

تولید بیو پلیمر پلوان توسط شبه مخمر *Aureobasidium pullulans* و بهینه سازی آن

غلامرضا قزلباش^{۱*}، ایرج نحوی^۲، منوچهر توسلی^۲ و گیتی امتیازی^۲

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

^۲گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

* مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: rghezl bash@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 می گردد. در این تحقیق ابتدا سویه های مختلفی از *A. pullulans* از طبیعت جدا شد و بهترین سویه (سویه ۵۱) برای بهینه سازی تولید پلوان انتخاب شد. مقدار پلوان اندازه گیری و با آنزیم پلواناز (E.C.3.2.1.41) درجه خلوص آن نیز تعیین گردید. در بهینه سازی 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 بهینه سازی شدند. سپس هوادهی با دوره های ۱۸۰، ۲۰۰ و ۲۲۰ دور در دقیقه (rpm)، pH = ۴-۹ و دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ نیز برای بدست آوردن به ترتیب بهترین دور هوادهی، pH و دما مورد مطالعه قرار گرفتند که به ترتیب ۱۸۰ rpm، ۷/۵ و ۲۸ °C بهترین های این عوامل بودند. از این سویه در این شرایط بهینه بعد از ۵ روز ۴۸ g/l پلوان تولید شد.

واژه های کلیدی: *Aureobasidium pullulans*، پلوان، پلواناز (E.C.3.2.1.41).

مقدمه

پتانسیل های کاربردی فراوان غذایی، دارویی و صنعتی می باشد. پلوان بیوپلیمری است محلول در آب که جرم مولکولی آن بین $10^6 \times 3-13$ متغیر می باشد (Deshpande et al. 1992). وزن مولکولی پلوان به نوع سویه ی میکروارگانیسم، pH، تکنیک های کشت و سوبسترای استفاده شده بستگی دارد (Shingel 2004). پلوان توسط بعضی از سویه های *A. pullulans* به صورت یک پلی ساکارید خارج سلولی محلول در آب تولید می گردد. الگوی اتصال ویژه ای که در این بیو پلیمر وجود دارد، خصوصیات فیزیکی منحصر به فردی به آن می دهد. پلوان دارای خواص چسبندگی بوده و می تواند برای ساختن فیبرها و فیلم های مقاوم به اکسیژن و قوی به کار روند. این پلیمر و مشتقات آن دارای پتانسیل های کاربردی فراوان غذایی، دارویی و صنعتی زیادی می باشند. پلوان به دلیل مقاومتش به آمیلازهای پستانداران، انرژی زا نبوده و به همین دلیل به عنوان ماده یی در فرمولاسیون مواد غذایی کم کالری استفاده می گردد (Leathers 2003). مطالعات نشان می دهد که پلوان به صورت رژیم غذایی به صورت پری بیوتیک عمل می کند و به همین دلیل موجب رشد بیفیدوباکترهای (*Bifidobacteria*) مفید دستگاه گوارش می گردد (Kurtzmn & Fell 1998). مشتقات پلوان به صورت کونجوگاسیون های غیر سمی برای واکسن ها و اینترفرون ها استفاده

A. pullulans یک ساپروفیت رایج در فیلوسفر اکثر گیاهان غلات و طیف گسترده ای از میوه ها می باشد. بوئر (Bauer) اولین مطالعات را در تولید پلی ساکارید 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 پلوان نامگذاری کردند. *A. pullulans* معمولاً از نمونه های محیطی جدا می گردد. آئروبازی دیوم ها در خاک و آب، به خصوص روی برگ های تجزیه شده، چوب و دیگر مواد گیاهی یافت می گردند. این میکروارگانیسم ها پلی مورفیسیم می باشد و دارای فرم های شبیه مخمری، بلاستوسپور جوان، بلاستوسپور متورم، میسلیم و فرم های کلامیدوسپوری می باشند. این تغییرات مورفولوژی به شرایط کشت بستگی دارد. در واقع مورفولوژی سلولی این شبه مخمر فوق العاده تحت تاثیر فعالیتهای متابولیکی کشت می باشد که این خود روی سرعت رشد و سرعت تولید و بازدهی اثرگذار است (Deshpande et al. 1992). (Leathers 2003).

پلوان هوموپلی ساکاریدهایی خطی از گلوکز بوده و اغلب به صورت پلی مری از واحدهای مالتوتریوز که توسط پیوند های (۱-۶) α به هم متصل شده اند، تعریف می گردند. این پلیمر و مشتقات آن دارای

شد تا آنزیم های خارج سلولی غیر فعال گردند. بعد از آن با اضافه کردن یک درصد (گرم درصد) زغال فعال و شیک در rpm ۲۰۰ برای ۱۵ دقیقه پیگمان ملانین جدا شد. با اضافه کردن دو حجم اتانل سرد و قراردادن نمونه های حاوی اتانل در یخچال (۴ °C) به مدت ۱۲ ساعت پلی ساکاریدهای تولید شده، رسوب کردند. رسوب های تولید شده را با آب و الکل دو بار شستشو داده و بعد از خشک سازی پلی ساکاریدها، وجود یا عدم وجود پلوان در آنها بررسی گردید (Lazaridou et al. 2002, Ducrey et al. 1992, Roukas 1999).

روش های اثبات پلوان

در این بررسی از روش شناسایی با آنزیم پلواناز (E.C.3.2.1.41) (سیگما - آلداریچ) استفاده شد. این روش بهترین راه شناسایی پلوان می باشد. درجه خلوص پلی ساکارید تولیدی نیز توسط همین آنزیم و مقایسه آن با اثر همین آنزیم بر مقدار مشخص پلوان خالص استاندارد (سروا - آمریکا) تعیین شد. از آنجائیکه درجه خلوص پلوان حاصله بالا بود (۹۵-۱۰۰ 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 نمونه دیگری که علاوه بر موارد فوق آنزیم پلواناز (E.C.3.2.1.41) (۱۰۰ میکرولیتر) نیز به آن اضافه شده بود به عنوان نمونه مجهول که پلی ساکارید آن می بایست تعیین می شد، استفاده گردید. سپس هر دو نمونه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ °C انکوبه گردید و به هر کدام از نمونه ها یک میلی لیتر دی نیترو سالیسیلات (DNS) اضافه شد و در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری جوشانده شد. سپس نمونه ها در آب یخ سرد گردیدند و نمونه ها با بالن حجمی به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد و جذب آن ها در ۵۴۶ نانومتر مطالعه شد. در نهایت مقدار پلوان تولیدی با مقایسه جذب حاصله محلول فوق و رجوع به منحنی استاندارد تهیه شده از پلوان خالص، تعیین گردید (Ducrey et al. 1992 و Israilides et al. 1998).

بهینه سازی تولید پلوان:

در این بررسی فاکتورها تک تک و بر اساس ارجحیت آنها در تولید بهینه شدند. روش کار به این صورت بود که ابتدا 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 درصد های مختلف سولفات آمونیوم نیز بررسی گردید. بعد از این ها pH در هفت سطح و هوادهی در سه سطح بررسی گردید.

می گردد. به علاوه می توان از آن در انتقال هدفمند لیپوزوم ها نیز استفاده کرد (Lee et al. 1999 و Deshpande et al. 1992). همین طور در هدف یابی DNA واکسن های کونجوگه شده با پلوان به بافت کبد، نیز نقش ارزشمندی دارند (Hosseinkhani et al. 2002). کاربردهای ارزشمند این پلیمر در صنعت، تولید و بهینه سازی تولید این پلیمر را شاخص می کند. در این بررسی آئروبازیومیوم ها از فیلوسفر گیاهان بومی جدا شدند و تقریباً "برخلاف تحقیقات مشابه اکثر فاکتورهای موثر بر تولید این پلیمر نیز بهینه شدند.

مواد و روش ها

جداسازی *Aureobasidium pullulans*:

برگ ها و قسمت های مختلف گیاه اعم از میوه و دانه را برای مدت ۳ روز در دمای ۲۵ °C خیسانده و سپس (۱/۰ 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 نمونه ها را به مدت ۲۰ دقیقه ساکن قرار داده تا میسیلیوم ها رسوب کنند. سپس ۰/۱ میلی لیتر از سطح محیط مایع قبلی که حاوی فرم های مخمیری 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، کلنی های تک را به محیط تولید انتقال داده تا تولید یا عدم تولید پلی ساکارید مورد بررسی قرار گیرد.

شناسایی *Aureobasidium pullulans*:

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

تولید بیوبلی مر پلوان:

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 میلی لیتر محیط پیش تولید (pH = ۵/۵) (سوکروز ۳٪، سولفات آمونیوم ۰/۱۶g/l، عصاره مخمر ۰/۴g/l، فسفات پتاسیم ۵g/l، سولفات منیزیم آب دار ۰/۲g/l کلرید سدیم ۱g/l) اضافه شد. ارلن ها در دمای ۲۸ °C برای ۴۸ ساعت روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ شیک گردید. بعد از محیط فوق به نسبت ۵ درصد به ارلن های حاوی محیط تولید (pH = ۷/۰) (سوکروز ۵٪، سولفات آمونیوم ۰/۱۶g/l، عصاره مخمر ۰/۴g/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 rpm ۱۸۰ شیک گردیدند. سپس محیط های فوق در دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جدا شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه حرارت داده

نتایج

در این بررسی سه سویه از *A. pullulans* از طبیعت جدا شد. برای شناسایی آنها به علاوه فرم مورفولوژی و ظاهر کلنی‌ها و مطالعه میکروسکوپی از بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نیز استفاده شد (جدول ۱). 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 ملاتین تولید می‌کرد. سویه ۵۳ بر خلاف دو سویه قبلی که نهایتاً 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 ۱). تست‌های تخمیری و تست‌های جذبی از تست‌های تائیدی شناسایی مخمرها و شبه مخمرها می‌باشد که در جدول ۱ آورده شده است.

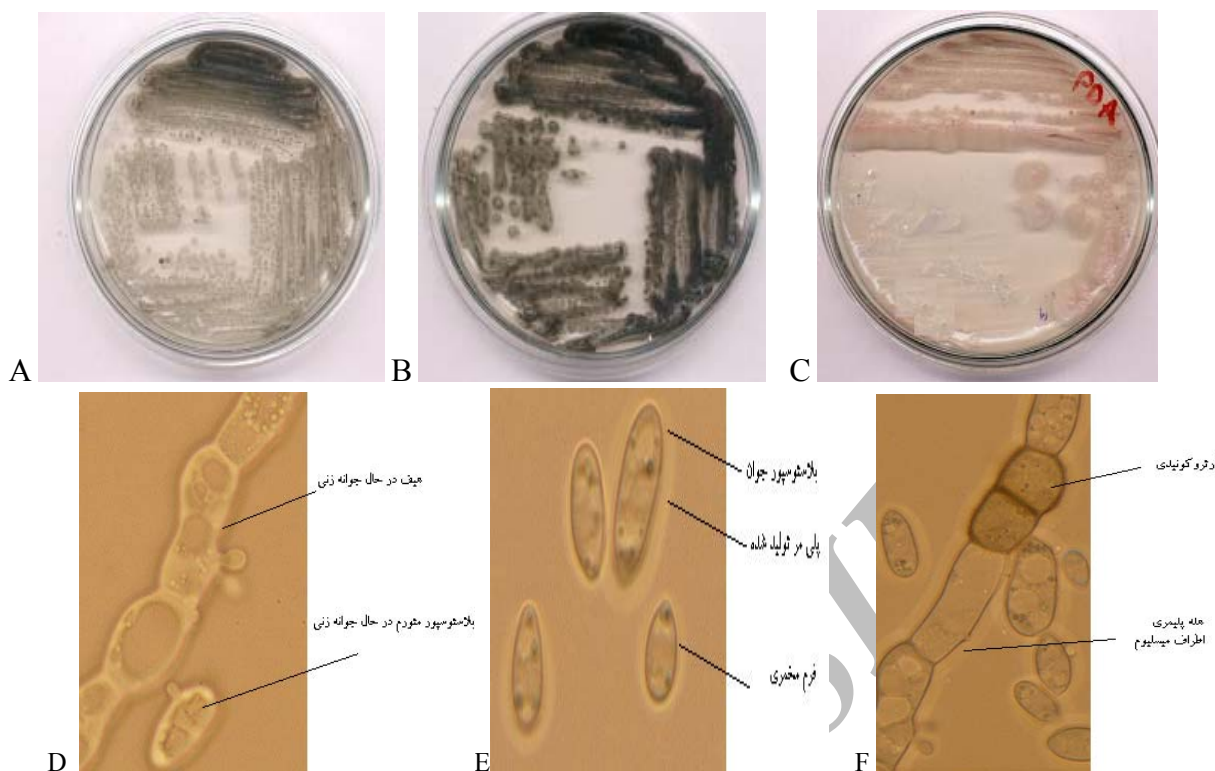
در مورد اثر منبع کربن دو قند گلوکز و سوکروز بررسی شدند. منحنی تولید بیوپلی‌مر پلولان در هر سه سویه ۵۱، ۵۲ و ۵۳ مطالعه شد تا مقدار تولید و زمان بیشترین تولید محاسبه گردد (شکل ۲، ۳ و ۴). مقدار تولید در سه سویه جدا شده با دو منبع کربن گلوکز و سوکروز (هر دو ۵ درصد) مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۶).

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. سویه‌های 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، سویه‌های ۵۲ و ۵۳ در گلوکز و سوکروز به ترتیب ۸/۸۵۲، ۱۵/۰۸۲ و ۷/۳۷۷، ۱۸/۰۳۳ گرم بر لیتر پلولان تولید می‌کردند. از آن جایی که بهترین سویه، سویه ۵۱ بود، بازده تولید سویه ۵۱ در درصد‌های مختلف قندی محاسبه شد تا بهترین درصد قندی نیز به دست آید. همان طوریکه دیده می‌شود. بیشترین بازده در محیط با قند ۵ درصد بدست آمد. (شکل ۶). پس سویه ۵۱، بهترین سویه برای تولید پلولان و سوکروز 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).

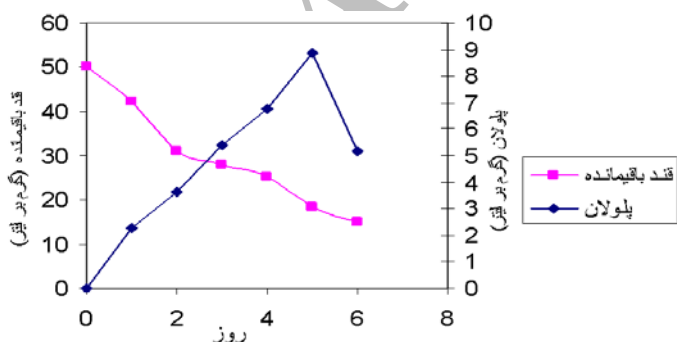
جدول ۱- تست های بیوشیمیایی سویه های جدا شده مولد پلولان (+: انجام واکنش، -: عدم انجام واکنش)

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

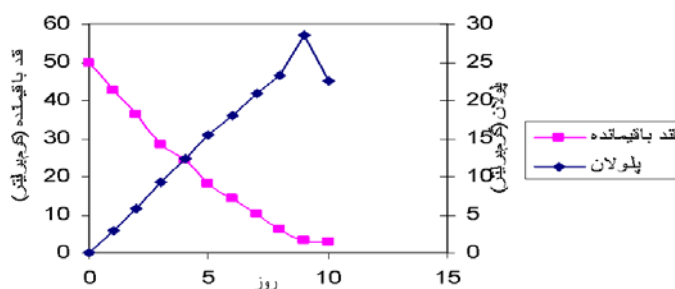


شکل ۱- نمای میکروسکوپی و ماکروسکوپی شبه مخمر *A. pullulans*

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 کاملاً 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 پلوان 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.

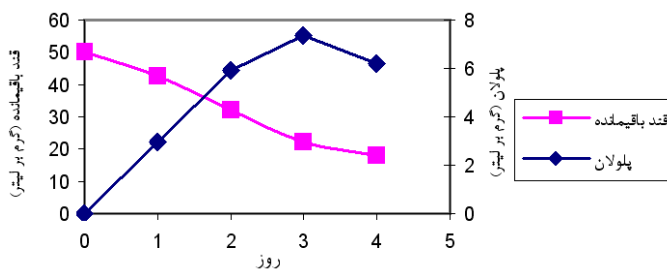


شکل ۳- منحنی تولید پلوان *A. pullulans* 52 در محیط با منبع کربن گلوکز (۵٪). با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز پنجم مقدار بیو پلمر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می رسد.

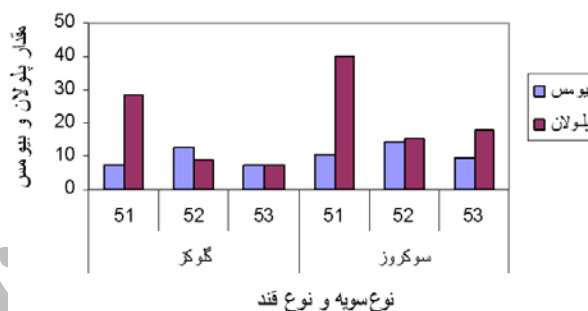


شکل ۲- منحنی تولید پلوان *A. pullulans* 51 در محیط با منبع کربن گلوکز (۵٪). با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز نهم مقدار بیو پلمر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می رسد.

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.

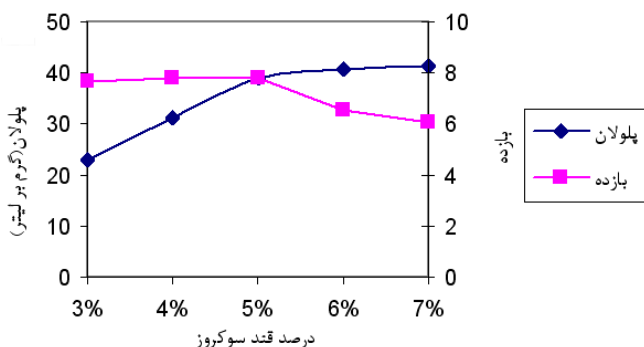


شکل ۴- منحنی تولید پلوان *A. pullulans* 53 در محیط با منبع کربن گلوکز (۵٪). با کاهش گلوکز تولید بیوپلیمر افزایش می یابد بطوریکه در روز سوم مقدار بیو پلیمر به بیشترین حد خود و مقدار گلوکز به پایین ترین حد خود می رسد.



شکل ۵- مقادیر تولید پلوان 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 دو تای دیگر تولید بیشتری دارد.

بهترین مقدار عصاره مخمر، نیترات سدیم و سولفات آمونیوم به ترتیب ۳، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر بود که به ترتیب ۳۴/۰۹۸، ۱۲/۹۵۱ و ۴۷/۵۴۱ گرم بر لیتر پلوان تولید شد. چون اکثر مقالات سولفات آمونیوم و عصاره مخمر را به عنوان منبع ازت ترکیبی استفاده می



شکل ۶- منحنی اثر درصدهای مختلف قند سوکروز بر تولید پلوان در *A. pullulans* 51. بازده تولید بر اساس مقدار گرم پلوان تولید شده بر مقدار قند مصرف شده (Yp/s) مشخص شده است.

در مطالعه pH، هفت سطح مختلف انتخاب شد بطوریکه $pH = 7/5$ مناسب ترین pH برای تولید پلوان در توسط سویه ۵۱ به دست آمد (شکل ۷). در بهینه سازی سرعت هوا دهی نیز بیشترین تولید در ۱۸۰ rpm بدست آمد (شکل ۸). به علاوه بهترین دما برای تولید پلوان نیز دمای $28^{\circ}C$ بود (شکل ۹).

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

منبع ازت											
نیترات سدیم (گرم بر لیتر)				عصاره مخمر (گرم بر لیتر)				سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)			
غلظت اولیه	پلوان	بیومس	قند باقیمانده	غلظت اولیه	پلوان	بیومس	قند باقیمانده	غلظت اولیه	پلوان	بیومس	قند باقیمانده
۰	۰	۲/۲۷	۱۴/۸۱	۰/۱	۰	۱/۲۶	۱۶/۲۳	۰/۱	۰	۲/۲۷	۱۴/۸۱
۰/۱	۳/۲۳۴	۴/۳۸	۱۰/۶۴	۰/۷	۱۱/۲۴	۳/۳۶	۱۴/۷۴	۰/۷	۳/۲۳۴	۴/۳۸	۱۰/۶۴
۰/۳	۱۲/۴۱۱	۵/۱۱	۷/۵۹	۱/۵	۱۴/۷۱	۵/۲	۹/۱۱	۱/۵	۱۲/۴۱۱	۵/۱۱	۷/۵۹
۰/۶	۱۹/۵۸۷	۵/۲۸	۵/۳۸۴	۲	۱۹/۱۲	۷/۵۸	۶/۳۹	۲	۱۹/۵۸۷	۵/۲۸	۵/۳۸۴
۱/۰	۱۷/۴۸۱	۷/۵۹	۲/۲۵	۳	۲۲/۸۴	۷/۷۸	۰/۶۷	۳	۱۷/۴۸۱	۷/۵۹	۲/۲۵
۱/۲	۱۴/۱۲۰	۹/۴۴	۲/۰۰	۴	۱۸/۶۴	۸/۸۶	۰/۴۶	۴	۱۴/۱۲۰	۹/۴۴	۲/۰۰

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

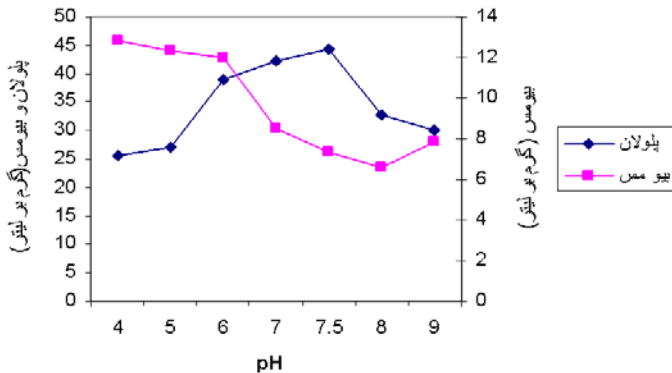
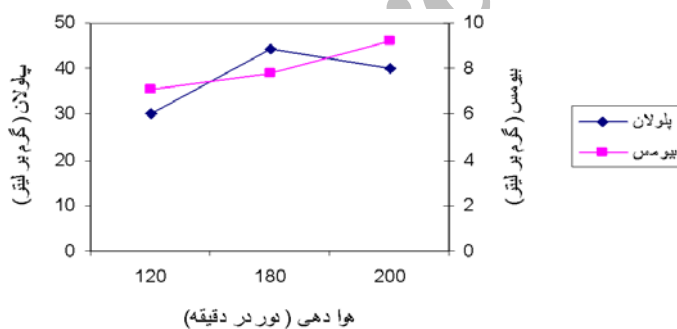
منبع ازت								
نیترات سدیم (گرم بر لیتر)			عصاره مخمر (گرم بر لیتر)			سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)		
بیومس	پلوان	غلظت اولیه	بیومس	پلوان	غلظت اولیه	بیومس	پلوان	غلظت اولیه
۱/۵۶	۰	۱/۰۲	۳/۵۹	۰	۰/۱	۴/۴۷	۰	۰
۱/۸۵	۰	۰/۰۶	۵/۳۵	۱۸/۱۹۷	۰/۷	۶/۵	۷/۱۸۶۹	۰/۱
۲/۰۱	۶/۳۹۳	۰/۱	۷/۰۵	۲۶/۵۵۷	۱/۵	۷/۱۹	۱۹/۵۰۸	۰/۳
۲/۳۸	۱۲/۹۵۱	۰/۳	۱۰/۴۴	۳۱/۶۳۹	۲	۷/۷۴	۴۷/۵۴۱	۰/۶
۲/۸۹	۱۰	۰/۴	۱۰/۹۶	۳۴/۰۹۸	۳	۱۱/۴۵	۳۸/۵۲۴	۱/۰
۲/۹۵	۸/۳۶۱	۰/۵	۱۳/۰۶	۳۱/۳۱۱	۴	۱۵/۸	۳۱/۴۷۵	۱/۲

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 پلوان می‌باشند (Roukas 1998). در این بررسی نیز هر سه سویه *A. pullulans* قادر به تولید پلوان بودند. در شناسایی این شبه مخمرها وجود کلامیدوسپورها یا اسپوره‌های با دیواره‌ی ضخیم یک کلید شناسایی مهم می‌باشند. به علاوه خصوصیات مورفولوژیکی تست‌های بیوشیمیایی تخمیر و جذب هیدرات کربن نیز مؤید *A. pullulans* بودن این مخمرها بودند.

جدول ۴- نتایج طرح تصادفی مقادیر مختلف دو منبع ازت بر تولید پلوان در *A. pullulans 51* با سوکروز (۵٪).

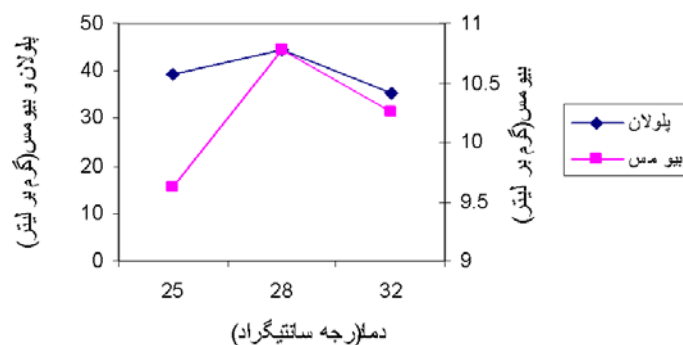
مقدار و نوع منبع ازت	عصاره مخمر (گرم بر لیتر)			
	۰/۱	۰/۶	۱/۰	
سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	۰/۲	۷/۲۱	۲۵/۰۸	۲۶/۸۸
	۰/۴	۸/۵۲	۲۱/۸۵	۲۲/۰۳
-	۰/۴	۲۰/۱۶	۳۰/۴۸	۲۶/۰۶
	۰/۶	۱۶/۵۵	۳۶/۷۸	۲۱/۳۱
-	۰/۶	۲۴/۱۲	۴۲/۳۸	۲۴/۲۳
	۰/۶	۲۶/۱۵	۴۴/۵۶	۲۲/۴۸
-	۰/۶	۳۲/۱۳	۳۶/۳۲	۲۱/۹۶
	۰/۶	۳۸/۳۱	۳۸/۵۸	۱۶/۹۲

شکل ۷- اثر pH بر روی میزان تولید پلوان توسط *A. pullulans 51* در سوکروز (۵٪). با افزایش pH تولید کاهش می‌یابد اما همانطور که مشخص است pH های پایین برای تولید بیومس مناسب هستند.شکل ۸- اثر هوادهی های مختلف بر روی میزان تولید پلوان توسط *A. pullulans 51* در سوکروز (۵٪). افزایش هوادهی نیز موجب افزایش بیومس می‌شود اما این افزایش هوادهی تا یک حد خاصی موجب افزایش بیوپلیمر می‌گردد و هوادهی بیش از حد تنها موجب افزایش بیومس می‌گردد بدون آنکه تولید پلوان افزایش یابد.

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 پلوان تولید گردید در حالیکه از همان سویه‌ی در ملاس هیدرولیز شده ۲۱ g/L پلوان تولید می‌گردد (Barnett, et al. 1999). به علاوه از *A. pullulans* P56 در پساب آب جو (Brewery waste) بعد از ۷۲ ساعت ۶ g/L پلوان 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 پلوان تولید شد (Lazaridou, et al, 2002).

طبق نظر سیویر و کریستیانسن (Seviour, Kristiansen) و همین طور دیگر محققان تولید پلوان در ارتباط با تمام شدن منبع نیتروژن در محیط می باشد (Seviour, et al, 1984). اکثر مطالعات نشان دهنده این است که پلوان یک متابولیت ثانویه است و در جایی که منبع ازت (برای مثال NH_4^+) در غلظت کم تولید می‌گردد. گسترش و ستر پلوان در یک کشت مایع تحت اثر NH_4^+ یا منبع ازت می‌باشد. این مطلب کاملاً توسط کتلی (۱۹۷۱) ثابت گردیده است. تولید آگزوپلی 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 هم کنشی این دو منبع ازت بررسی شد. طبق نتایج برهم کنش روی این دو منبع ازت وجود داشت به طوریکه حضور عصاره مخمر موجب کاهش تولید رنگدانه می‌شد. به همین دلیل حضور عصاره‌ی مخمر در صنایع و شرکت‌های تولید کننده‌ی پلوان که جداسازی این رنگدانه‌ها هزینه‌بر است ارزشمند می‌باشد (Catley 1980, Dominguez et al. 1978 و Punnapayak et al. 2003).

اثر اسیدیته در تغییر فرم‌های مورفولوژیکی *A. pullulans* بیشتر از کنترل افزایش تولید پلی‌مر توسط آن سلول‌ها 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 پلی‌ساکارید اثرگذار می‌باشد. طبق



نمودار (۹): اثر دماهای مختلف بر روی میزان تولید پلوان 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 می‌گردد که البته هر نوع افزایش بیومسی موجب افزایش تولید پلوان نمی‌گردد.

این پلیمر برخلاف نشاسته هیچ واکنشی با پد (I2) نشان نمی‌دهد. مطالعات با آنزیم پلواناز (EC 3.2.1.41) که بطور اختصاصی پیوندهای (1 → 6) را در پلوان برش می‌دهد و به همین دلیل استفاده از این آنزیم بهترین روش برای تعیین ساختمان و اندازه گیری مقدار پلوان می‌باشد. (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 پلوان تولیدی و مقدار تولید رنگ دانه‌های ملانینی و شبه ملانینی مؤثر است. در مورد سویه *A. pullulans* 51 بهترین منبع کربن سوکروز بود، به طوریکه تولید ملانین و رنگدانه‌های شبه ملانینی در این محیط درمقایسه با محیط گلوکز کمتر بوده و بعلاوه پلوان بیشتری تولید شد. جدا از نوع منبع کربن، غلظت یا درصد اولیه قند نیز روی جنبه‌های کینتیکی تخمیر در *A. pullulans* مؤثر است. به طوری که افزایش غلظت سوکروز از ۳٪ به ۵٪ موجب افزایش تولید می‌شود اما افزایش بیشتر از ۵٪ موجب افزایش نمی‌شود و بازده تولید در مقایسه با ۵٪ بسیار کاهش می‌یابد. این کاهش تولید پلی ساکارید پلوان با افزایش درصد قند محیط احتمالاً به دلیل اثرات اسمزی آن می‌باشد که به عبارتی متعاقب کاهش فعالیت آب، پلاسمولیز رخ می‌دهد. 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 می‌توان ابراز داشت که بسته به نوع سویه‌ی مخمیری و نوع سوبسترای استفاده شده تولید و زمان

"Rho" و همکاری آن 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 28°C 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 28°C در مرز 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.

مطالعات انجام گرفته روی جنبه های کینیتیکی اثر pH در تولید، می توان بیان کرد که افزایش pH تا $7-7/5$ موجب افزایش غلظت پلی ساکارید می شود، اما با افزایش بیش از حد آن، کاهش تولید و بازده را خواهیم داشت. بیشترین بیومس میکروبی نیز در $\text{pH} = 4-5$ تولید شد. بسیاری از محققان بر این باورند که میلسیوم هیچ پلولانی را تولید نمی کند (Roukas *et al.* 1995). اما بر خلاف آن ها کتلی (Catley) (۱۹۸۰) به این نتیجه رسید که میلسیوم ها نیز پلولان تولید می کنند. اما این تولید $4-5$ بار کمتر از تولید توسط تک سلولی ها می باشد. 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 می یابد. این مطلب با مطالعات میکروسکوپی ثابت شد. پس می توان گفت که میلسیلیوم ها در مقایسه با سلول های مخمری و دیگر تک سلولی ها پلولان کمتری تولید می کنند. در این بررسی ثابت شد که عمده سلول های مولد پلولان تک سلولی ها می باشند 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 (Ducrey *et al.* 1992 و Dominguez *et al.* 1978).

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 chlamydo-spore 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: Characterization 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: Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred 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 novel 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- weight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 877-883.
- Punnapayak H., Sudhadham M., Prasongsuk S. 2003: Characterization of *Aureobasidium pullulans* from airborne 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 Society*. **82**: 350-356.
- Shingel K.I. 2004: Current knowledge on biosynthesis, 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.

Archive of SID