

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

علیمحمد لطیفی^{1*}، فیروز ابراهیمی²، غلامرضا اولاد²

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 آمد که بیانگر ماهیت پلی ساکاریدی آن می‌باشد. علاوه بر این، نتیجه آزمایش Molish که حضور قندها و پلی ساکاریدها 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 اسپکتروفتومتری UV-Vis بهره گرفته شد و با استفاده از روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی ژل با نیترات نقره مشخص شد پروتئین‌های مختلف با وزن مولکولی 12-66 کیلو دالتون در شبکه پلیمری حضور دارند؛ این در حالی است که در ژل Native-PAGE هیچ‌گونه باند پروتئینی ظاهر نشد. نتایج اسپکتروسکوپی UV-Vis نیز وجود جزء پروتئینی را نشان نداد. این نتایج دال بر عدم 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. Ebrahimi², G. R. Oulad²

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

1. مقدمه

میکروارگانیزم‌ها در طبیعت، بیوپلیمرهای متنوعی را به شکل خارج سلولی تولید می‌کنند. این مواد پلیمری خارج سلولی، در واقع ترکیبات کلیدی برای اجتماع میکروارگانیزم‌ها در بیوفیلم، فلوک‌ها و لجن فعال می‌باشند. این مواد از جنس پلی‌ساکاریدها، پروتئین، نوکلئیک اسید، لیپید و دیگر ماکرومولکول‌های بیولوژیکی می‌باشند [1,3,4].

این ترکیبات خارج سلولی در پدیده‌های پیوستگی و چسبندگی سلول‌ها، خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد بیولوژیکی آن‌ها، پایداری مکانیکی، انتشار، جذب، خواص نوری اجتماعات میکروبی و هم‌چنین در حفاظت از ارگانیزم‌های داخل بیوفیلم در مقابل انواع بیوسایدها موثر هستند [1].

این بیوپلیمرها همانند آلژینات (تولید شده از سودوموناس آئروجینوزا و از توپاکتر وینلندی ئی)، گزانتان (تولید شده از گزانتوموناس کمپسترین) دکستران (تولید شده از لاکونستوک مزانتروئیدس و استریپتوکوکوس موتانس)، ژلان (تولید شده از سودوموناس الودا)، پولولان (تولید شده از ائوروبازیدوم پولولانس) و غیره، از نظر ساختاری عمدتاً پلی‌ساکاریدی هستند هر چند که در مواردی هم ممکن است به صورت ترکیبی همراه با مواد دیگر به صورت 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 که جز ساختمان پلیمری نمی‌باشند، پس از رها شدن به محیط ممکن است در داخل شبکه پلی‌ساکاریدی به دام افتند و چنین به نظر برسد که جزئی از ساختمان بیوپلیمر هستند. از طرفی آگزوپلیمر ممکن است بخشی از دیواره سلولی خود باکتری باشد مثل آنتی‌ژن O که بخش لیپوپلی‌ساکاریدی در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی است [1,3,4].

کپسول و لایه چسبناک (Slime layer) دو آگزوپلیمر اصلی مترشحه از باکتری‌ها بوده که عمدتاً پلی‌ساکاریدی هستند. کپسول به‌عنوان خارجی‌ترین لایه پوششی اطراف سلول است 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 اندازه 0/1 تا 10 نانومتر و یا بیشتر از سطح سلول به داخل محیط نفوذ کند و یک منطقه بافری را بین دیواره سلول و محیط

خارج ایجاد کند [1]. شکل دیگر آگزوپلیمر، لایه چسبناک است که بر خلاف کپسول از سلول جدا می‌گردد و در محیط رها می‌شود. تولید لایه چسبناک ممکن است تحت کنترل شرایط محیطی باشد. در حوزه‌های صنعتی و محیط‌های آبی، اصطلاح لایه چسبناک اغلب به نام بیوفیلم استفاده می‌شود که در روی سطوح مختلف تشکیل می‌گردد. بیوفیلم هم واجد سلول‌ها و هم آگزوپلیمر تولید شده توسط آن‌ها و هر گونه مواد جذب شده از محیط می‌باشد، بنابراین، خواص و ترکیب آن بر حسب نوع محیط و نوع تعریفی که از آن می‌شود متفاوت خواهد بود [1,3,4]. همان‌طور که اشاره شد این آگزوپلیمرها (کپسول و لایه چسبناک) به‌صورت یک بافر بین دیواره سلولی و محیط بیرونی عمل می‌کنند و برای سلول نقش حفاظتی دارند یعنی در واقع یک دیوار امنیتی در برابر مواد سمی و مضر مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، بیوسایدها، فلزات سمی و سنگین و حتی باکتریوفاژها، تشکیل می‌دهند [1,3,12].

بیوپلیمرهای کاربردهای وسیعی در زمینه‌های مختلف مثل صنایع غذایی و دارویی دارند. به‌عنوان مثال بیوپلیمر گزانتان که توسط باکتری گزانتوموناس کمپسترین تولید می‌شود، به‌عنوان عامل پایدارکننده، قوام‌دهنده، ژل‌ساز، سوسپانسیون‌کننده در ترکیب چاشنی‌ها، سس‌ها، آبگوشت، شربت، دسر، بستنی، پنیر، کیک، شیرینی و نیز به‌عنوان عامل سوسپانسیون‌کننده در رنگ‌های ژله‌ای در چاپ منسوجات و رنگ‌رزی، برای جلوگیری از پخش رنگ در کاغذسازی، در لعاب‌کاری سرامیک، در اسپری حشره‌کش‌ها، در حفاری چاه‌های نفت (برای افزایش بازیافت نفت) و در مواد ژل‌ساز برای تهیه مواد منفجره، پاک‌کننده‌ها، و دنودورانت‌ها استفاده می‌گردد [13]. از طرفی، بسیاری از آگزوپلیمرهای میکروبی در شرایط طبیعی به‌صورت پلی‌آنیون عمل می‌کنند یعنی دارای گروه‌های آنیونی فراوانی هستند که میل ترکیبی زیادی با کاتیون‌های فلزی دارند که بر همین اساس امروزه از آن‌ها در جذب و حذف آلاینده‌های محیطی به ویژه فلزات سمی و سنگین استفاده می‌شود [1,2,3,7,9,12].

مطالعات قبلی نشان‌دهنده تولید نوعی پلیمر خارج سلولی توسط یک گونه باسیلوس جدا شده از پساب‌های صنعتی بود که نقش اصلی را در جذب فلزات سنگین ایفاء می‌کند. تولید فراوان این پلیمر، ویژگی بارز این باکتری نسبت به سایر میکروارگانیزم‌های تولیدکننده بیوپلیمر است [13]. از آنجایی که جذب فلزات سنگین در باکتری مذکور توسط بیوپلیمر مترشحه

با روش‌های تخلیص با 2- پروپانول، تخلیص با استون و تخلیص با اتانول 96% استخراج گردید.

ج) استخراج به روش رقیق‌سازی با آب مقطر

نمونه 3 تا 5 برابر با آب مقطر رقیق‌سازی و سپس در 4000 دور به مدت 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 اگزوپلیمر مورد آزمایش در لوله ریخته و 2 قطره محلول الکی آلفا نفتول (5 درصد) به آن اضافه شده و سپس با دقت از کنار 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 Bligh و Dyer استفاده گردید. در این روش یک گرم از بیوپلیمر در یک ویال شیشه‌ای ریخته شد. سپس 30 سی سی از محلول کلروفرم - متانول (نسبت 2:1) روی نمونه اضافه شده و بعد نمونه به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه و در تاریکی نگه‌داری گردید. در پایان این مرحله، مجدداً 20 سی سی کلروفرم و 20 سی سی آب اضافه و محلول به دست 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 به مقدار زیاد و معمولاً بشکل قطرات شبنم تولید می‌نماید (شکل (1)). پس از تلقیح، باکتری داخل محیط GMS، به مدت 72 ساعت داخل شیکرانکوباتور 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 شرایط بدون هوادهی قرار گیرد، باکتری در حین رشد در سطح محیط کشت ایجاد

از آن صورت می‌گیرد، لذا مطالعه ماهیت ساختاری آن در اولین گام ضروری به نظر 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 به مقدار قابل توجهی می‌باشد [13].

باکتری داخل محیط GMS تلقیح و در شیکرانکوباتور با دمای 30 درجه سانتی‌گراد و دور 120 rpm به مدت 48 ساعت قرار گرفت.

1-2. 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 سی سی از محلول 2% EDTA (نمک تترا سدیم) به 100 سی سی از محلول حاوی اگزوپلیمر اضافه و سپس به مدت 3 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. نمونه در 14000 rpm به مدت 20 دقیقه در 4 درجه سانتی‌فیوژ 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 به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول روئی حذف و 2 برابر حجم آن، 2M NaOH به بیوماس راسب اضافه شد. پس از به هم زدن اولیه در دمای 20 درجه، به مدت 5 ساعت در دستگاه شیکرانکوباتور قرار داده شد. سپس نمونه تا میزان حجم اولیه با آب رقیق شده و نمونه‌ها مجدداً در 4000 دور به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت حذف کامل سلول‌ها محلول روئی با فیلتر استات سلولز 0/22 میکرومتر صاف شد. قند موجود در محلول‌های نهایی به دست آمده از دو روش فوق،

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

ب) فاز میانی: بیوپلیمر به صورت یک فاز جداگانه در این قسمت قرار گرفت که به علت رها شدن سلول‌های به دام 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 آگزوپلیمر مجدداً به آرامی شروع به جدا شدن از فاز کلروفرم کرده در قسمت رویی قرار گرفت.

از نتایج به دست 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، به خاطر 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

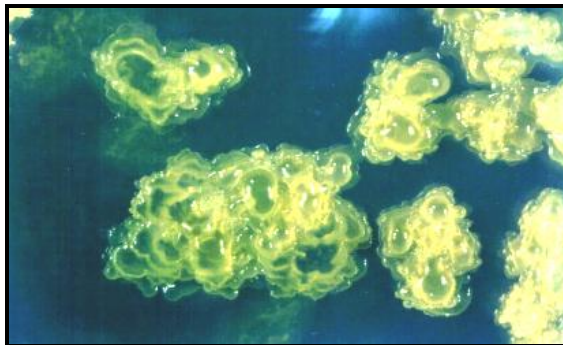
3-1. اثبات وجود قند در بیوپلیمر

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

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

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

بیوفیلیم می‌کند و بعد در زیر بیوفیلیم شروع به تولید آگزوپلیمر می‌نماید که به تدریج به سمت پائین به صورت یک پرده لغزنده امتداد می‌یابد.



شکل 1. تولید آگزوپلیمر روی محیط نوترینت آگار توسط باکتری



شکل 2. تولید آگزوپلیمر 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، گزپلول و آب بود. نتایج حاصل بیانگر عدم حلالیت خوب این ترکیب در حلال‌های مذکور بود. به طوری که این ترکیب در هیچ کدام از حلال‌های فوق کاملاً حل نمی‌شود. از طرفی، در محلول بنزن، اتر و گزپلول، پلیمر بلافاصله در ته لوله قرار می‌گیرد، اما در کلروفرم، پلیمر در قسمت رویی محلول قرار گرفت. زمانی که از حلال‌های فوق به همراه یک حلال قطبی مثل آب یا الکل استفاده می‌شد، آگزوپلیمر در فاز میانی قرار می‌گرفت. به عنوان مثال در استفاده از کلروفرم، 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 به هم زده شد که 3 فاز تشکیل شد:

به صورت یک پرده لغزنده به قسمت تحتانی ترشح می گردد (تست مولیش بیوفیلیم منفی بود)؛

S4= بیوپلیمر مترشحه از باکتری که در شرایط بدون هوادهی در زیر بیوفیلیم به صورت یک پرده لغزنده تولید می شود؛
S5= بیوپلیمر تولید شده توسط باکتری در محیط GMS در شرایط هوادهی.

نمونه های فوق با روش های پروتئین سنجی لوری و برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در جدول (1) نشان داده شده است. با حصول چنین نتایجی وجود پروتئین به عنوان بخش دیگری از ساختمان بیوپلیمر ثابت گردید، ولی این که آیا این پروتئین ها واقعاً جزیی از ساختمان بیوپلیمر می باشند یا این که توسط سلول باکتری به طور جداگانه تولید شده و سپس به داخل شبکه به دام افتاده اند، نیاز به بررسی بیشتری داشت که در ادامه از روش ژل الکتروفورز در حالت طبیعی و دناتور (SDS-PAGE و Native-PAGE) استفاده شد. دو نمونه S4 و S5 که طبق جدول (1) مقدار پروتئین بیشتری را در مقایسه با بقیه نمونه ها نشان داده بودند، انتخاب گردیدند. همان طور که در شکل (3) مشاهده می شود در حالت Native-PAGE هیچ گونه باند پروتئینی تشکیل نشد که گویای دو حالت می تواند باشد:

1. در محیط هیچ گونه پروتئین وجود ندارد؛
2. پروتئین ها درگیر با شبکه بیوپلیمری می باشند و این امر باعث عدم نفوذ پروتئین ها به داخل ژل گردیده است که هیچ گونه باندهی تشکیل نخواهد شد.

جدول 1. نتایج حاصل از پروتئین سنجی به روش برادفورد

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

برای اثبات وجود پروتئین های درگیر با شبکه بیوپلیمری، از روش SDS-PAGE نیز استفاده شد؛ زیرا SDS باعث رهایی پروتئین ها از شبکه بیوپلیمری می شود. در این حالت باندهای پروتئینی تشکیل گردید که بیانگر وجود پروتئین هایی 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 نمونه S1 تا S4 هیچ گونه پیکری

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 - و روش رقیق سازی با آب مقطر استفاده شد.

محلول های رویی به دست آمده از روش های مذکور، به طور 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 پلی ساکارید به صورت پودر سفید رنگ استخراج شد. با این نتیجه، وجود قند (پلی ساکارید) به عنوان بخشی از ساختمان بیوپلیمر به اثبات رسید.

3-2. اثبات وجود لیپید در ساختمان بیوپلیمر

برای این منظور از روش Bligh و Dyer (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 می باشد.

(ب) فاز میانی: به صورت یک صفحه صورتی رنگ، ترد و شکننده ظاهر شد (به خاطر حذف لیپیدها از ساختمان بیوپلیمر).

(ج) فاز تحتانی (کلروفرم): به خاطر حل شدن لیپیدها در کلروفرم، این فاز شیری رنگ بود.

فاز رویی و میانی جدا و فاز کلروفرم در تاریکی و در 50 درجه سانتی گراد داخل اتانک گرم (فور) قرار گرفت و پس از تبخیر شدن کلروفرم وزن خشک لیپید اندازه گیری 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؛

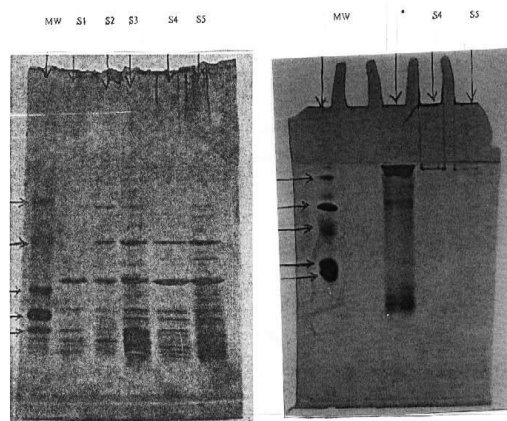
S2= نمونه S1 پس از استخراج قند آن به روش EDTA و پروپانول، قسمت راسب شده در آب مقطر رقیق و سپس برای تست پروتئین آماده شد؛

S3= بیوفیلیم تشکیل شده در سطح محیط GMS، که در شرایط بدون هوادهی به وجود می آید. در قسمت زیرین آن اگزوپلیمر

4. مراجع

- [1] Ehrlich, 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 Immobilized 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-Pujol, M.; Carmen Fuste, M.; Congregado, Francisco. "Uranium Accumulation by *Pseudomonas Sp-EPS-5028.*"; *Appl. Microbiol. 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 Exopolysaccharide from *Pseudomonas Sp.*"; *Appl. Microbiol. 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

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 آن جایی 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.