Archive of SID

مجله علمی-پژوهشی «علوم و فناوری های پدافند غیرعامل»
سال دوم، شماره 1 (شماره پیاپی 3)، بهار 1390: ص 10-5

مطالعه ماهیت ساختاری بیوپلیمر مترشحه از یک گونه باسیلوس جدا شده از پساب صنعتی

علیمحمد لطیفی[1*]، فیروز ابراهیمی [2]، غلامرضا اولاد [2]

1- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی

2- دانشگاه جامع امام حسین(ع)، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، مرکز تحقیقات زیست شناسی

(دریافت 1389/03/25 ، پذیرش 1389/06/01)

چکیده

تعدادی از سویه‌های باکتریایی، بیوپلیمری تولید می‌کنند که دارای ساختار و خواص متفاوتی هستند. جهت شناسایی این پلیمر مترشحه از انواع حلال‌های آلی و آبی و نیز حلالیت نسبی آن در حلال‌های قطبی و غیر قطبی استفاده گردید. سپس با استفاده از روش‌های مختلف، حضور قند، لیپید و پروتئین در پلیمر مذکور مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش‌های استخراج به روش EDTA، هیدروکسید سدیم و رقیق‌سازی با آب مقطر بخشی از بیوپلیمر به شکل پودر سفیدرنگ در آمدکه بیانگر ماهیت پلی ساکاریدی آن می‌باشد. علاوه بر این، نتیجه آزمایش Molish که حضور قندها و پلی‌ساکاریدها را اثبات می‌کند نیز مثبت بود. از طرفی مثبت بودن آزمایشات Dyer و Bligh نیز نشان‌دهنده حضور لیپید در ساختمان بیوپلیمر بود. بررسی بعدی از حیث حضور یا عدم حضور پروتئین در شبکه بیوپلیمر انجام گرفت. بدین لحاظ ابتداء با استفاده از روش‌های اندازه‌گیری پروتئین نظیر لوری و برادفورد، حضور پروتئین به اثبات رسید. جهت بررسی بیشتر و نحوه حضور پروتئین‌ها در شبکه بیوپلیمری، از روش‌های الکتروفورز و اسپکترو فتومتری UV-Vis بهره گرفته شد و با استفاده از روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره مشخص شد پروتئین‌های مختلف با وزن مولکولی 66-12 کیلو دالتون در شبکه پلیمری حضور دارند؛ این در حالی است که در ژل Native-PAGE هیچ‌گونه باند پروتئینی ظاهر نشد. نتایج اسپکتروسکپی Uv -Vis نیز وجود جزء پروتئینی را نشان نداد. این نتایج دال برعدم بروز پروتئین‌ها در شبکه پلیمری است و درگیری پروتئین‌ها در درون شبکه را به اثبات می‌رساند که به‌طور کلی، نتایج بیانگر ماهیت چندگانه این پلیمر بود.

کلیدواژه‌ها: بیوپلیمر؛ اگزوپلیمر، پلی ساکارید، باکتری، باسیلوس

Characterizing the Composition of the Secreted Biopolymer by Bacillus. Sp Isolated from Industrial Waste

A. M. Latify[1*], F. Ebrahimi[2], G. R. Oulad[2]

[1] Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences,

[2] biology research center, Imam Hossein University

Abstract

Several strains of bacterium produce a biopolymer with different properties. For studying this biopolymer, its relative solubility in organic and inorganic solvents was studied after harvesting it from bacillus culture. Then, using a variety of methods, the coexistence of lipids, sugars and proteins and other compounds in the biopolymer network was examined. Addition of EDTA, sodium hydroxide and dilution of biopolymer solution led to precipitation of some part of this biopolymer as white powder which indicated its polysaccharide properties. The coexistence of polysaccharide and lipids in biopolymer was consequently shown by Mulish and Dyer/or Bligh Test. Adoption of Lowry and Bradford methods showed that the biopolymer composition has been mixed with proteins. Further studies on these proteins were performed by Native & denaturing Electrophoresis & UV-Vis spectroscopy. The results of SDS-PAGE method showed small protein bands with 12-66 kDa in MW. The Native Electrophoresis results indicated that this protein can not run of Electrophoresis due to binding of polymer network by non-covalent bands. Furthermore, the UV-Vis spectroscopy of biopolymer did not show any protein peak. This result indicated that the proteins of biopolymer have been trapped in polymer network. In summary, the results show that this polymer has multi-substance Native.

Keywords: Biopolymer, Exopolymer, Bacillus, Bacterium

*Corresponding author E-mail: amlatify@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

1. مقدمه

میکروارگانیزم‌ها در طبیعت، بیوپلیمرهای متنوعی را بـه شـکل خارج سلولی تولید می‌کنند. این مواد پلیمری خارج سلولی، در واقع ترکیبات کلیدی برای اجتماع میکروارگانیزم‌ها در بیوفیلم، فلـوک‌هـا و لجـن فعـال مـی‌باشـند. ایـن مـواد از جـنس پلـی‌سـاکاریدها، پـروتئین، نوکلئیـک اسـید، لیپیـد و دیگـر ماکرومولکول‌های بیولوژیکی می‌باشند[4،3،1].

این ترکیبات خارج سلولی در پدیده‌های پیوستگی و چسبندگی سلول‌ها، خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد بیولـوژیکی آن‌هـا، پایـداری مکـانیکی، انتشـار، جـذب، خـواص نـوری اجتماعـات میکروبی و هم‌چنین درحفاظت از ارگانیزم‌های داخـل بیـوفلیم در مقابل انواع بیوسایدها موثرهستند[1].

این بیوپلیمرها هماننـد آلژینـات (تولیـد شـده از سـودوموناس آئروجینوزا و ازتوباکتر وینلندی ئـی)، گزانتـان (تولیـد شـده از گزانتوموناس کمپستریس) دکستران (تولید شده از لوکونستوک مزانتروئیدس و استرپتوکوکوس موتانس)، ژلان (تولیـد شـده از سـودوموناس الـودآ)، پولـولان (تولیـد شـده از ائوروبازیـدیوم پولـولانس) و غیـره، از نظـر سـاختاری عمـدتاً پلـی‌سـاکاریدی هستند هر چند کـه در مـواردی هـم ممکـن اسـت بـه‌صـورت ترکیبی همراه با مواد دیگر به‌صورت گلیکوپروتئین، گلیکولیپید یا گلیکولیپوپروتئین وجود داشته باشند. البته در بعضی حالات، مواد مترشحه از سلول مثل انواع پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک (DNA - RNA) و سایر ترکیبات کـه جـز سـاختمان پلیمـری نمی‌باشند، پس از رها شدن به محیط ممکـن اسـت در داخـل شبکه پلی ساکاریدی به‌دام افتند و چنین به‌نظر برسد که جزئی از ساختمان بیوپلیمر هستند. از طرفی اگزوپلیمر ممکـن اسـت بخشی از دیواره سلولی خود باکتری باشد مثل آنتـی‌ژن O کـه بخش لیپوپلی‌ساکاریدی در غشـاء خـارجی بـاکتری‌هـای گـرم منفی است[4،3،1].

کپسول و لایـه چسـبناک (Slime layer) دو اگزوپلیمـر اصـلی مترشحه از باکتری‌ها بوده که عمدتاً پلـی سـاکاریدی هسـتند. کپسول به‌عنوان خارجی‌ترین لایه پوششی اطراف سـلول اسـت که توسط باکتری‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت، سیانو باکترها، آرکی باکتری‌ها و جلبک‌های تک‌سلولی تولید می‌گردد. کپسول به سلول چسبیده باقی می‌ماند و ممکن است به انـدازه 0/1 تا 10 نانومتر و یا بیشتر از سطح سلول بـه داخـل محـیط نفوذ کند و یک منطقه بـافری را بـین دیـواره سـلول و محـیط خارج ایجاد کند[1]. شکل دیگر اگزوپلیمر، لایه چسبناک است که بر خلاف کپسول از سلول جدا مـی‌گـردد و در محـیط رهـا می‌شود. تولید لایه چسبناک ممکن است تحت کنتـرل شـرائط محیطی باشد. در حوزه‌های صنعتی و محیط‌های آبی، اصـطلاح لایه چسبناک اغلب به نام بیوفیلم استفاده می‌شود کـه در روی سطوح مختلف تشکیل می‌گردد. بیوفیلم هم واجـد سـلول‌هـا و هم اگزوپلیمر تولید شده توسط آن‌ها و هـر گونـه مـواد جـذب شده از محیط می‌باشد، بنابراین، خواص و ترکیب آن بر حسـب نوع محیط و نوع تعریفی کـه از آن مـی‌شـود متفـاوت خواهـد بود[4،3،1]. همان‌طور که اشاره شد این اگزوپلیمرها(کپسول و لایه چسبناک) به‌صورت یک بافر بین دیـواره سـلولی و محـیط بیرونی عمل می‌کنند و برای سلول نقش حفاظتی دارنـد یعنـی در واقع یک دیـوار امنیتـی در برابـر مـواد سـمی و مضـر مثـل آنتی‌بیوتیک‌هـا، بیوسـایدها، فلـزات سـمی و سـنگین و حتـی باکتریوفاژها، تشکیل می‌دهند[12،3،1].

بیوپلیمرهای کاربردهای وسیعی در زمینـه‌هـای مختلـف مثـل صنایع غذایی و دارویی دارند. به‌عنوان مثال بیوپلیمر گزانتان که توسط باکتری گزانتوموناس کمپستریس تولید می‌شود، به‌عنوان عامل پایدارکننده، قوام‌دهنده، ژل‌ساز، سوسپانسـیون‌کننـده در ترکیب چاشنی‌ها، سس‌ها، آبگوشت، شربت، دسر، بستنی، پنیر، کیک، شیرینی و نیز بـه‌عنـوان عامـل سوسپانسـیون‌کننـده در رنگ‌های ژله‌ای در چاپ منسوجات و رنگ‌رزی، برای جلوگیری از پخش رنگ در کاغذسازی، در لعابه‌کاری سرامیک، در اسپری حشره‌کش‌ها، در حفاری چاه‌های نفت (بـرای افـزایش بازیافـت نفت) و در مواد ژل‌ساز برای تهیه مواد منفجره، پاک‌کننده‌ها، و دئودورانـت‌هـا اسـتفاده مـی‌گـردد[13]. از طرفـی، بسـیاری از اگزوپلیمرهای میکروبی در شرائط طبیعی به‌صورت پلـی‌آنیـون عمل می‌کنند یعنی دارای گروه‌های آنیونی فراوانی هسـتند کـه میل ترکیبی زیادی با کاتیون‌های فلـزی دارنـد کـه بـر همـین اساس امروزه از آن‌ها در جذب و حذف آلاینده‌های محیطی بـه ویژه فلزات سمی و سنگین استفاده می‌شود[12،9،8،7،3،2،1].

مطالعات قبلی نشان‌دهنده تولیـد نـوعی پلیمـر خـارج سـلولی توسط یک گونه باسیلوس جدا شده از پساب‌های صـنعتی بـود که نقش اصلی را در جذب فلزات سنگین ایفاء مـی‌کنـد. تولیـد فراوان این پلیمر، ویژگـی بـارز ایـن بـاکتری نسـبت بـه سـایر میکروارگانیزم‌های تولیدکننده بیوپلیمر است[13]. از آنجایی که جذب فلزات سنگین در باکتری مذکور توسط بیوپلیمر مترشحه

www.SID.ir

Archive of SID

از آن صورت می‌گیرد، لذا مطالعه ماهیت ساختاری آن در اولین گام ضروری به‌نظر می‌رسد.

2. مواد و روش‌ها

باکتری مورد استفاده یک گونه باسیلوس اسپوردار جدا شده از پساب کارخانه‌های چرم‌سازی (منطقه ورامین) می‌باشد که قادر به جذب فلزات سرب، نیکل، کادمیوم، روی و نقره به‌مقدار قابل توجهی می‌باشد[13].

باکتری داخل محیط GMS تلقیح و درشیکر انکوباتور با دمای 30درجه سانتی‌گراد و دور 120 rpm به‌مدت 48 ساعت قرار گرفت.

2-1. تعیین حلالیت نسبی بیوپلیمر

برای این منظور از حلال‌های کلروفرم، استون، پروپانول، اتر، اتانول و آب استفاده شد و با تلقیح اگزوپلیمر داخل هر کدام از آن‌ها حلالیت نسبی آن مشخص گردید.

2-2. اثبات وجود قند در اگزوپلیمر

الف) استخراج به روش EDTA

در این روش 100 سی‌سی از محلول 2% EDTA (نمک تترا سدیم) به 100 سی‌سی ازمحلول حاوی اگزوپلیمر اضافه و سپس به‌مدت 3 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. نمونه در 14000 rpm به‌مدت 20 دقیقه در 4 درجه سانتریفیوژ و سپس برای حذف کامل سلول‌ها، محلول روئی با کاغذ صافی 0/22 میکرومتر صاف گردید. بیوماس راسب شده جهت اندازه‌گیری وزن خشک سلول مورد استفاده قرار گرفت.

ب) استخراج به روش هیدروکسید سدیم (NaOH)

ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در 4000rpm به‌مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول روئی حذف و 2 برابر حجم آن، 2M NaOH به بیوماس راسب اضافه شد. پس از به‌هم زدن اولیه در دمای 20 درجه، به‌مدت 5 ساعت در دستگاه شیکرانکوباتور قرار داده شد. سپس نمونه تا میزان حجم اولیه با آب رقیق شده و نمونه‌ها مجدداً در 4000 دور به‌مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت حذف کامل سلول‌ها محلول روئی با فیلتر استات سلولز 0/22 میکرومتر صاف شد.

قند موجود در محلول‌های نهایی به‌دست آمده از دو روش فوق، با روش‌های تخلیص با 2- پروپانول، تخلیص با استون و تخلیص با اتانول 96% استخراج گردید.

ج) استخراج به‌روش رقیق‌سازی با آب مقطر

نمونه 3 تا 5 برابر با آب مقطر رقیق‌سازی و سپس در 4000 دور به‌مدت 25 دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول روئی با روش‌های تخلیصی 2- پروپانول، استون و اتانول از نظر وجود قند بررسی شد.

د) تست مولیش (Molish)

2ml از محلول واجد اگزوپلیمرمورد آزمایش در لوله ریخته و 2 قطره محلول الکلی آلفا نفتول (5 درصد) به آن اضافه شده و سپس با دقت از کناره لوله حدود 1ml اسید سولفوریک غلیظ (بدون آنکه مخلوط شود) اضافه شد. تشکیل حلقه رنگی در محل تماس اسید با محلول، دال بر مثبت بودن آزمایش بود.

2-3. روش‌های اثبات وجود پروتئین و لیپید

برای اثبات وجود لیپید از روش Dyer و Bligh استفاده گردید. در این روش یک گرم از بیوپلیمر در یک ویال شیشه‌ای ریخته شد. سپس30 سی‌سی از محلول کلروفرم – متانول (نسبت 2:1) روی نمونه اضافه شده و بعد نمونه به‌مدت یک شب در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگه‌داری گردید. در پایان این مرحله، مجدداً20 سی‌سی کلروفرم و20 سی‌سی آب اضافه و محلول به‌دست آمده سانتریفیوژ شد.

برای اثبات وجود پروتئین، غیر از روش‌های لوری و برادفورد، از الکتروفورز SDS-PAGE و Native-PAGE و اسپکتروفتومتری (UV-vis 280nm) استفاده گردید.

3. نتایج و بحث

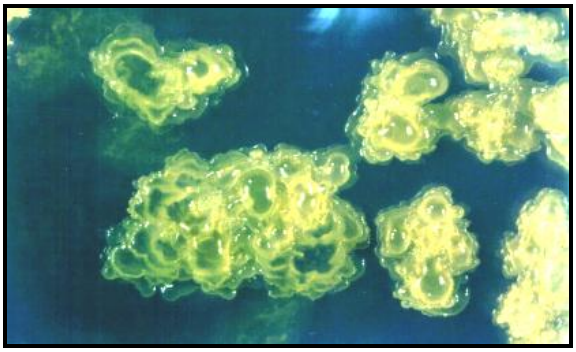
در محیط نوترینت آگار، باکتری بیوپلیمر را به‌مقدار زیاد و معمولاً بشکل قطرات شبنم تولید می‌نماید (شکل (1)).

پس از تلقیح، باکتری داخل محیط GMS، به‌مدت 72 ساعت داخل شیکر انکوباتور با دور 120rpm و دمای 30 درجه نگه‌داری شد. باکتری داخل محیط، اگزوپلیمری را ترشح نمود که باعث تغلیظ و افزایش ویسکوزیته محیط می‌گردد (شکل (2)). چنانچه محیط تلقیح شده در شرائط بدون هوادهی قرار گیرد، باکتری در حین رشد در سطح محیط کشت ایجاد

www.SID.ir

Archive of SID

بیوفیلم می‌کند و بعد در زیر بیوفیلم شروع به تولید اگزوپلیمر می‌نماید که به تدریج به سمت پائین به‌صورت یک پرده لغزنده امتداد می‌یابد.



شکل 1. تولید اگزوپلیمر روی محیط نوترینت آگار توسط باکتری

شکل 2. تولید اگزوپلیمر در محیط GMS و ایجاد حالت خمیری شکل

اولین قدم جهت شناسایی بیوپلیمر مترشحه از باکتری، سنجش حلالیت این بیومولکول در حلال‌های کلروفرم، اتر، اتانول، بنزن، گزیلول و آب بود. نتایج حاصل بیانگر عدم حلالیت خوب این ترکیب در حلال‌های مذکور بود. به‌طوری که این ترکیب در هیچ‌کدام ازحلال‌های فوق کاملاًحل نمی‌شود. از طرفی، در محلول بنزن، اتر وگزیلول، پلیمر بلافاصله در ته لوله قرار می‌گیرد، اما در کلروفرم، پلیمر در قسمت رویی محلول قرار گرفت. زمانی‌که از حلال‌های فوق به همراه یک حلال قطبی مثل آب یا الکل استفاده می‌شد، اگزوپلیمر در فاز میانی قرار می‌گرفت. به‌عنوان مثال در استفاده ازکلروفرم، مقدار مشخصی از پلیمر را داخل لوله آزمایش ریخته سپس هم حجم آن آب مقطر اضافه نموده و بعد دو برابر حجم موجود (آب - پلیمر) کلروفرم اضافه گردید و سریعاً به‌هم‌زده شد که3 فاز تشکیل شد:

الف) فاز روئی(آبی): کدر و سرشار از سلول‌های باکتریایی بود که در شبکه پلیمری باقی مانده بودند.

ب) فاز میانی: بیوپلیمر به‌صورت یک فاز جداگانه در این قسمت قرار گرفت که به علت رها شدن سلول‌های به‌دام افتاده در شبکه بیوپلیمری به داخل فاز رویی، عاری از باکتری بود.

ج) فاز تحتانی (کلروفرم): شفاف باقی مانده بود.

در مرحله بعد، فاز رویی دور ریخته شد، سپس با تکان دادن شدید و سریع لوله، در یک لحظه بخش عظیمی از پلیمر در داخل کلروفرم به دام افتاد و یک حالت نیمه جامد ژل مانند به خود گرفت که پس از گذشت چند دقیقه اگزوپلیمر مجدداً به آرامی شروع به جدا شدن از فاز کلروفرم کرده در قسمت رویی قرار گرفت.

از نتایج به‌دست آمده چنین استنباط شد که اولاً بیوپلیمر یک ترکیب دو قطبی با خاصیت آمفوتری است؛ یعنی دارای یک سر قطبی (به سمت فاز رویی یعنی آب) و یک سر غیرقطبی (به سمت کلروفرم) می‌باشد، ثانیاً به دام افتادن لحظه‌ای پلیمر در داخل فاز کلروفرم، به‌خاطر وجود لیپید در شبکه بیوپلیمر می‌باشد که در یک لحظه با مولکول‌های کلروفرم واکنش داده و پس از حل شدن آرام لیپیدها در کلروفرم، پلیمر عاری از لیپید، مجدداً از کلروفرم جدا و به فاز رویی بر می‌گردد. بنابراین چنین می‌توان استدلال نمود که این پلیمر دارای یک ترکیب چند ماهیتی است. برای اثبات این موضوع سه آزمایش زیر انجام گرفت:

1. بررسی وجود قند (پلی ساکارید) 2. بررسی وجود لیپید 3. بررسی وجود پروتئین

3-1. اثبات وجود قند در بیوپلیمر

در اولین قدم از تست Molish استفاده شد. این تست برای هر سه فاز آبی، میانی و کلروفرم انجام گرفت که نتایج به‌صورت زیر بود:

الف) فاز رویی: نتیجه آزمایش مولیش منفی و بعضاً مثبت ضعیف بود که احتمالاً به‌خاطر آزاد شدن مقدار جزئی قند از شبکه بیوپلیمری به داخل این فاز باشد.

ب) فاز میانی (اگزوپلیمری): شدیداً مثبت بود و با گذشت زمان شدیدتر نیز می‌شد. این پدیده می‌تواند دلیل بر وجود قند به‌صورت زنجیره پلی‌ساکاریدی باشد که پس از اضافه نمودن اسید، مونومرهای قندی از انتهای زنجیره پلی‌ساکاریدی به تدریج آزاد و به داخل فاز آبی رها می‌شوند و در نتیجه بر شدت

www.SID.ir

Archive of SID

مثبت بودن تست مولیش افزوده خواهد شد.
ج) فاز پائینی (کلروفرم): تست مولیش منفی بود.
نتایج فوق وجود قند در پیکره پلیمر را اثبات نمود، لذا در ادامه جهت استخراج و تخلیص آن، از سه روش استخراج با 2% EDTA- هیدروکسید سدیم 2 مولار ـ و روش رقیق سازی با آب مقطر استفاده شد.
محلول‌های رویی به‌دست آمده از روش‌های مذکور، به‌طور جداگانه با سه روش تخلیص با 2- پروپانول، تخلیص با استون و تخلیص با اتانول 96% مورد ارزیابی قرار گرفتند که بهترین نتیجه از نظر کمی و کیفی از روش EDTA با پروپانول حاصل گردید و پلی‌ساکارید به‌صورت پودر سفید رنگ استخراج شد. با این نتیجه، وجود قند (پلی ساکارید) به‌عنوان بخشی از ساختمان بیوپلیمر به اثبات رسید.

3-2. اثبات وجود لیپید در ساختمان بیوپلیمر

برای این منظور از روش Dyer و Bligh (کلروفرم - متانول) استفاده شد که طبق روش ذکر شده پس از سانتریفیوژ، سه لایه تشکیل شد:
الف) لایه رویی(آب - متانول): شفاف بود و احتمالاً واجد تمام مواد محلول در آب می‌باشد.
ب) فاز میانی: به‌صورت یک صفحه صورتی رنگ، ترد و شکننده ظاهر شد(به‌خاطر حذف لیپیدها از ساختمان بیوپلیمر).
ج) فاز تحتانی(کلروفرم): به‌خاطر حل شدن لیپیدها در کلروفرم، این فاز شیری رنگ بود.
فاز رویی و میانی جدا و فاز کلروفرم در تاریکی و در 50 درجه سانتی‌گراد داخل اتاقک گرم (فور) قرار گرفت و پس از تبخیر شدن کلروفرم وزن خشک لیپید اندازه‌گیری شد که برابر 0/3 گرم وزن خشک بود.

3-3. اثبات وجود پروتئین در بیوپلیمر

برای این منظور پنج نمونه به شرح ذیل آماده شد:
S1= اگزوپلیمر قرار گرفته بین دو فاز کلروفرم و آب؛
S2= نمونه S1 پس از استخراج قند آن به روش EDTA و پروپانول، قسمت راسب شده در آب مقطر رقیق و سپس برای تست پروتئین آماده شد؛
S3= بیوفیلم تشکیل شده در سطح محیط GMS، که در شرایط بدون هوادهی به وجود می‌آید. در قسمت زیرین آن اگزوپلیمر به‌صورت یک پرده لغزنده به قسمت تحتانی ترشح می‌گردد (تست مولیش بیوفیلم منفی بود)؛
S4= بیوپلیمر مترشحه از باکتری که در شرایط بدون هوادهی در زیر بیوفیلم به‌صورت یک پرده لغزنده تولید می‌شود؛
S5= بیوپلیمر تولید شده توسط باکتری در محیط GMS در شرایط هوادهی.
نمونه‌های فوق با روش‌های پروتئین‌سنجی لوری و برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده در جدول (1) نشان داده شده است. با حصول چنین نتایجی وجود پروتئین به‌عنوان بخش دیگری از ساختمان بیوپلیمر ثابت گردید، ولی این‌که آیا این پروتئین ها واقعاً جزیی از ساختمان بیوپلیمر می‌باشند یا این‌که توسط سلول باکتری به‌طورجداگانه تولید شده و سپس به داخل شبکه به دام افتاده‌اند، نیاز به بررسی بیشتری داشت که در ادامه از روش ژل الکتروفورز در حالت طبیعی و دناتوره (SDS-PAGE و Native-PAGE) استفاده شد. دو نمونه S4 و S5 که طبق جدول(1) مقدار پروتئین بیشتری را در مقایسه با بقیه نمونه‌ها نشان داده بودند، انتخاب گردیدند. همان‌طور که در شکل(3) مشاهده می‌شود در حالت Native-PAGE هیچ‌گونه باند پروتئینی تشکیل نشد که گویای دو حالت می‌تواند باشد:
1. در محیط هیچ‌گونه پروتئین وجود ندارد؛
2. پروتئین‌ها درگیر با شبکه بیوپلیمری می‌باشند و این امر باعث عدم نفوذ پروتئین‌ها به داخل ژل گردیده است که هیچ‌گونه باندی تشکیل نخواهد شد.

جدول 1. نتایج حاصل از پروتئین‌سنجی به‌روش برادفورد

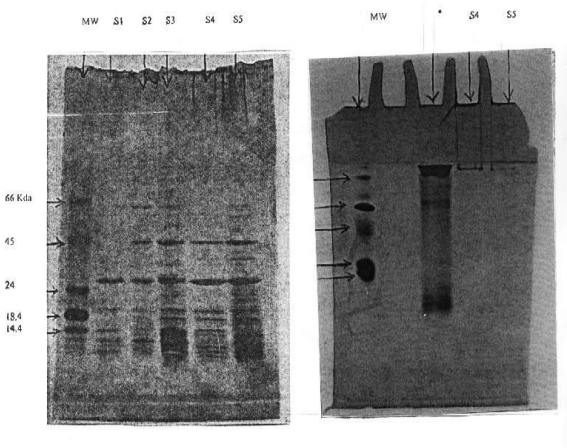
نمونه	S1	S2	S3	S4	S5
مقدار پروتئین mg/ml	0/15	0/2	0/1	0/4	0/6

برای اثبات وجود پروتئین‌های درگیر با شبکه بیوپلیمری، از روش SDS-PAGE نیز استفاده شد؛ زیرا SDS باعث رهایی پروتئین‌ها از شبکه بیوپلیمری می‌شود. در این حالت باندهای پروتئینی تشکیل گردید که بیانگر وجود پروتئین‌هایی با وزن مولکولی 66-12 کیلو دالتونی در پیکره پلیمر بودند.
برای اطمینان بیشتر از روش اسپکتروفتومتری در طول موج 280 نانومتر نیز استفاده شد. در نمونهS1 تا S4 هیچ‌گونه پیکی

www.SID.ir

Archive of SID

در طول موج 280 تشکیل نشده و تنها پیک تشکیل شده مربوط به حلال(آب) می‌باشد و این نتایج نیز دلیل بر عدم وجود پروتئین به شکل آزاد در محیط می‌باشد.



شکل 3. باندهای پروتئینی در حالت SDS-PAGE (شکل چپ) و Native-PAGE (شکل راست)

در مورد نمونه S5 یک پیک مشاهده شد که علت آن را چنین می‌توان توجیه کرد: از آن‌جایی که نمونه S5 اگزوپلیمر مترشحه از باکتری در محیط GMS در شرایط هوادهی می‌باشد، لذا پیک به‌دست آمده ممکن است ناشی از وجود برخی پروتئین‌های آزاد مترشحه از باکتری باشد که مربوط به شبکه بیوپلیمری نیست.

نتایج کلی حاصل از مطالعات انجام شده همه دلیل بر این است که بیوپلیمر مترشحه از باکتری یک ماهیت چندگانه دارد و از نظر ساختاری به‌صورت گلیکولیپوپروتئین بوده و به‌نظر می‌رسد که بخش اصلی ساختمان آن را پلی‌ساکارید تشکیل می‌دهد. از طرفی به‌خاطر نقش بارز و قابل توجه این بیوپلیمر در جذب فلزات سنگین و سمی مثل نیکل، سرب، کادمیوم، روی و نقره[14] و نیز به‌خاطر خاصیت ژل مانند آن و امکان کاربردهای صنعتی، دارویی و غذایی، حائز اهمیت بوده و در آینده مطالعات تکمیلی، مخصوصاً درباره شناخت خواص بیولوژیکی و کاربردی این بیوپلیمر انجام خواهد شد.

4. مراجع

[1] Ehrilich, H. L. "Extracellular Polymers for Metal Binding."; Microbial Mineral Recover, Chapter 10, 222-247.

[2] Geddie, J. L.; Sutherland, I. W. "Uptake of Metals by Bacterial Polysaccharides."; Applied in Biotechnology, 1993, 74, 467-472.

[3] Gutnick, D. "Engineering Polysaccharides for Biosorption of Heavy Metals at Oil/Water Interfaces."; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997, 519-521.

[4] Gutnick, D. L.; Bach, H. "Engineering Bacterial Biopolymers for the Biosorption of Heavy Metals; New Products and Novel Formulations."; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000, 54, 451-460.

[5] Henrik, W.; Stah, S. "Biotechnology Applications for Surface-Engineered Bacteria Biotechnol."; Appl. Biochem. 2004, 40, 209-228.

[6] Lebruna, L.; Junter, G. A.; Jouennea, A. T.; Mignot, L. "Exopolysaccharide Production by Free and Immoblized Microbial Cultures."; Enzyme Microb. Technol. 1994, 16, 1048-1054.

[7] Macaskie, L. "The Application of Biotechnology to the Treatment of Wastes Produced from the Nuclear Fuel Cycle: Biodegradation and Bioaccumulation as Means of Treating. Radionuclide-Containing Streams."; Critical Reviews in Biotechnology, 1991, 11(1), 41-112.

[8] Marqués, A. M.; Roca, X.; Dolores Simon-Pujol1, M.; Carmen Fuste, M.; Congregado, Francisco. "Uranium Accumulation by Pseudomonas Sp-EPS-5028."; Appl. Microbial. Biotechnol. 1991, 33, 406-410.

[9] Marqués, A. M.; Roca, X.; Dolores Simon-Pujol, M.; Carmen Fuste, M.; Congregado, Francisco. "Removal of Uranium by an Exopolysacharide from Pseudomonas Sp."; Appl. Microbial. Biotechnology 1990, 38, 574-578.

[10] Brown, Melanie J.; Lester, John N. "Comparison of Bacterial Extracellular Polymer Extraction Methods."; Applied and Environmental Microbiology, 1980, 179-185.

[11] Vieira, R. H. S. F.; Volesky, B. "Biosorption: a Solution to Pollution?"; Internatl. Microbiol. 2000, 3, 17–24.

[12] ملک‌زاده، فریدون و همکاران "بیوتکنولوژی میکروبی"، انتشارات دانشگاه تهران. 1380

[13] لطیفی، علیمحمد و همکاران "مجموعه مقالات چهارمین همایش تخصصی آلاینده های محیط زیست"، دانشگاه گیلان، 1380

www.SID.ir