بررسی امکان تشکیل کمپلکس

بین مواد رنگزای راکتیو و آنزیم سلولاز

نظام صامعی*[۱]، سید حسین امیرشاهی†[۲]، محمد مرشد[۲]

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی نساجی دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده:

در این تحقیق امکان تشکیل کمپلکس بین آنزیم سلولاز و مواد رنگزای راکتیو از نوع منوکلروتری‌آزین، وینیل سولفون و دی‌کلرو تری‌آزین مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصله از بکارگیری همزمان آنزیم سلولاز و مواد رنگزای راکتیو بکارگرفته شده در این تحقیق در یک حمام رنگرزی تهی حاکی از تشکیل کمپلکس بین آنها می باشد. ایجاد کمپلکس با استفاده از روشهای کروماتوگرافی لایه نازک(TLC) و طیف FTIR وفیلتراسیون توسط کاغذ صافی اثبات گردید. نتایج حاصله می توانند در استفاده همزمان آنزیم سلولاز و مواد رنگزای رآکتیو مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آنزیم سلولاز، مواد رنگزای رآکتیو، الیاف سلولزی، طیف سنجی، کروماتوگرافی لایه نازک

مقدمه

همگام با رشد فزآینده استفاده از فرآیندهای بیوتکنولوژی در صنعت، استفاده از آنزیم در صنایع نساجی نیز گسترش چشمگیری داشته است. به عنوان مهمترین نمونه از این موارد می‌توان هیدرولیز کنترل شده آنزیمی کالاهای سلولزی توسط سلولازها را نام برد. در اولین

* مسئول پیام نگار: ۰۳۱۱-۳۹۱۲۴۴۴، آدرس فعلی: مربی، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه آزاد اراک

† آدرس فعلی: دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

گزارشات اعلام شده، از این روش تحت عنوان بیوپولیشینگ برای تکمیل پارچه‌های تاری ـ پودی در ژاپن استفاده گردید[۱]. هیدرولیز آنزیمی منسوجات سلولزی، توسط ایزوآنزیم‌های سلولاز انجام می‌شود. سلولاز به سیستمی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که با هم به صورت زنجیره‌ای عمل کرده و قادر به شکستن پلیمرهای سلولزی بسیار آرایش‌یافته هستند. اجزاء سلولاز عبارت است اکسو ـ بتا ـ ۱ و ۴ ـ گلوکانیز (E.C.3.2.1.91)، اندو ـ بتا ـ ۱ و ۴ ـ گلوکانیز (E.C.3.2.1.4) و بتا ـ گلوکزایداز (E.C.3.2.1.21) می‌باشد[۷-۲].

اکسوگلوکانیزها واحدهای سلوبیوز را از انتهای غیر احیایی زنجیره‌های سلولزی جدا می‌کنند. اندوگلوکانیزها پیوندهای بتا ـ ۱ و ۴ ـ گلوکزاید را به صورت تصادفی هیدرولیز می‌نمایند و سبب کاهش درجه پلیمریزاسیون زنجیره‌های سلولزی می‌شود. بتاگلوکزایدها واحدهای سلوبیوز را به گلوکز تجزیه می‌کنند. در تحقیقات صورت گرفته توسط کاواکو-پالو و آلمدا مسئله تفاوت در شدت هیدرولیزپارچه های پنبه ای از پیش رنگ شده در مقایسه با پارچه های سفید (رنگ نشده) مورد مطالعه قرار گرفته است[۶]. در این تحقیق گزارش شده است که پارچه های رنگ شده با مواد رنگزای رآکتیوو مستقیم کاهش وزن واستحکام کمتری نسبت به پارچه های رنگ نشده نشان می دهند.

تجربیات

مواد مورد استفاده

در این تحقیق از آنزیم Primafast 100 از شرکت .Genencor International Inc که یک آنزیم اسیدی می‌باشد و مواد رنگزای راکتیو C.I. Reactive Blue 19 و C.I. Reactive Blue 5 و C.I. Reactive Blue 4 که گروه فعال آنان به ترتیب از نوع وینیل سولفون، منوکلرو و دی‌کلرو تری‌آزین می‌باشد استفاده شده است.

روش انجام آزمایشات

استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک به منظور بررسی وقوع کمپلکس

در این آزمایش عملیات رنگرزی، هیدرولیز، رنگرزی و هیدرولیز همزمان در حمام‌های تهی (بدون حضور پارچه) طبق روشهای معمول صورت گرفت ومحلول‌های نهایی به منظور بررسی ایجاد کمپلکس بین ماده رنگزا و آنزیم روی لایه نازک کروماتوگرافی قرار گرفتند. سپس لایه نازک در حلالی شامل ۲۰٪ آب، ۴۰٪ اسید استیک و ۴۰٪ بوتیل استات جهت جداسازی قرار داده شد. آنگاه پس از ۱/۵ ساعت مقادیر RF که نشان‌دهنده مقدار حرکت ماده رنگزا و آنزیم از نقطه شروع می‌باشد برای هر یک از محلول ها اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد.

استفاده از فیلتراسیون کاغذ صافی به منظور بررسی وقوع کمپلکس

عملیات کامل رنگرزی و هیدرولیز به طور جداگانه و به صورت همزمان بدون حضور پارچه هر یک سه مرتبه تکرار شدند و بعد از پایان عملیات محلولهای حاصله به کمک کاغذ صافی فیلتر گردیدند. آنگاه مقدار اضافه وزن حاصله بر روی کاغذ صافی توزین گردید.

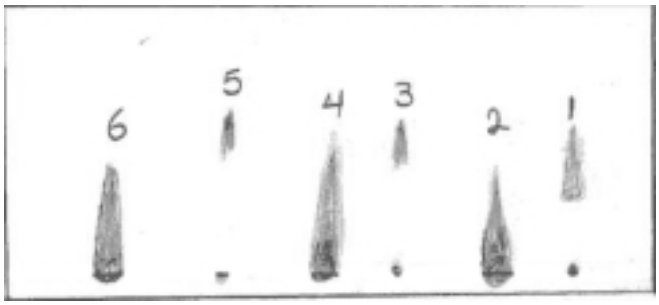
استفاده از اسپکتروسکوپ FT_IR به منظور بررسی تشکیل کمپلکس

در این مرحله از دستگاه اسپکتروسکوپ FT_IR استفاده گردید. یک قطره از محلول هر یک از مواد رنگزا، آنزیم و مخلوط مواد رنگزا و آنزیم با برمید پتاسیم مخلوط شدند و پس از تبخیر آب مخلوط، قرص مورد نیاز تهیه گردید. مقدار رنگـزا در دو محلـول رنگـزا و رنگـزا و آنزیم یکسان و برابر ۴٪ و مقدار آنزیم در دو محلول آنزیم و رنگزا و آنزیم برابر ۴ گرم در لیتر بود.

نتایج و بحث

نتایج بکارگیری روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

شکل ۱ صعود هر یک از مواد رنگزای راکتیو ومخلوط هر یک از این مواد رنگزا را با آنزیم در لایه نازک کروماتوگرافی نشان می‌دهد. در شکل مذکور صعود کامل وبدون دنباله هر یک از مواد رنگزای راکتیو بکار رفته در هنگامی که از آنزیم استفاده نشده است مشاهده می گردد در حالیکه دنباله دار شدن صعود در نمونه های حاوی ماده رنگزا و آنزیم کاملا مشخص است. در واقع همانگونه که در شکل مذکور به صورت اختلاف در روشنایی یک سری خاکستری مشهود است در نمونه حاصله از بکارگیری مخلوط آنزیم و رنگزاها نقطه شروع کروماتوگرافی و مسیر صعود در لایه نازک به دلیل باقی ماندن ماده رنگزا دارای تیرگی بیشتری نسبت به نمونه ماده رنگزای خالص است به نحوی که در لایه اصلی، مسیر مذکور کاملا رنگی باقی مانده و فام ماده رنگزای مورد استفاده را دارد. در واقع تشکیل کمپلکس ماده رنگزا-آنزیم سلولاز موجب گردیده است تا تعدادی از مولکولهای ماده رنگزای راکتیو اجازه صعود از لایه نازک را نیابند. به عبارت دیگر می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم سلولاز و ماده رنگزای راکتیو با یکدیگر کمپلکسی را تشکیل داده اند که به دلیل سنگین تر بودن وزن کمپلکس قادر به صعود کامل از لایه نازک نمی باشد.



شکل۱) صعودمحلولهای مورد آزمایش ازلایه نازک کروماتوگرافی ۱-محلول ماده رنگزای منو کلرو ۲-محلول ماده رنگزای منو کلرو و آنزیم سلولاز ۳-محلول ماده رنگزای وینیل سولفون ۴-محلول ماده رنگزای وینیل سولفون و آنزیم سلولاز ۵-محلول ماده رنگزای دی کلرو ۶-محلول ماده رنگزای دی کلرو و آنزیم سلولاز

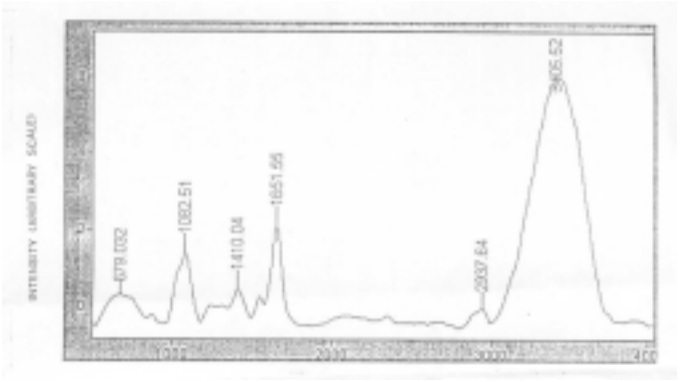
مقادیر R_F نمونه ها نیز اندازه گیری و در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. همانگونه که نتایج مندرج در جدول نشان می دهند را نشان می دهد مقدار R_F کلیه نمونه ها در مخلوط آنزیم و رنگزا کاهش یافته است که مبین تشکیل واکنش بین آنان می باشد.

جدول شماره ۱: مقادیر RF آنزیم و مواد رنگزای راکتیو به صورت جداگانه و مخلوط با یکدیگر

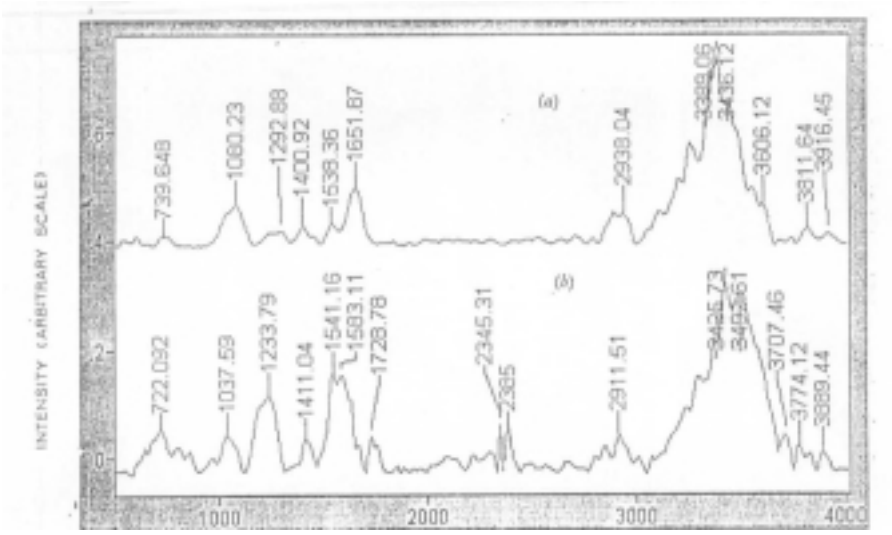
ردیف	ماده مورد آزمایش	R_F
۱	آنزیم به تنهایی	۰/۳۳
۲	رنگزای منوکلروتری آزین به تنهایی	۰/۲۹۸
۳	رنگزای وینیل سولفون به تنهایی	۰/۴۷۴
۴	رنگزای دی کلروتری آزین به تنهایی	۰/۴۵
۵	رنگزای منوکلروتری آزین به همراه آنزیم	۰/۲۶۶
۶	رنگزای وینیل سولفون به همراه آنزیم	۰/۴۱
۷	رنگزای دی کلروتری آزین به همراه آنزیم	۰/۳۳

نتایج بکارگیری طیف FT-IR

شکلهای۲ و ۳ طیف‌های اسپکتروسکوپی را به ترتیب برای آنزیم سلولاز وماده رنگزای دی کلرو تری آزین و مخلوط این رنگزا و آنزیم را نشان می‌دهند.



شکل۲: طیف FT-IR آنزیم



شکل ۳: a-طیف FT- IRمخلوط مواد رنگزای راکتیو دی کلرو تری آزین و آنزیم سلولاز

b- طیف FT-IR ماده رنگزای راکتیو دی کلرو تری آزین

شکل ۲ طیف آنزیم خالص را نشان می دهد. در این طیف نوار جذبی ظاهر شده در Cm^{-1} ۳۴۰۵/۵۲ احتمالا مربوط به گروههای آمین و هیدروکسیل آنزیم می باشد. در حالیکه طیف ماده رنگزای دی‌کلرو و آنزیم (شکل ۳-a) چنین نواری را در این طول موج نشان نمی‌دهد بلکه این نوار در طول موجهای Cm^{-1} ۳۴۳۶/۱۲ و Cm^{-1} ۳۳۸۹/۰۶ ظاهر شده است که به نظر می‌رسد ایجاد پیوندهای هیدروژنی باعث جابجایی این نوار جذبی شده است. در شکل (۳-b) که طیف اسپکتروسکوپی ماده رنگزای دی‌کلروتری‌آزین را نشان می‌دهد گروههای کربونیل در طول موجهای Cm^{-1} ۱۵۸۳/۵۵ و Cm^{-1} ۱۵۴۱/۶۶ ظاهر شده‌اند. در حالیکه در طیف مخلوط این ماده رنگزا و آنزیم، گروههای کربونیل در طول موجهای Cm^{-1} ۱۵۳۸/۳۶ و

Cm^{-1} ۱۶۵۱/۸۷ ظاهر شده اند. بنابراین این احتمال وجود دارد که ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین ماده رنگزای راکتیو و آنزیم تغییر در محل نوارهای جذبی ایجاد کرده است.

طیف اسپکتروسکوپی ماده رنگزای دی‌کلروتری‌آزین (شکل۳-b) نشان می‌دهد که گروههای سولفونات یک جذب قوی در طول موج Cm^{-1} ۱۲۳۳/۶۸ و یک جذب متوسط در طول موج Cm^{-1} ۱۰۳۷/۹۱ داشته‌اند در حالیکه طیف اسپکتروسکوپی این ماده رنگزا همراه با آنزیم سلولاز (شکل۳-a) در طول موج Cm^{-1} ۱۲۳۳/۶۸ جذب بسیار ضعیفی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که گروههای سولفونات موجود در ماده رنگزا با گروههای موجود در آنزیم سلولاز که دارای بار مثبت می‌باشند پیوندهای یونی یا نمکی تشکیل می‌دهند. ایجاد پیوندهای یونی باعث ضعیف شدن نوار جذبی مربوط به گروههای سولفونات در طول موج Cm^{-1} ۱۲۳۳/۶۸ شده است. ثابت شده است که شدت جذب گروههای شیمیایی مختلف در یک طول موج خاص تحت تأثیر مقدار اتمهای موجود در این گروهها قرار دارد[۷]. در

طیف اسپکتروسکوپی ماده رنگزای راکتیو دی‌کلرو (۳-b) نوار جذبی گروههای کلر در طول موج $۷۲۲/۰۱۱Cm^{-1}$ ظاهر شده است در حالی که نوار جذبی گروههای کلر در طیف این رنگزا همراه با آنزیم (۳-a) در طول موج $۷۲۲/۰۱۱Cm^{-1}$ بسیار ضعیف گردیده است. این احتمال وجود دارد که بین ماده رنگزای راکتیو دی‌کلروتری‌آزین و آنزیم سلولاز پیوندی برقرار می‌شود که مشابه پیوندهای کووالانسی ایجاد شده بین رنگزاهای راکتیو و الیاف پشمی می‌باشد.بنابراین این احتمال وجود دارد که کربن متصل به گروههای کلر ماده رنگزا با گروههای خاصی از آنزیم مانند NH_2 , OH پیوندهای کووالانسی برقرار نمایند. نتایج مشابهی در هنگام استفاده از مخلوط دو ماده رنگزای دیگر با آنزیم سلولاز مشاهده گردید که به دلیل محدودیت در اندازه مقاله از ارائه آنان خودداری شده است.

نتایج بکارگیری روش فیلتراسیون

جدول شماره ۲ نتایج حاصله از بکارگیری این آزمایش را نشان می دهد. با توجه به نتایج مندرج در جدول می توان مشاهده کرد که درصد افزایش وزن بین دو نمونه نظیر که یکی شامل ماده رنگزا به تنهایی و دیگری حاوی ماده رنگزا و آنزیم بوده است کاملا متفاوت است. محلول ماده رنگزای منو کلرو به تنهایی و ماده رنگزای منو کلرو و آنزیم اختلافی برابر ۱۴/۲۴ درصد دارند و این اختلاف برای ماده رنگزای وینیل سولفون ۱۶/۴ درصد و برای ماده رنگزای دی کلرو برابر ۱۷/۲۱ درصد است. تفاوت ذکرشده می تواند به سادگی نشان دهنده تشکیل کمپلکس بین مواد رنگزای راکتیو مورد استفاده و آنزیم بکاررفته باشد.

جدول ۲: نتایج مربوط به فیلتراسیون محلول مواد رنگزای راکتیو و آنزیم به طور جداگانه و مخلوط با یکدیگر

ردیف	نوع محلول فیلتر شده	وزن کاغذ صافی	میانگین وزن نمونه ها
۱	ماده رنگزای منو کلرو تری آزین	۲/۱۷۴و۲/۱۴۴و۲/۱۱۵	۲/۱۴۴
۲	ماده رنگزای منوکلرو و آنزیم	۲/۵۳۶و۲/۵و۲/۴۶۶	۲/۵
۳	ماده رنگزای وینیل سولفون	۲/۱۸۵و۲/۱۱۳و۲/۱۱۸	۲/۱۴
۴	ماده رنگزای وینیل سولفون وآنزیم	۲/۵۹۲و۲/۵۲۷و۲/۵۸۱	۲/۱۵۶
۵	ماده رنگزای دی کلرو تری آزین	۲/۱۲۵و۲/۱۲۹و۲/۱۵۳	۲/۱۳۶
۶	ماده رنگزای دی کلرو و آنزیم	۲/۶۰۵و۲/۵۴۵و۲/۵۹	۲/۵۸

نتیجه‌گیری

مواد رنگزای راکتیو و آنزیم سلولاز در هنگامیکه به طور همزمان به کار روند می توانند کمپلکس هایی را تشکیل می دهند که موجب تغییر در مقدار فعالیت آنان می گردد. این نکته می تواند موجب بروز محدودیت های جدی در استفاده همزمان آنان در رنگرزی و عملیات

تکمیلی گردد. اندازه گیری مقادیر R_Fمحلول مواد رنگزای راکتیو و آنزیم به طور جداگانه و مخلوط با یکدیگر به کمک کرماتوگرافی لایه نازک، اختلاف در افزایش وزن کاغذ های صافی در فیلتراسیون محلول مواد رنگزای مذکور وآنزیم به طور جداگانه و مخلوط با یکدیگرو بررسی طیف های FT-IR هر یک از مواد رنگزای راکتیو بکارگرفته شده و مخلوط آنها با آنزیم سلولاز وقوع تشکیل کمپلکس بین مواد رنگزای راکتیو وآنزیم سلولاز را اثبات می نماید.

منابع

1. Pedersen, G.L., Screws, G.A., and Cedron, D.M., “Bio-Polishing of Cellulosic Fabrics”, Cand. Text. J., 31-35, 1992.
2. Cavaco–Paulo, A., and Almeida, L., “Kinetic Parameters Measured During Cellulose Processing of Cotton”, J. Text. Inst., Vol.87, Part1, No.1, 1996.
3. Enari, T., and Niku-Paavola, M., “Enzymatic Hydrolysis of Cellulose”, CRC crit. Rev. Biotechnol, Vol 5, No.3, 67-87, 1987.
4. Tyndall, R.M., “Improving the Softness and Surface Appearance of Cotton Fabrics and Garments by Treatment with Cellulase Enzymes”, Text Chem Color., Vol.24, No.6, 23-26, 1992.
5. Choe, K.E., Fark, Y.S., Cha, C.H., and Jeon, D.B., “Effect of Pre-Existing Dyes and Fabric Type on Cellulase Treatment of Cotton Fabrics”, Text. Res. J., Vol. 67, No.3, 155-162, 1997.
6. Cavaco–Paulo, A., and Almeida, L., “Cellulase Hydrolysis of Cotton Cellulose: The Effects of Mechanical Action, Enzyme Concentration and Dyed Substrates”, Biocatalysis, Vol.10, 353–360, 1994.
7. Cavaco–paulo, A., and Almeida, L., “Effect of Agitation and Endoglucanase Pretreatment on the Hydrolysis of Cotton Fabrics by a Total Cellulase”, Text. Res. J., Vol.66, No.5, 287–294, 1996.