تولید بیو پلیمر پلولان توسط شبه مخمر *Aureobasidium pullulans* و بهینه‌سازی آن

غلامرضا قزلباش[1]*، ایرج نحوی[2]، منوچهر توسلی[2] و گیتی امتیازی[2]
[1]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
[2]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
* مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: *rghezelbash@scu.ac.ir*
(دریافت: ۸۵/۲/۱۲ ؛ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۹)

چکیده

Aureobasidium pullulans به صورت یک مخمر سیاه در آسکومیست ها راسته دوتییدال ها طبقه بندی می‌گردد. در این تحقیق ابتدا سویه های مختلفی از *A. pullulans* از طبیعت جدا شد و بهترین سویه (سویه ۵۱) برای بهینه‌سازی تولید پلولان انتخاب شد. مقدار پلولان اندازه‌گیری و با آنزیم پلولاناز (E.C.3.2.1.41) درجه خلوص آن نیز تعین گردید. در بهینه‌سازی منبع کربن دو منبع گلوکز و سوکروز بررسی شدند و سوکروز که تولید بهتری داشت (۴۰ g/l) به عنوان منبع کربن انتخاب گردید. سپس با درصد های مختلف سوکروز راندمان تولید بررسی و مقدار ۵٪ به عنوان بهترین درصد قندی انتخاب شد. بعد از این مراحل، منبع ازت با سه نوع عصاره مخمر، سولفات آمونیوم و نیترات سدیم به طور جداگانه بهینه‌سازی شدند. سپس هوادهی با دورهای۱۸۰،۱۲۰و۲۰۰ دور در دقیقه (rpm)، ۹- ۴= pH و دماهای ^{o}C ۲۵، ۲۸ و ۳۲ نیز برای بدست آوردن به ترتیب بهترین دور هوادهی، pH و دما مورد مطالعه قرارگرفتند که به ترتیب rpm ۱۸۰، ۷/۵ و^{o}C ۲۸ بهترین‌های این عوامل بودند. از این سویه دراین شرایط بهینه بعد از ۵ روز g/l ۴۸ پلولان تولید شد.

واژه‌های کلیدی: ، *Aureobasidium pullulans*، پلولان، پلولاناز (E.C.3.2.1.41).

مقدمه

A. pullulans یک ساپروفیت رایج در فیلوسفر اکثر گیاهان غلات وطیف گسترده‌ای از میوه‌ها می‌باشد. بوئر(Bauer) اولین مطالعات را در تولید پلی‌ساکارید توسط این شبه مخمر انجام داد و برنیر (Bernier) نیز این بیوپلی‌مر را جدا و شروع به بررسی مشخصات آن کرد. در سال ۱۹۵۹ بندر (Bender) و همکارانش آن را پلولان نامگذاری کردند. *A. pullulans* . معمولاً از نمونه‌های محیطی جدا می‌گردد. آئروبازیدیوم ها درخاک و آب، به خصوص روی برگ‌های تجزیه شده، چوب و دیگر مواد گیاهی یافت می‌گردند. این میکروارگانیسم‌ها پلی‌مورفیسم می‌باشد و دارای فرم‌های شبیه مخمری، بلاستوسپور جوان، بلاستوسپور متورم، میسلیوم و فرمهای کلامیدوسپوری می‌باشند. این تغییرات مورفولوژی به شرایط کشت بستگی دارد. در واقع مورفولوژی سلولی این شبه مخمر فوق‌العاده تحت تاثیر فعالیتهای متابولیکی کشت می‌باشد که این خود روی سرعت رشد و سرعت تولید و بازدهی اثرگذار است (Deshpande *et al.*1992 Leathers 2003).

پلولان هوموپلی ساکاریدهایی خطی از گلوکز بوده و اغلب به صورت پلی مری از واحدهای مالتوتریوز که توسط پیوند های (۶-۱) α به هم متصل شده‌اند، تعریف می‌گردند. این پلیمر و مشتقات آن دارای پتانسیل های کاربردی فراوان غذایی، دارویی و صنعتی می‌باشد. پلولان بیوپلیمری است محلول در آب که جرم مولکولی آن بین $۱/۳\times۱۰^{۶}$~۳ متغیرمی‌باشد (Deshpande *et al.* 1992). وزن مولکولی پلولان به نوع سویه‌ی میکروارگانیسم، pH، تکنیک‌های کشت و سوبسترای استفاده شده بستگی دارد (Shingel 2004). پلولان توسط بعضی از سویه‌های*A. pullulans* به صورت یک پلی‌ساکارید خارج سلولی محلول در آب تولید می‌گردد. الگوی اتصالی ویژه‌ای که در این بیو پلیمر وجود دارد، خصوصیات فیزیکی منحصربه فردی به آن می‌دهد. پلولان دارای خواص چسبندگی بوده و می‌توانند برای ساختن فیبرها و فیلم‌های مقاوم به اکسیژن و قوی به‌کار روند. این پلیمر و مشتقات آن دارای پتانسیل‌های کاربردی فراوان غذایی، دارویی و صنعتی زیادی می‌باشند. پلولان به دلیل مقاومتش به آمیلازهای پستانداران، انرژی‌زا نبوده و به همین دلیل به‌عنوان ماده‌یی در فرمولاسیون مواد غذایی کم کالری استفاده می‌گردد (Leathers 2003). مطالعات نشان می‌دهد که پلولان به‌صورت رژیم غذایی به صورت پری‌بیوتیک عمل می‌کند و به همین دلیل موجب رشد *بیفیدوباکترهای* (*Biphidobacteria*) مفید دستگاه گوارش می گردد(Kurtzmn & Fell 1998). مشتقات پلولان به‌صورت کونجوگاسیون‌های غیر سمی برای واکسن‌ها و اینترفرون‌ها استفاده

می‌گردد. به علاوه می‌توان از آن در انتقال هدفمند لیپوزوم‌ها نیز استفاده کرد (Lee *et al.* 1999 و Deshpande *et al.* 1992). همین طور در هدف‌یابی DNA واکسن‌های کونجوگه شده با پلولان به بافت کبد، نیز نقش ارزشمندی دارند (Hosseinkhani *et al.* 2002). کاربردهای ارزشمند این پلیمر درصنعت، تولید و بهینه سازی تولید این پلیمر را شاخص می کند. در این بررسی *آئروبازیدیوم* ها از فیلوسفر گیاهان بومی جدا شدند و تقریبا" برخلاف تحقیقات مشابه اکثر فاکتورهای موثر بر تولید این پلیمر نیز بهینه شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی *Aureobasidium pullulans*:

برگ‌ها و قسمت‌های مختلف گیاه اعم از میوه و دانه را برای مدت ۳ روز در دمای ۲۵ °C خیسانده و سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول فوق به محیط حداقل نمکی (pH = ۴) (حاوی ۱ ٪ گلوکز و ۱۰ µg/ml کلرامفنیکل) اضافه شد. بعد از دو روز شیک در دمای ۲۵ °C، نمونه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه ساکن قرار داده تا میسیلیوم‌ها رسوب کنند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سطح محیط مایع قبلی که حاوی فرم‌های مخمری بوده به محیط آگاردار حداقل نمکی (pH = ۵) (حاوی یک درصد گلوکز و ۱۰ µg/ml کلرامفنیکل) اضافه شد(Lee *et al.* 1999). بعد از ۴ روز، کلنی‌های تک را به محیط تولید انتقال داده تا تولید یا عدم تولید پلی‌ساکارید مورد بررسی قرار گیرد.

شناسایی *Aureobasidium pullulans*:

جهت شناسایی *آئروبازیدیوم*های جدا شده از خواص مورفولوژیکی اعم از نحوه‌ی تولید مثل رویشی(جوانه زدن، تقسیم دوتایی، تولید کونیدی)، محل تشکیل جوانه، تعداد جوانه، شکل سلول، خصوصیات رشد بر روی محیط‌های کشت جامد و توانایی جذب و تخمیر هیدرات کربن استفاده گردید (Kurtzman *et al.* 1998).

تولید بیوپلی مر پلولان:

بعد از جداسازی مخمرها از طبیعت، یک لوپ از آن را از روی محیط جامد برداشته و به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط پیش تولید (pH = ۵/۵) (سوکروز ۳٪، سولفات آمونیوم ۰/۶g/l، عصاره مخمر ۰/۴g/l، فسفات پتاسیم ۵g/l، سولفات منیزیم آب دار ۰/۲g/l، کلرید سدیم ۱g/l) اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۲۸ °C برای ۴۸ ساعت روی شیکر با دور ۱۸۰ rpm شیک گردید. بعد از محیط فوق به نسبت ۵ درصد به ارلن های حاوی محیط تولید (pH = ۷/۰) (سوکروز ۵ ٪، سولفات آمونیوم ۰/۶ g/l، عصاره مخمر ۰/۴ g/l، فسفات پتاسیم ۵g/l، سولفات منیزیم آب دار ۰/۲g/l، کلرید سدیم ۱g/l) تلقیح شد. ارلن های فوق در دمای ۲۸ °C برای ۵ روز با دور ۱۸۰ rpm شیک گردیدند. سپس محیط‌های فوق در دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جدا شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه حرارت داده شد تا آنزیم های خارج سلولی غیر فعال گردند. بعد از آن با اضافه کردن یک درصد (گرم درصد) زغال فعال و شیک درrpm ۲۰۰ برای ۱۵ دقیقه پیگمان ملانین جدا شد. با اضافه کردن دو حجم اتانل سرد و قراردادن نمونه‌های حاوی اتانل در یخچال (°C ۴) به مدت ۱۲ ساعت پلی‌ساکاریدهای تولید شده، رسوب کردند. رسوب‌های تولید شده را با آب و الکل دو بار شستشو داده و بعد از خشک سازی پلی‌ساکاریدها، وجود یا عدم وجود پلولان در آنها بررسی گردید (Lazaridou *et al.* 2002, Ducrey *et al*. 1992, Roukas 1999).

روش‌های اثبات پلولان

در این بررسی از روش شناسایی با آنزیم پلولاناز (E.C.3.2.1.41) (سیگما - آلداریچ) استفاده شد. این روش بهترین راه شناسایی پلولان می باشد. درجه خلوص پلی ساکارید تولیدی نیز توسط همین آنزیم و مقایسه آن با اثر همین آنزیم بر مقدار مشخص پلولان خالص استاندارد (سروا - آمریکا) تعیین شد. از آنجائیکه درجه خلوص پلولان حاصله بالا بود (۱۰۰- ۹۵ درصد) از همین روش برای اندازه گیری استفاده گردید. روش کار به این صورت است که ابتدا از سوپر ناتانت کشت حاصله دو نمونه تهیه شد. یک نمونه که حاوی سوپر ناتانت کشتی (۱۰۰ میکرولیتر) به علاوه بافر (۴۰۰ میکرولیتر) بود، به عنوان بلانک (شاهد) و از نمونه‌ی دیگر که علاوه بر موارد فوق آنزیم پلولاناز (E.C.3.2.1.41) (۱۰۰ میکرولیتر) نیز به آن اضافه شده بود به عنوان نمونه‌ی مجهول که پلی‌ساکارید آن می‌بایست تعیین می‌شد، استفاده گردید. سپس هر دو نمونه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ °C انکوبه گردید و به هر کدام از نمونه ها یک میلی‌لیتر دی‌نیتروسالیسیلات (DNS) اضافه شد و در دمای°C ۱۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوشانده شد. سپس نمونه‌ها در آب یخ سرد گردیدند و نمونه‌ها با بالن حجمی به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب آن ها در ۵۴۶ نانومتر مطالعه شد. در نهایت مقدار پلولان تولیدی با مقایسه جذب حاصله محلول فوق و رجوع به منحنی استاندارد تهیه شده از پلولان خالص، تعیین گردید (Israilides *et al.* 1998 و Ducrey *et al.* 1992).

بهینه سازی تولید پلولان:

در این بررسی فاکتورها تک تک و بر اساس ارجحیت آنها در تولید بهینه شدند. روش کار به این صورت بود که ابتد منبع کربن در دو نوع گلوکز و سوکروز بهینه شد، بعد از به دست آوردن بهترین عامل کربنی منبع ازت بهینه شد. در بهینه سازی منبع ازت عصاره مخمر، نیترات سدیم و سولفات آمونیوم به صورت تک تک مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه در یک طرح دو عاملی اثر مقدارهای های مختلف عصاره مخمر بر روی درصدهای مختلف سولفات آمونیوم نیز بررسی گردید. بعد از این ها pH در هفت سطح و هوادهی در سه سطح بررسی گردید.

نتایج

در این بررسی سه سویه از *A. pullulans* از طبیعت جدا شد. برای شناسایی آنها به علاوه فرم مورفولوژی و ظاهر کلنی‌ها و مطالعه‌ی میکروسکوپی از بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نیز استفاده شد (جدول۱). از سویه‌های جدا شده، سویه ۵۱ در مقایسه با سویه‌های دیگر کلنی‌های لعابی تری داشت. به علاوه این سویه در مقایسه با سویه ۵۲ مقدار کمتری نیز ملانین تولید می‌کرد. سویه ۵۳ بر خلاف دو سویه قبلی که نهایتا به رنگ سبز تیره در می‌آمدند، رنگی متمایل به صورتی داشت. به دلیل تولید این رنگدانه‌های ملانینی و شبه ملانینی ست که به آنها مخمر سیاه نیز می‌گویند (شکل). تست‌های تخمیری و تست‌های جذبی از تست‌های تائیدی شناسایی مخمرها و شبه مخمرها می‌باشد که در جدول ۱ آورده شده است.

در مورد اثر منبع کربن دو قند گلوکز و سوکروز بررسی شدند. منحنی تولید بیوپلی‌مرپلولان درهر سه سویه ۵۱، ۵۲ و ۵۳ مطالعه شد تا مقدار تولید و زمان بیشترین تولید محاسبه گردد (شکل۲، ۳ و ۴).

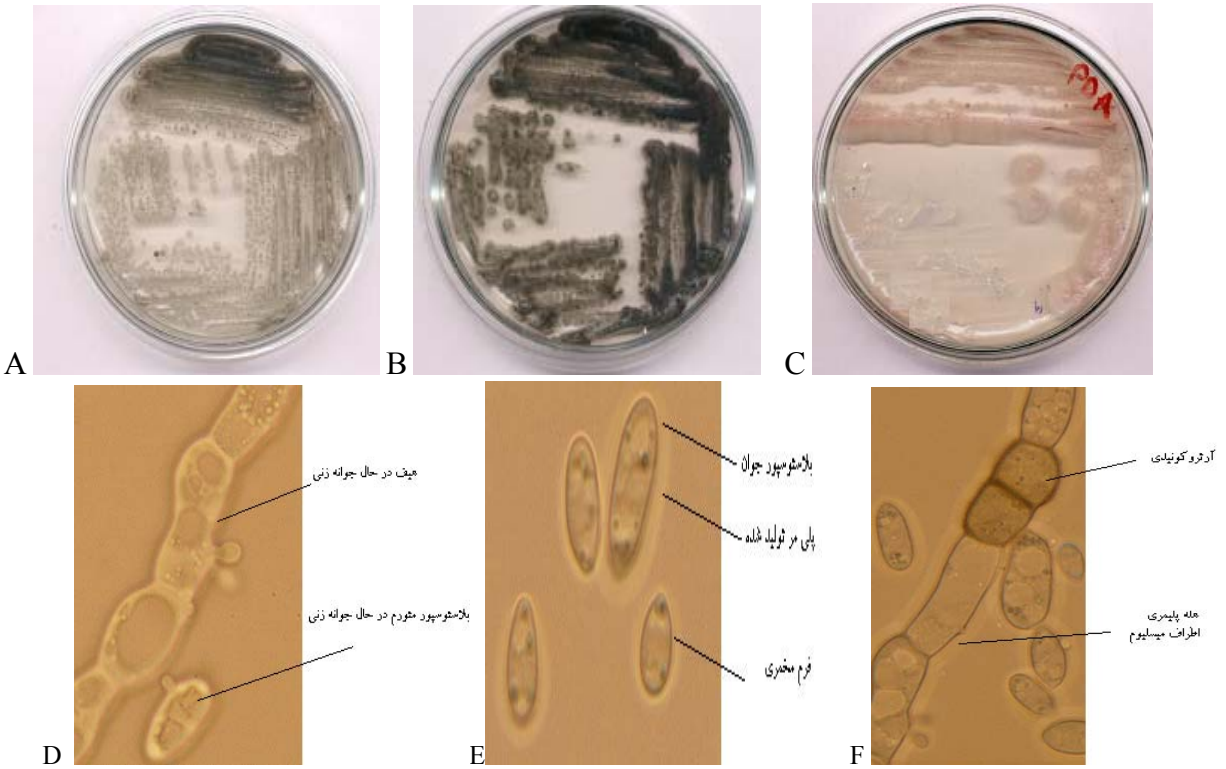
مقدار تولید در سه سویه جدا شده با دو منبع کربن گلوکز و سوکروز (هر دو ۵ درصد) مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۶).

همان طور که دیده می‌شود سویه ۵۱ در قند سوکروز تولید بیشتری دارد و بایستی گفت که این سویه در قند گلوکز و سوکروز به ترتیب در روز نهم و پنجم به بیشترین تولید خود رسید. سویه های ۵۲ به ترتیب روی گلوکز و سوکروز در روز پنجم و سوم و سویه ۵۳ نیز روی گلوکز و سوکروز در روز سوم و دوم بیشترین تولید را داشتند. بطوریکه سویه ۵۱ در گلوکز و سوکروز به ترتیب ۲۸/۵۲ و ۴۰/۱۶۴ گرم بر لیتر پلولان ، سویه های ۵۲ و ۵۳ در گلوکز و سوکروز به ترتیب ۸/۸۵۲ ، ۱۵/۰۸۲ و ۷/۳۷۷، ۱۸/۰۳۳ گرم بر لیتر پلولان تولید می کردند. از آن جایی که بهترین سویه ، سویه ۵۱ بود، بازده تولید سویه ۵۱ در درصد های مختلف قندی محاسبه شد تا بهترین درصد قندی نیز به دست آید. همان طوریکه دیده می شود. بیشترین بازده در محیط با قند ۵ درصد بدست آمد. (شکل ۶). پس سویه ۵۱، بهترین سویه برای تولید پلولان وسوکروز ۵ درصد به عنوان بهترین منبع قندی انتخاب شدند.

در بهینه سازی منبع ازت ابتدا سه منبع مختلف عصاره مخمر، نیترات سدیم و سولفات آمونیوم به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲ و ۳).

جدول ۱- تست های بیوشمیایی سویه های جدا شده مولد پلولان (+: انجام واکنش، -: عدم انجام واکنش)

نوع آزمایش	نوع قند	*A. pullulans*51	*A. pullulans*52	*A. pullulans*53
تخمیر	گلوکز	-	-	-
	گالاکتوز	-	-	-
	سوکروز	-	-	-
	مالتوز	-	-	-
	لاکتوز	-	-	-
	رافینوز	-	-	-
	ترهالوز	-	-	-
جذب (رشد)	گلوکز	+	+	+
	گالاکتوز	+	+	+
	سوکروز	+	+	+
	مالتوز	+	+	+
	سلوبیوز	+	+	+
	ترهالوز	+	+	+
	لاکتوز	+	+	+
	ملی بیوز	+	+	+
	رافینوز	+	+	+
	ملی زیتوز	+	+	+
	د-زایلوز	+	+	+
	ال-آرابینوز	+	+	+
	د-ریبوز	+	+	+
	ال-رامنوز	+	+	+
	د-مانیتول	+	+	+
	سالیسین	+	+	+
	اینوزیتول	+	+	+
	کراتینین	+	+	+
	سیترات	+	+	+



شکل۱- نمای میکروسکوپی و ماکروسکوپی شبه مخمر *A. pullulans*

A : کلنی ***A. pullulans*** سویه ۵۱ روی محیط **PDA** . این سویه در مقایسه با سویه های دیگر رنگدانه کمتری تولید می کند و به همین دلیل محیط آن کاملا" سیاه نمی گردد.

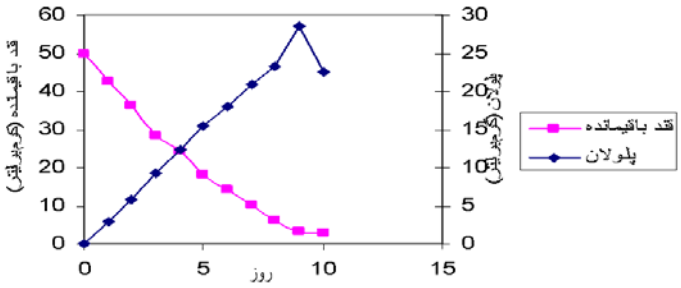
B: کلنی ***A. pullulans*** سویه ۵۲ روی محیط **PDA**. این سویه در مقایسه با سویه ۵۱ رنگدانه های ملانینی بیشتری تولید می کند و بعلاوه محیط را بسیار زودتر سیاه می کند.

C: کلنی ***A. pullulans*** سویه ۵۳ روی محیط **PDA**. این سویه هم رنگدانه تولید می کند و بعلاوه در مقایسه با دو سویه دیگر تولید پلولان کمتری نیز دارد.

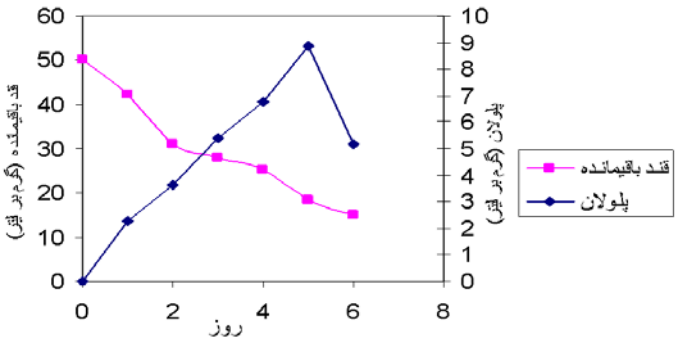
D: بلاستوسپور متورم و هیف که هر دو در حال جوانه زنی می باشند.

E: بلاستوسپور جوان، پلیمر تولید شده و فرم های مخمری

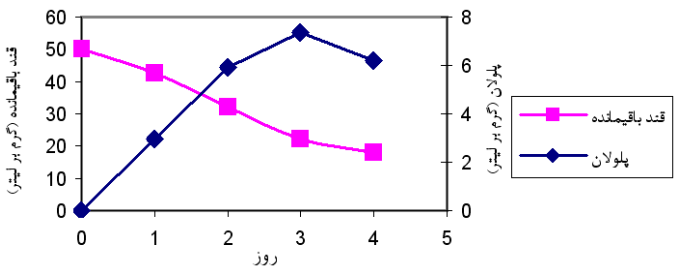
F: آرتروسپور یا آرتروکونیدی، مسیلیوم ها و هاله پلیمری اطراف آن ها که در این شبه مخمر کلید شناسایی می باشد.



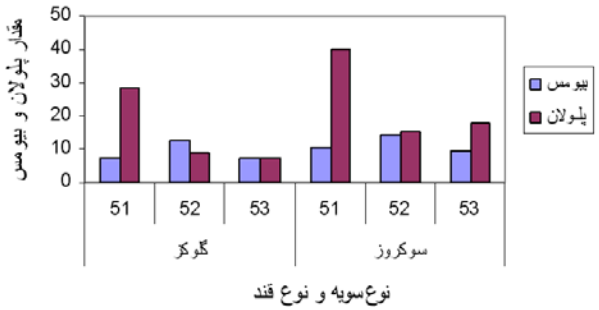
شکل ۲- منحنی تولید پلولان *A. pullulans* 51 در محیط با منبع کربن گلوکز (۵٪) . با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز نهم مقدار بیو پلمر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می‌رسد.



شکل۳- منحنی تولید پلولان *A. pullulans* 52 در محیط با منبع کربن گلوکز (۵٪). با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز پنجم مقدار بیو پلمر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می‌رسد.

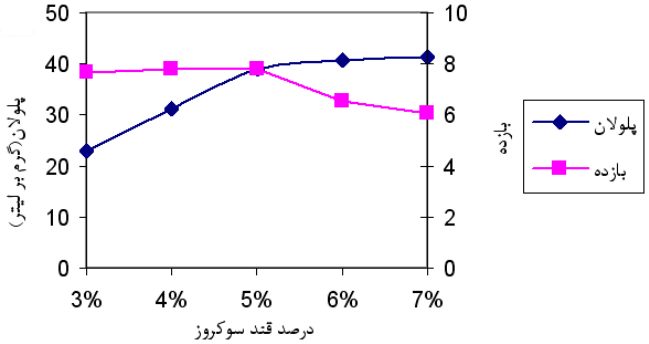


شکل ۴- منحنی تولید پلولان *A. pullulans* 53 در محیط با منبع کربن گلوکز (٪۵). با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز سوم مقدار بیو پلمیر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می‌رسد.



شکل۵- مقادیر تولید پلولان در سویه های مختلف *A. pullulans* در دو محیط سوکروز (٪۵) و گلوکز (٪۵). همانطور که مشخص است سوکروز در مقایسه با گلوکز قند بهتری است. این مطلب در هر سه سویه شبه مخمری صدق می کند که *A. pullulans* 51 نسبت به دوتای دیگر تولید بیشتری دارد.

بهترین مقدار عصاره مخمر، نیترات سدیم و سولفات آمونیوم به ترتیب۳ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر بود که به ترتیب ۳۴/۰۹۸، ۱۲/۹۵۱ و ۴۷/۵۴۱ گرم بر لیتر پلولان تولید شد. چون اکثر مقالات سولفات آمونیوم و عصاره مخمر ر ا به عنوان منبع ازت ترکیبی استفاده می کردند، اثر غلظت های مختلف عصاره ی مخمر با مقادیر مختلف سولفات آمونیوم بررسی گردید(جدول ۴). همان طور که نشان داده شده است، مقدار ۰/۶ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم با ۰/۶ گرم بر لیتر عصاره مخمر بیشترین اثر را در تولید داشت. در همه موارد برای جداسازی پلی ساکارید های اسیدی از ستیل تری متیل آمونیوم بروماید استفاده شد که در پلیمر تولیدی مقدار قابل توجهی از پلی ساکارید های اسیدی دیده نشد.



شکل۶- منحنی اثر درصدهای مختلف قند سوکروز بر تولید پلولان در *A. pullulans* 51 . بازده تولید بر اساس مقدار گرم پلولان تولید شده بر مقدار قند مصرف شده (Yp/s) مشخص شده است.

در مطالعه pH، هفت سطح مختلف انتخاب شد بطوریکه pH =۷/۵ مناسب ترین pH برای تولید پلولان در توسط سویه ۵۱ به دست آمد (شکل ۷). در بهینه سازی سرعت هوا دهی نیز بیشترین تولید در ۱۸۰rpm بدست آمد (شکل ۸). به علاوه بهترین دما برای تولید پلولان نیز دمای ۲۸ °C بود (شکل ۹).

جدول(۲): مقایسه مقدار تولید پلولان و بیومس در *A. pullulans* 51 با منابع مختلف ازت در حضور قند گلوکز (٪۵)

منبع ازت											
سولفات آمونیوم(گرم بر لیتر)				عصاره مخمر(گرم بر لیتر)				نیترات سدیم(گرم بر لیتر)			
غلظت اولیه	پلولان	بیومس	قند باقیمانده	غلظت اولیه	پلولان	بیومس	قند باقیمانده	غلظت اولیه	پلولان	بیومس	قند باقیمانده
۰	۰	۲/۲۷	۱۴/۸۱	۰/۱	۰	۱/۲۶	۱۶/۲۳	/۰۲	۰	۰/۹۷	۱۳/۴۸
۰/۱	۳/۲۳۴	۴/۳۸	۱۰/۶۴	۰/۷	۱۱/۲۴	۳/۳۶	۱۴/۷۴	۰/۰۶	۰	۱/۱۱	۹/۶۳
۰/۳	۱۲/۴۱۱	۵/۱۱	۷/۵۹	۱/۵	۱۴/۷۱	۵/۲	۹/۱۱	۰/۱	۳/۲۱۱	۱/۲۹	۷/۳۸
۰/۶	**۱۹/۵۸۷**	**۵/۲۸**	**۵/۳۸۴**	۲	۱۹/۱۲	۷/۵۸	۶/۳۹	**۰/۳**	**۹/۴۶۱**	**۱/۶۶**	**۴/۴۱**
۱/۰	۱۷/۴۸۱	۷/۵۹	۲/۲۵	**۳**	**۲۲/۸۴**	**۷/۷۸**	**۰/۶۷**	۰/۴	۷/۹۸۰	۲/۲۳	۲/۳۴
۱/۲	۱۴/۱۲۰	۹/۴۴	۲/۰۰	۴	۱۸/۶۴	۸/۸۶	۰/۴۶	۰/۵	۵/۴۵۹	۲/۴۹	۱/۱۱

جدول ۳- مقایسه مقدار تولید پلولان و بیومس در *A. pullulans* 51 با منابع مختلف ازت در حضور قند سوکروز (۵٪).

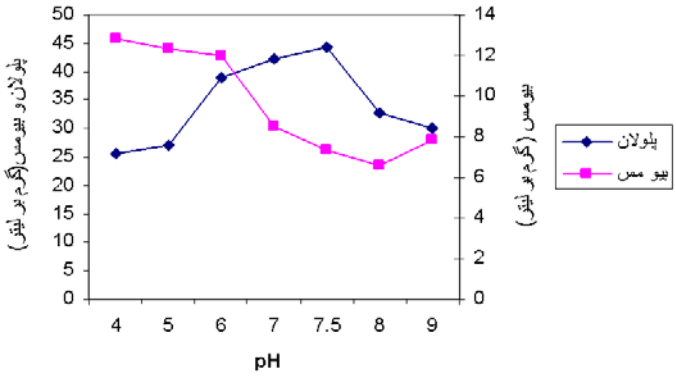
منبع ازت								
سولفات آمونیوم(گرم بر لیتر)			عصاره مخمر(گرم بر لیتر)			نیترات سدیم(گرم بر لیتر)		
غلظت اولیه	پلولان	بیومس	غلظت اولیه	پلولان	بیومس	غلظت اولیه	پلولان	بیومس
۰	۰	۴/۴۷	۰/۱	۰	۳/۵۹	/۰۲	۰	۱/۵۶
۰/۱	۷/۸۶۹	۶/۵	۰/۷	۱۸/۱۹۷	۵/۳۵	۰/۰۶	۰	۱/۸۵
۰/۳	۱۹/۵۰۸	۷/۱۹	۱/۵	۲۶/۵۵۷	۷/۰۵	۰/۱	۶/۳۹۳	۲/۰۱
۰/۶	**۴۷/۵۴۱**	**۷/۷۴**	**۲**	۳۱/۶۳۹	۱۰/۴۴	**۰/۳**	**۱۲/۹۵۱**	**۲/۳۸**
۱/۰	۳۸/۵۲۴	۱۱/۴۵	**۳**	**۳۴/۰۹۸**	**۱۰/۹۶**	۰/۴	۱۰	۲,۸۹
۱/۲	۳۱/۴۷۵	۱۵/۸	۴	۳۱/۳۱۱	۱۳/۰۶	۰/۵	۸/۳۶۱	۲/۹۵

بحث

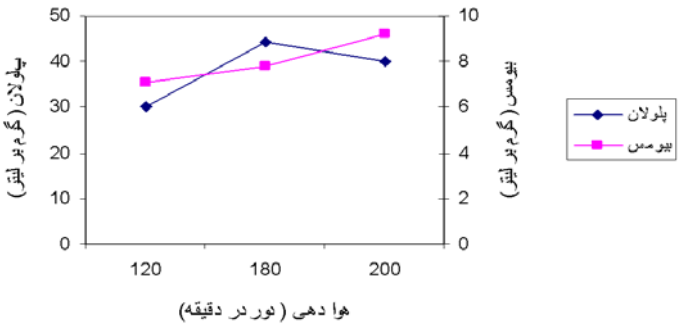
در مورد جداسازی *A. pullulans* اکثر مقالات منبع جداسازی آن را منابع محیطی به خصوص سطوح گیاهان گزارش داده‌اند. در این مطالعه نیز سویه‌های جدا شده از این نمونه‌ها محیطی بودند. به طوریکه ایزوله‌های ۵۱ و ۵۲ از برگ و گل گیاه رز و ۵۳ از برگ درختان سیب جدا گردیدند. بنا بر پیشنهاد سروی (Survey) اکثر سویه‌های این شبه مخمر قادر به تولید پلولان می‌باشند (Roukas 1998). در این بررسی نیز هر سه سویه‌ی *A. pullulans* قادر به تولید پلولان بودند. در شناسایی این شبه مخمرها وجود کلامیدوسپورها یا اسپورهای با دیواره‌ی ضخیم یک کلید شناسایی مهم می‌باشند. به علاوه خصوصیات مورفولوژیکی تست‌های بیوشیمیایی تخمیر وجذب هیدرات کربن نیز موئید *A. pullulans* بودن این مخمرها بودند.

جدول۴- نتایج طرح تصادفی مقادیر مختلف دو منبع ازت بر تولید پلولان در *A. pullulans* 51 با سوکروز (۵٪).

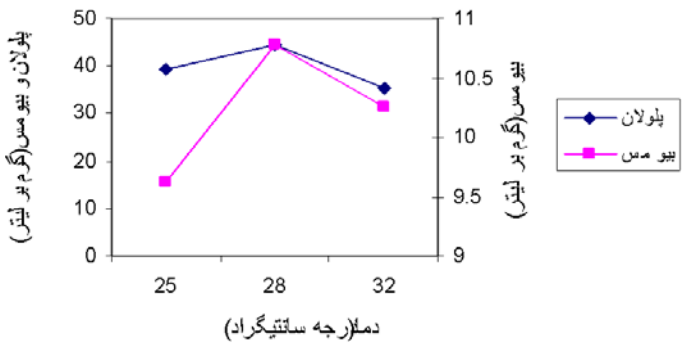
مقدار و نوع منبع ازت		عصاره مخمر (گرم بر لیتر)		
		۰/۱	۰/۶	۱/۰
سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	۰/۲	۷/۲۱	۲۵/۰۸	۲۶/۸۸
		۸/۵۲	۲۱/۸۵	۲۲/۰۳
	۰/۴	۲۰/۱۶	۳۰/۴۸	۲۶/۰۶
		۱۶/۵۵	۳۶/۷۸	۲۱/۳۱
	۰/۶	۲۴/۱۲	۴۲/۳۸	۲۴/۲۳
		۲۶/۱۵	۴۴/۵۶	۲۲/۴۸
	۱	۳۲/۱۳	۳۶/۳۲	۲۱/۹۶
		۳۸/۳۱	۳۸/۵۸	۱۶/۹۲



شکل۷- اثر pH بر روی میزان تولید پلولان توسط *A. pullulans* 51 در سوکروز (۵٪). با افزایش pH تولید کاهش می یابد اما همانطور که مشخص است pH های پایین برای تولید بیومس مناسب هستند.



شکل ۸- اثر هوادهی های مختلف بر روی میزان تولید پلولان توسط *A. pullulans* 51 در سوکروز (۵٪). افزایش هوادهی نیز موجب افزایش بیومس می شود اما این افزایش هوادهی تا یک حد خاصی موجب افزایش بیو پلیمر می گردد و هوادهی بیش از حد تنها موجب افزایش بیومس می گردد بدون آنکه تولید پلولان افزایش یابد.



نمودار (۹): اثر دماهای مختلف بر روی میزان تولید پلولان توسط سویه *A. pullulans* 51 در سوکروز (۵٪). تغییرات دما روی هر دو جریان کربنی یعنی بیومس و تولید بیو پلیمر است به طوری که افزایش دما موجب افزایش رشد می گردد که البته هر نوع افزایش بیومسی موجب افزایش تولید پلولان نمی گردد.

این پلیمر برخلاف نشاسته هیچ واکنشی با ید (I2) نشان نمی دهد. مطالعات با آنزیم پلولاناز (EC 3.2.1.41) که بطور اختصاصی پیوندهای $\propto (1 \rightarrow 6)$ را در پلولان برش می دهد و به همین دلیل استفاده از این آنزیم بهترین روش برای تعیین ساختمان و اندازه گیری مقدار پلولان می باشد. (Zhenming *et al.* 2003).

مقدار پلی ساکارید تولید شده توسط *A. pullulans* به ماهیت منبع کربن و عوامل دیگری مانند نوع سویه‌ی استفاده شده، pH محیط کشت، دمای انکوباسیون و سطح اکسیژن محلول و همین طور غلظت و نوع منبع نیتروژن وابسته است (Shingel 2004). در مورد منبع کربن باید ذکر کرد که نوع منبع کربن بر مقدار پلولان تولیدی و مقدار تولید رنگ دانه های ملانینی و شبه ملانینی مؤثر است. در مورد سویه *A. pullulans* 51 بهترین منبع کربن سوکروز بود، به طوریکه تولید ملانین و رنگدانه های شبه ملانینی در این محیط درمقایسه با محیط گلوکزکمتر بوده و بعلاوه پلولان بیشتری تولید شد. جدا از نوع منبع کربن، غلظت یا درصد اولیه قند نیز روی جنبه های کینتیکی تخمیر در *A. pullulans* موثر است. به طوری که افزایش غلظت سوکروز از ۳٪ به ۵٪ موجب افزایش تولید می شود اما افزایش بیشتر از ۵٪ موجب افزایش نمی شود و بازده تولید در مقایسه با ۵٪ بسیار کاهش می یابد. این کاهش تولید پلی ساکارید پلولان با افزایش درصد قند محیط احتمالاً به دلیل اثرات اسمزی آن می باشد که به عبارتی متعاقب کاهش فعالیت آب، پلاسمولیز رخ می دهد. این عمل نهایتاً موجب کاهش سرعت تخمیر و سنتز پلی ساکارید می‌گردد (Lazaridou *et al.* 2002). طبق مطالعات انجام شده روی سوبستراهای مختلف و همین طور مطالعات مقالات مختلف می توان ابراز داشت که بسته به نوع سویه‌ی مخمری و نوع سوبسترای استفاده شده تولید و زمان تولید ماکزیمم متفاوت است. برای مثال از *A.pullulans* NRRLY-6220 در پساب نشاسته ده درصد هیدرولیز شده بعد از ۷ روز ۱۶ g/L پلولان تولید گردید در حالیکه از همان سویه‌ی در ملاس هیدرولیز شده ۲۱ g/L پلولان تولید می گردد (Barnett, *et al.* 1999). به علاوه از *A. pullulans* P56 در پساب آب جو (Brewery waste) بعد از ۷۲ ساعت ۶ g/L پلولان تولید گردید و از همان سویه در محیط ملاس هیدرولیز شده با اسید سولفوریک و زغال فعال بعد از ۶ روز هوادهی ۲۴ گرم بر لیتر پلولان تولید شد (Lazaridou, *et al*, 2002).

طبق نظر سیویر و کریستیانسن(Seviour , Kristiansen) و همین طور دیگر محققان تولید پلولان در ارتباط با تمام شدن منبع نیتروژن در محیط می باشد (Seviour, *et al*, 1984). اکثر مطالعات نشان دهنده این است که پلولان یک متابولیت ثانویه است و در جایی که منبع ازت (برای مثال NH4+) در غلظت کم تولید می‌گردد. گسترش و ستز پلولان در یک کشت مایع تحت اثر NH4+ یا منبع ازت می‌باشد. این مطلب کاملاً توسط کتلی (۱۹۷۱) ثابت گردیده است. تولید اگزوپلی ساکارید تنها زمانی شروع می‌گردد که منبع N محیط کشت کاهش یافته یا تمام گشته باشد. به طوریکه افزایش اولیه منبع ازت محیط بازده تولید را کاهش می‌دهد و اگر مقدار منبع کربن زیادی در دسترس باشد، بیومس بطور چشم‌گیری افزایش می‌یابد و جریان کربنی به سمت بیومس پیش می‌رود. این اثر با سه نوع منبع ازت بررسی شد، به طوریکه در تحقیقات مشابه تنها یک منبع را بررسی می‌کنند. سولفات آمونیوم به عنوان بهترین منبع ازتی مطرح است، اما استفاده‌ی عصاره مخمر نیز در کنار سولفات آمونیوم دیده می‌شود. در این بررسی برخلاف دیگر تحقیقات مشابه اثر بر هم‌کنشی این دو منبع ازت بررسی شد. طبق نتایج برهم‌کنش روی این دو منبع ازت وجو داشت به طوریکه حضور عصاره مخمر موجب کاهش تولید رنگدانه می‌شد. به همین دلیل حضور عصاره‌ی مخمر در صنایع و شرکت‌های تولید کننده‌ی پلولان که جداسازی این رنگدانه‌ها هزینه‌بر است ارزشمند می‌باشد (Catley 1980، Dominguez *et al.* 1978 و Punnapayak *et al.* 2003).

اثر اسیدیته در تغییر فرم های مورفولوژیکی *A. pullulans* بیشتر از کنترل افزایش تولید پلی‌مر توسط آن سلول ها می‌باشد. متغیرهایی مانند هوادهی، ترکیبات محیط و pH موجب القاء مورفولوژی سلولی می‌گردند. پس با این وجود، کنترل مورفولوژی کشتی کارایی کشت را در جهت تولید بالا ببرد. در طول ۲۴ ساعت اول، pH کاهش می‌یابد و سپس در پایان تخمیر یک افزایش جزئی دارد. عامل pH نقش بسیار مهمی در تولید این پلی‌مر توسط *A. pullulans* دارد و با اثر بر روی مورفولوژی سلولی در تولید پلی ساکارید اثرگذار می‌باشد. طبق

مطالعات انجام گرفته روی جنبه های کینیتیکی اثر pH در تولید، می‌توان بیان کرد که افزایش pH تا ۷/۵-۷ موجب افزایش غلظت پلی ساکارید می‌شود، اما با افزایش بیش از حد آن، کاهش تولید و بازده را خواهیم داشت. بیشترین بیومس میکروبی نیز در ۵- ۴ = pH تولید شد. بسیاری از محققان بر این باورند که میلسیوم هیچ پلولانی را تولید نمی‌کند (Roukas *et al.* 1995). اما بر خلاف آن‌ها کتلی (Catley) (۱۹۸۰) به این نتیجه رسید که میلسیوم ها نیز پلولان تولید می‌کنند. اما این تولید ۵- ۴ بار کمتر از تولید توسط تک سلولی‌ها می‌باشد. در این بررسی نیز به این نتیجه رسیده شد که مسیلیوم ها نیز قادر به تولید پلولان هستند، اما در شرایطی که مقدار مسیلیوم بیش از مقدار معمول گردد، تولید پلولان کاهش می‌یابد. این مطلب با مطالعان میکروسکوپی ثابت شد. پس می‌توان گفت که میسیلیوم‌ها در مقایسه با سلول‌های مخمری و دیگر تک سلولی‌ها پلولان کمتری تولید می‌کنند. در این برر سی ثابت شد که عمده سلول‌های مولد پلولان تک سلولی‌ها می‌باشند به خصوص سلول های کلامیدوسپوری که این نیز موافق نظریه دومینگز و همکارانش بود. در کل باید گفت که اگر هدف تولید بیومس (SCP) باشد بایستی از pH های پایین استفاده کرد (Dominguez *et al.* 1978 و Ducrey *et al.* 1992).

"Rho" و همکارانش به این یافته رسیدند که غلظت پلولان تولیدی در یک محیط سنتزی با دسترسی اکسیژن افزایش می یابد. اما نکته ای که نباید فراموش گردد، این است که افزایش بیش از حد هوادهی که خود بسته به نوع سویه مخمری و نوع محیط کشت متفاوت است، موجب تولید بیش از حد مسیلیوم ها می گردد که خود موجب افزایش بیومس و کاهش تولید پلیمر پلولان می گردد. پس هر گونه افزایش بیومس موجب افزایش تولید پلیمر نمی گردد و بیشتر از آن که مقدار بیومس مهم باشد نوع سلول های موجود در بیومس ارزشمند است. (Israilides *et al.* 1998 و Israilides *et al.* 1994).

دما از دیگر فاکتورهای مؤثر در تولید پلولان می باشد. اکثر مطالعات دمای ۲۸ ºC را بهترین دمای پیش تولید و تولید ذکر کرده اند. در این بررسی نیز به این نتیجه رسیده شد که افزایش دما موجب افزایش بیوسنتز پلولان می گردد. افزایش تولید تا افزایش دما در مرز ۲۸ ºC دیده شد و اضافه شدن دما بیش از آن موجب کاهش تولید پلولان گردید (Ronen *et al.* 2002، Pollock *et al.* 1992 و Punnapayak *et al.* 2003).

منابع:

Barnett C., Smith A., Scanlon B., Israilides C.J. 1999: Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed potato starch waste. *Carbohydrate Polymers*. **38**: 202-209.

Catley B.J. 1980: The extracellular polysaccharide pullulan produced by *Aureobasidium pullulans* : a relationship between elaboration rate and morphology. *Journal of General Microbiology*. **120**: 265-268.

Deshpande M.S., Rale V.B., Lynch J.M. 1992: *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology:a status report. *Enzyme Microbial Technology*. **14**: 514-527.

Dominguez J.B., Goni F.M. Uruburu F. 1978: The transition from yeast-like to chelamydospore cells in *pullularia pullulans*. *Journal of General Microbiology*. **108**: 11-117.

Ducrey S.K. M., Sineriz F., Castro G.R. 1992: Aspectrophotometric method the quantitative measurement of pullulan. *Journal of Microbiological Methods*.**16**: 253-258.

Hosseinkhani H., Aoyama T., Ogwa O., Tabata Y. 2002: Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation based on metal coordination. *Journal of Controlled Release*. **83**: 287-302.

Israilides C.J., Smith A., Harthill J. E., Barnett C., Bambalov B., Scanlon B. 1998: Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro industrial waste. *Applied Microbial Biotechnology*. **49**: 613-617.

Israilides C., Scanlon B., Smith A., Harding S.E., Jumel K. 1994: Charachterization of pullulans produced from industrial wastes. *Carbohydrate Polymers*. **25**: 203-209.

Kurtzman C.P., Fell J.W. 1998: The Yeast, a Taxonomic Study. Fourth Edition. Elsevier Publication. 1-100 and 891-946.

Lazaridou A., Roukas T., Biliaderis C.G., Vikousi H. 2002: Charachterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stricked tank reactor under varying agitation. *Enzyme and Microbial Technology*. **3**: 122-132.

Leathers,T.D. 2003: Biotechnological production and applications of pullulans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **62**: 468-473.

Lee J.W., Yeomans W.G., Allen A.L., Deng F., Gross R.A. 1999: Biosynthesis of nivel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 5265-5271.

Pollock T.J., Thorne L., Armentrout R.W. 1992: Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high molecular- wight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and Environmental Microbiology*.**58**: 877-883.

Punnapayak H.,Sudhadham M., Prasongsuk S.2003: Characterization of *Aureobasidium pullulans* from airbone spores in Thailand. *Journal Industrial biotechnology*. **30**: 89-94.

Ronen M., Guterman H., Shabtai Y. 2002: Monitoring and control of Pullulan Production using vision sensor, *Journal of biochemical and Biophysical Methods*, **51**: 243-249.

Roukas T. 1999: Pullulan production from deproteinized whey by Aureobasidium pullulans. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **22**: 617-621.

Roukas T. 1999: Pullulan production from brewery wastes by Aureobasidium pullulans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **15**: 447-450

Roukas T. 1998: Pretreatment of beet molasses to increase Pullulan production. Process. Biochem. **33**: 805-810. .

Roukas T., Biliaderis C.G. 1995: Evolution of carob pod at a substrate for pullulan production by Aureobasidium pullulans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **55**: 27-44.

Seviour R.J., Kristiansen B., Harvey L. 1984: Morphology of *Aureobasidium pullulans* during polysacchide elaboration. *Transactions of the British Mycological Soociety*. **82**: 350-356.

Shingel K.I. 2004: Current knowledge on biosynthrsis, biological activity, and chemical modification on the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*. **339**: 447-460.

Simon L., Caye-Vaugien C., Bouchonneau M. 1993: Relation between pullulan production, morphological state and growth condition in *Aureobasidium pullulans*: new observations. *Journal of General Microbiology*. **139**: 979-985.(66)

Sugiooshita Y., Tabata Y., Matsumura T., Toda Y., Nebeshima M., Moriasu F., Ikada Y., Chiba T. 2002: Liver targeting of human interferon with pullulan based on metal coordination. *Journal of Control Release*. **83**: 75-88.

Sutherland I.W. 1998: Novel and established application of microbial polysaccharides. *Tibtech January*. **16**:41-46.

Vandamme E.J., De Bates S., Steinbochel A. 2003: *Biopolymers*. Volume 5.

Zhenming C., Shuangzhi Z. 2003: Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*. **33**: 206-211.