتان (۰/۰۳۵

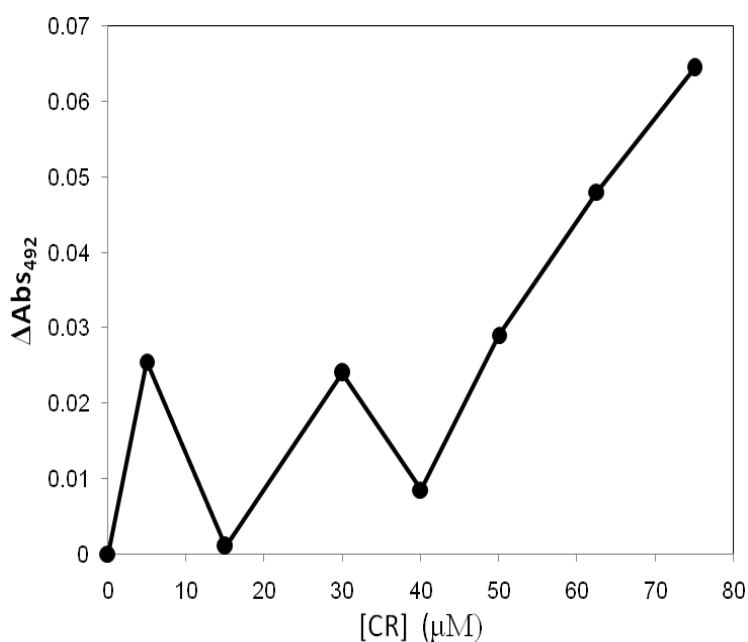
به صورت عدد مثبت محاسبه می‌شود. همان‌طور که در شکل ۶ دیده می‌شود در غلظت‌های کمتر از 40 M μ قرمز کنگو، روند ثابتی در مقدار این کاهش وجود ندارد و نوسان شدید نشان می‌دهد. اما در غلظت‌های بالاتر تا حدود 80 M μ قرمز کنگو، روند افزایشی در تغییرات جذب ۴۹۲ نانومتر ظاهر می‌شود. بنابراین با افزایش غلظت قرمز کنگو در این گستره غلظتی، زانتان ۰/۰۳۵٪ تغییرات بیشتری در جذب ۴۹۲ نانومتر را ایجاد می‌کند.

تغییرات غلظت قرمز کنگو خواه‌ناخواه منجر به افزایش جذب در ۴۹۲ نانومتر می‌شود و باید این اثر را از جذب کل کم کرد. بنابراین مقدار کاهش $A_{492}(\Delta Abs_{492})$ (که به دلیل حضور زانتان رخ می‌دهد) در هر غلظت از قرمز کنگو به صورت زیر تعریف می‌شود.

$$\Delta Abs_{492} =$$

-(جذب ۴۹۲ نانومتر قرمز کنگو)

(جذب ۴۹۲ نانومتر مخلوط قرمز کنگو و زانتان)
از آنجا که زانتان باعث کاهش جذب قرمز کنگو می‌شود، جمله اول بزرگتر یا مساوی جمله دوم خواهد بود و مقدار کاهش



شکل ۶. اختلاف جذب قرمز کنگو محاسباتی (CR_{cal}) و تجربی (CR_{ex}) به عنوان تابعی از غلظت قرمز کنگو

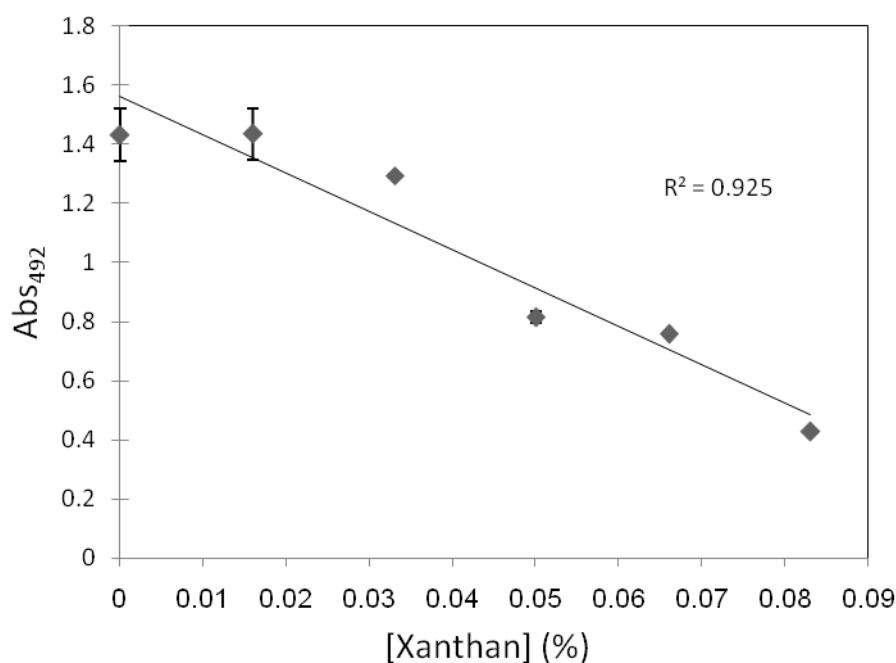
شود. در شکل ۷ نشان داده شده است که رابطه کاهش جذب ۴۹۲ نانومتر قرمز کنگو با مقدار زانتان (حداقل در دامنه غلظت‌های مورد بررسی) خطی است و هر چه غلظت زانتان بیشتر باشد، مقدار کاهش جذب ۴۹۲ قرمز کنگو به طور خطی بیشتر می‌شود.

۴-۶- اثر تغییر غلظت زانتان

با توجه به هدف این پژوهش که بررسی امکان استفاده از یک روش رنگ‌سنجی برای سنجش مقدار زانتان محلول است، لازم بود در آخرین مرحله، رابطه تغییرات جذب قرمز کنگو به عنوان تابعی از غلظت زانتان بررسی

دارد (Qian, 2006). برای آنکه این پیشنهاد به یک روش سنجش کامل برای اندازه‌گیری کمی مقدار زانتان تبدیل شود، لازم است اثر پارامترهای دیگری مانند قدرت یونی، قدرت و نوع بافر، pH، ناخالصی‌های همراه زانتان و... نیز مورد بررسی قرار گیرند.

به این ترتیب پیشنهاد می‌شود که تغییرات جذب نور مرئی ناشی از میانکنش قرمز کنگو و زانتان می‌تواند روشی برای اندازه‌گیری زانتان باشد که به عنوان سوبسترا برای انواع آنزیم‌های سازنده زانتان و یا آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن اهمیت



شکل ۷. افت جذب زانتان - قرمز کنگو به عنوان تابعی از غلظت زانتان

References

- Alwinpremanand, A., Vennision, J., Sankar, S., Gilwax, D. (2008). «Isolation and characterization of bacteria from of bomhyxmori that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion» J. Ins. Sci. 10: 107-110.
- Bejenariu, A., Macel, P., Picton, L., Cerf, D. (2010). «Effect of concentration, pH and temperture on xanthan conformation: a preliminary study before crosslinking». Rev. Roum. Chim. 55(2): 147-152.
- Capron, I., Coste, X.S., Djaburov, M. (2001). «Water in emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solution». Rheol. ACTA. 40: 441456-.
- Davidm, G. (1986) «Polysaccharide conformations and kinetics». Acc. Chem. 20: 59-65.
- Garcia, F., Santo, V., Casas, J.A. (2003). «Xanthan gum production, recovery and properties» Biotechnol. Adv. 18(7): 549-579.
- Hamcerence, M. (2007). «New unsaturated derivative of xanthan gum: synthesis and characterization» Polymer. 48: 1921-1929.
- Hankin, L., Anagonostakis, S. (1977). «Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cx cellulose activity of micro-organism» J. Gen. Microbil. 98: 104-115.
- Jansson, P.E., Kenne, L., Lindberg, B. (1975). «Structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris» Carbohyd. Res. 45: 275-282.
- Jeans, A, Rogovin, M, Cadmus, R.W, Silman, R.W, Knutson, C.A (1976). «polysaccharide xanthan of Xanthomonas campestris Nrrl B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis.» NCR, USA Dept. Agriculture, ARS-NC-51. U.S. Agricultural Research Service, North Central Region, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.: 654-667.
- Jeffrey, G., Southwick, H., Jamieson, A., Blackwell, L. (1980). «Self-association of xanthan in aqueous solvent-system». Carbohyd. Res. 84(2): 287-295.
- Kang, K., Cottrell, L. (1979) «Polysaccharide» Microb. Technol. 1: 123-126.
- Kasana, R., Santok, V., Salwan, R., Arvind, G., Som, D. (2008). «A rapid and easy method for the detection of microbial cellulose on agar plates using grams iodine» Curr. Microbial. 57: 503-507.
- Limnol, O. (1995). «A dye- binding assay for the spectrophotometric of transparent exopolymer particles (TEM). Am. Soc. of Limnol. Oceanograph. Inc. 40: 1326-1335.
- Matsuda, Y., Biyajima, Y., Sato, T. (2009). «Thermal denaturation, renaturation and aggregation of a dooble-helical polysaccharide xanthan in aqueous solution» Polym. J. 41(7): 526-532.
- Parker, B.C., Diboll, A.G. (1966). «Alcian stains for histochemical localization of acid and sulfated polysaccharides in algae» Phycol. 6: 36-46.
- Qian, L. Wang, M. (2006). «Isolation and characterization of a xanthan- degrading microbacteriumsp strain XT11 from garden soil» Appl. Microbiol. 102: 1362-1372.
- Ramus, J. (1977). «Alcian blue A qualitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharide» J. Phycol. 13: 345-348.
- Reinke, A.A. Gestwicki, J.E. (2011). «Insight in to amyloid structure using chemical probes» Chem. Biol. Drug. Des. 77: 399-411.
- Rogovin, S.P., Anderson, R.F., Cadmus, M. (1969). «Production of polysaccharide with Xanthomonas campestris». J. Biochem. Microbiol. Technol. 3: 51-63.
- Roy, N., Rowshamul, H. (2009). «Isolation and characterization of xylanase

- producing strain of *Bacillus cereus* from soil» Iran. J. Microbiol. 1(2): 49-63.
- Sharma, B. (2006). «Xanthan gum- a boon to food industry» Food Promotion Chronicle. 1: 27-30.
 - Soh, H., Kim, C. (2003). «A new in vitro assay of cholesterol adsorption by food and microbial polysaccharides» J. Med. Food. 6(3): 225-230.
 - Steensma, D.P. (2001). «Congo red: out of Africa?» Arch. Pathol. Lab. Med. 125(25): 250-252.
 - Tavallaie, R., Talebzadeh, Z., Azad, J., Soudi, M.R. (2011) «Simultaneous determination of pyruvate and acetate levels in xanthan biopolymer by infrared spectroscopy: effect of spectral pre-processing for solid-state analysis». Food Chem. 124: 1124-1130.
 - Whiteman, P. (1973). «The quantitative measurement of alcian blue-glycosaminoglycan complexes». Biochem. J. 131: 343-350.
 - Wood, J. (1980). «The interaction of direct dyes with water soluble substituted celluloses and cereal β -Glucans and Cereal β -Glucans» Indust. Engin. Chem. Product Res. Develop.19: 119–23.
 - Zhang, Y., Micheel, E., Jonathan, R. (2006).»Out look for cellulose improvement screening and selection strategies». Biotech. Adv. 24: 452-481.