بکارگیری *کلبسیلا پنومونیه* در تشخیص و تعیین بیوپلی مر پلولان و بهینه سازی فاکتورهای موثر بر فعالیت آن

غلامرضا قزلباش*[۱]، ایرج نحوی [۲]، منوچهر توسلی [۳] و گیتی امتیازی [۲]

[۱]دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی-

[۲]دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

[۳]دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۷/۱۵

چکیده

کلبسیلا پنومونیه و *باسیلوس اسیدوپلولیتیکوس* و چند باکتری دیگر قادرند آنزیم پلولاناز را تولید کنند. آنزیم پلولاناز آنزیمی است که بطور اختصاصی بر روی بیوپلی مر پلولان اثر می کند، لذا این روش قابل اعتمادترین روش در شناسایی این پلیمر است. در این تحقیق از عمل آنزیم پلولاناز باکتری *کلبسیلاپنومونیه* در تشخیص و اندازه گیری کمی مقدار پلولان استفاده گردید. در این بررسی ابتدا *کلبسیلا پنومونیه* در محیط نوترینت آگار فعال و در محیط حاوی پلولان (سوبسترای اختصاصی آنزیم) بصورت کشت مقدماتی بمدت ٢٤ ساعت کشت داده شد. سپس ۲ میلی لیتر از کشت مقدماتی فوق را به ۱۸ میلی لیتر از همان محیط کشت اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه انکوباتور قرار گرفت. فعا لیت آنزیمی این سویه با فاصله زمانی پنج ساعت اندازه گیری شد، و بیشترین فعالیت آنزیمی بعد از ۱۰ ساعت دیده شد. فعالیت آنزیمی پلولاناز تولید شده برحسب مقدار گرم بر لیتر مالتوتریوز آزاد شده است، که بعد از ده ساعت ۳۲/٤۳ گرم قند بر لیتر می باشد. فعالیت آنزیمی این سویه بر روی پلولان خالص در pH و دمای مختلف مطالعه گردید، pH ، ۵ و دمای ٤۰ درجه سانتی گراد شرایط بهینه برای فعالیت این آنزیم است.

واژه های کلیدی: پلولان ، پلولاناز و *کلبسیلا پنومونیه* PTCC 1053

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۱۱-۷۹۳۲٤۵۵، پست الکترونی: rghezelbash@scu.ac.ir

مقدمه

پلولان یک پلی ساکارید میکروبی خارج سلولی محلول درآب است که توسط سویه های *آئروبازیدیوم پلولانس* تولید می گردد. این بیو پلیمر در واقع α -D- گلوکانی خطی از اتصالات واحدهای مالتوتریوز با اتصال (٦-۱)- α می باشد که در صنایع غذایی و بسته بندی بدلیل دارا بودن خصوصیت تشکیل فیلم، کاربرد دارد. این الگوی اتصالی ویژه، خصوصیات فیزیکی منحصر بفردی به این بیوپلیمر می‌دهد. پلولان بیوپلیمری است محلول در آب که جرم مولکولی آن بین $۱/۳-۳\times۱۰^{٦}$ می باشد(۲و٤). پلولان دارای خواص چسبندگی می باشد و می‌تواند برای ساختن فیبر و فیلمهای مقاوم به اکسیژن و قوی نیز بکار رود، بعلاوه پلولان و مشتقات آن دارای پتانسیلهای کاربردی فراوان غذایی، دارویی و صنعتی نیز می باشند. پلولان بدلیل مقاومت به آمیلازهای پستانداران، انرژیزا نبوده و بهمین دلیل بعنوان ماده اصلی در فرمولاسیون مواد غذایی کم کالری بکار می رود. مطالعات نشان می‌دهد که

Archive of SID
www.SID.ir

پلولان بعنوان رژیم غذایی، بصورت پری‌بیوتیک (Prebiotic) عمل می کند، یعنی موجب رشد بیفیدوباکترهای مفید(*Bifidobacteria*) دستگاه گوارش می گردد(۳). مشتقات پلولان بصورت کونجوگاسیونهای (هم یوغیهای) غیر سمی برای اتصال واکسنها و اینترفرونها استفاده می شوند، که علاوه بر تسهیل در تحویل لیپوزومها و هدف‌یابی DNA ، واکسنهای کونجوگه با پلولان به بافت کبد می گردند(۹).

برای شناسایی این بیوپلیمر بهترین روش بکار گیری آنزیم خالص پلولاناز است. این آنزیم با شکستن اختصاصی پیوند های(٦-۱)α این بیو پلیمر، آن را به واحدهای سازنده تبدیل می کند. از میکروارگانیسمهای مولد می توان *کلبسیلا پنومونی* (*Klebsiella Pneumoniae*) و *باسیلوس استیدو پلولیتیکوس* (*Bacillus stearothermophilus*)و چند باکتری دیگر نام برد. این آنزیم بطور کلی به دو تیپ۱ و ۲ تقسیم می گردد. تیپ ۱ آن تنها پیوند(٦-۱)α در پلولان، دیگر پلیمرهای شاخه دار را می شکند، اما تیپ ۲، پیوند (٤-۱)α را نیز در این پلیمرها می شکنند(۵).

در روش شناسایی آنزیمی این پلیمر هم می توان از آنزیم خالص استفاده کرد و هم باکتریهای مولد این آنزیم را بکار برد(۳و۸). شناسایی با آنزیم خالص معمول ترین روش است اما بدلیل هزینه بالای آن استفاده سوپرناتانت باکتریایی روش مقرون بصرفه تر و قابل دسترس تری است. در این بررسی هم از سوپانسیون باکتریایی و هم سوپرناتانت آنزیمی *کلبسیلا پنومونیه* استفاده شد، و در هر دو حالت رابطه مستقیمی بین مقدار پلولان و قند آزاد شده(فعالیت آنزیمی) مشاهده گردید.

مواد و روش

شناسایی پلولان با *کلبسیلا پنومونیه*: برای شناسایی پلیمر پلولان با باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (PTCC 1053) همانطور که ذکر شد هم می توان از سوسپانسیون باکتری و هم سوپرناتانت فاقد باکتری که در محیط اختصاصی حاوی پلولان کشت داده شده و حاوی آنزیم است استفاده کرد. در هر دو صورت رابطه ی مستقیمی بین مقدار پلیمر و قند آزاد شده، متعاقب فعالیت آنزیمی این باکتری مشاهده می شود. در روش اول به ۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی دارای جذب ۳۰۰ در طول موج ٦۰۰ نانومتر ۵۰۰ میکرو لیتر محلول پلی ساکاریدی خالص پلولان (سروای آمریکا) با غلظتهای مختلف(۲ تا ٤۰ گرم بر لیتر) و ٤۰۰ میکرو لیتر بافر استات آمونیوم(pH= ۵) اضافه گردید و بمدت ۲ ساعت در دمای ٤۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. تعیین مقدار قند آزاد شده بعد از اضافه کردن یک میلی لیتر محلول DNS و قرار دادن را بمدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش، و خواندن جذب آن بعد از به حجم رساندن با آب مقطر در طول موج ٥٤٦ nm خوانده شد. اما در روش دوم *کلبسیلا پنومونیه* ی فعال شده بر روی نوترینت آگار را در محیط نوترینت براث حاوی پلولان (نوترینت براث ۸ درصد + پلولان ۵ درصد در pH=7 بصورت کشت مقدماتی کشت داده و بعد از ۲٤ساعت ۲ میلی لیتر از آن را به ۱۸ میلی لیتر از همان محیط کشت اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در هوادهی ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. از محیط کشت فوق هر پنج ساعت یک بار نمونه گیری، و بعد از سانتر یفیوژ، به ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی برای تعیین مقدار قند آزاد شده به آن یک میلی لیتر محلول DNS اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه حرارت در بن ماری در حال جوش قرار گرفت جذب را بعد از به حجم رساندن با آب مقطر در طول موج ٥٤٦ nm خوانده و میزان قند آزاد شده محاسبه شد(۱۰). طی این روش زمان ماکزیمم فعالیت آنزیمی سوپرناتانت باکتریایی بدست آمد. سپس با کشت باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بر روی محیط ذکر شده و بدست آوردن سوپرناتانت آنزیمی این باکتری منحنی استاندارد آن رسم شد. به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت

Archive of SID
www.SID.ir

باکتریایی فوق را به مخلوط حاوی نمونه ی پلی ساکاریدی (۲ تا ٤۰ گرم بر لیتر) و ٤۰۰ میکرولیتر بافر اضافه کرده و آن ها را بعلاوه نمونه شاهد (بلانک) بمدت ۲ ساعت در ٤۰ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس با اضافه کردن یک میلی لیتر DNS بمدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش جوشانده شد. سپس بعد از حجم رساندن با آب مقطر جذب در٥٤٦ nm مطالعه و منحنی استاندارد آن رسم شد(۷،٥و۸). نمونه شاهد (بلانک) حاوی همان مقدار بافر، همان مقدار سوپرناتانت مشابه و یک میلی لیتر DNS بود که بلافاصله بعد از تولید در یخچال گذاشته شد.

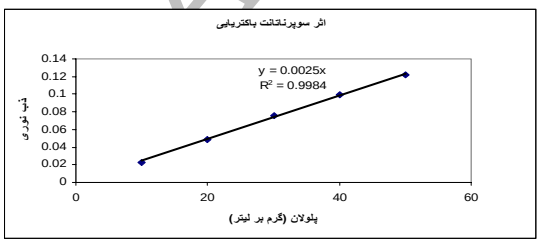
تعیین شرایط بهینه: برای بهینه سازی از سوپرناتانت حاوی آنزیم استفاده شد، بهترین زمان برداشت نمونه ۱۰ ساعت پس از کشت است که برای نمونه برداری و تعیین سایر شرایط انتخاب شد. ۱۰ ساعت بعد از کشت دو نمونه ۱۰۰ میکرولیتری در یک زمان از نمونه سوپرناتانت فاقد باکتری برداشته شد. یکی از آنها را بعنوان شاهد یا بلانک در نظر گرفته، با اضافه کردن DNS و بافر در یخچال قرار داده شد و دیگری بعنوان نمونه مورد نظر برای بهینه سازی انتخاب شد. نمونه دوم که حاوی بافر، سوپرناتانت و محلول پلی ساکارید پلولان بود بمدت ۲ ساعت در ٤۰ درجه سانتی گراد انکوباسیون شد. بعد از این زمان یک میلی لیتر DNS به نمونه دوم هم اضافه کرده و سپس هر دو را در بن ماری در حال جوش بمدت ۱۰ دقیقه حرارت داده، و بعد از خنک شدن نمونه ها و به حجم رساندن، جذب آنها در ٥٤٦ nm بررسی شد. برای بهینه سازی شرایط شرایط فعالیت آنزیمی ابتدا بافرهایی با pH های مختاف ساخته و pH بهینه مشخص گردید سپس بهینه سازی دما در pH بهینه ٥ انجام گرفت. بدین معنی که نمونه و شاهد را در دماهای مختلف قرار داده و با تعیین میزان قند تولیدی دمای بهینه تعیین شد (۳ و ۱۰).

تعیین pH بهینه: پس ازکشت باکتری فوق در محیط کشت نوترینت براث حاوی پلولان، بعد از ۱۰ ساعت از کشت نمونه برداری کرده و نمونه سانتریفیوژ شد. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتراز سوپرناتانت حاصله را در ٤۰۰ میکرولیتر بافر های با pH مختلف(۳،٤،٥و۷) که حاوی پلی ساکارید پلولان بوده، بمدت ۲ ساعت انکوبه گردید. قند حاصل با اضافه کردن یک میلی لیترDNS و طی حرارت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش محاسبه شد. در همه موارد از شاهد برای صفر کردن دستگاه استفاده شد(۱و۳).

تعیین دمای بهینه: بعد از کشت باکتری در محیط ذکر شده ونمونه گیری بعد از ۱۰ ساعت، فعالیت آنزیمی سوپرناتانت در دماهای مختلف(۲۰،۳۰،٤۰ و ٥۰ درجه سانتی گراد) با اندازه گیری قند آزاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

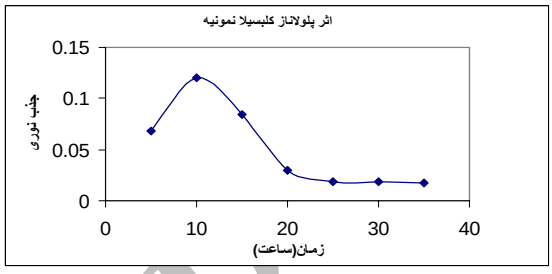
در مواقع عدم دسترسی به آنزیم خالص، می توان از سوسپانسیون باکتریایی مولد آین آنزیم و همینطور از سوپرناتانت میکروبی آن در مقیاس کیفی و کمی در تشخیص و تعین مقدار پلولان استفاده کرد. اما باید توجه داشت که باید باکتری را از قبل در محیط پلولان دار کشت داد و بعلاوه در اندازه گیری کمی بایستی از سوپرناتانت کشت فوق استفاده کرد. در استفاده از *کلبسیلا پنومونیه* در شناسایی پلولان همانطور که در نمودار(۱) آورده شده رابطه خطی بین مقدار قند آزاد شده و مقدار پلولان وجود دارد.



نمودار (۱): اثر مقدار ثابتی از سوپرناتانت حاصل از رشد *کلبسیلا پنومونیه* بر مقادیر مختلفی از پلولان . طول موج ٥٤٦ نانومتر است بین مقدار قند آزاد شده طی فعالیت آنزیمی پلولاناز *کلبسیلا پنومونیه* ومقادیر مختلف پلولان رابطه مستقیم وجود دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

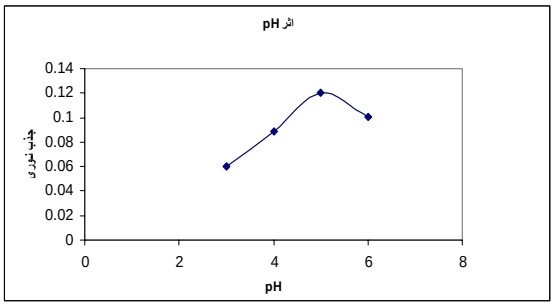
در بهنیه سازی همانطور که گفته شد از زمان فعایت آنزیمی ماگزیمم استفاده شد. بطوریکه در شکل دیده می شود بیشترین قند آزاد شده بعد ۱۰ ساعت از زمان کشت می باشد(نمودار ۲).



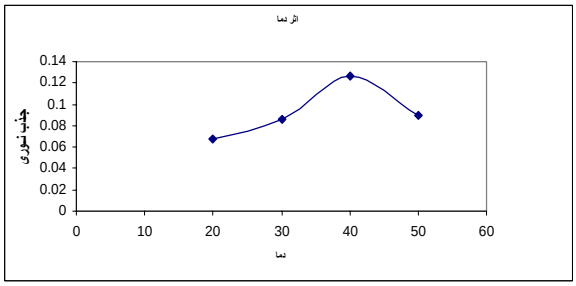
نمودار(۲) : منحنی فعالیت آنزیمی پلولاناز در زمانهای مختلف. بیشترین فعالیت آنزیمی *کلبسیلا پنومونیه* ۱۰ ساعت بعد از تولید است.

در بهینه سازی، بعد از آنکه نمونه باکتریایی در محیط حاوی پلولان کشت داده شد بعد از گذشت ۱۰ ساعت از زمان کشت نمونه گیری شد و مقدار بهینه دو فاکتور pH و دما در طیفهای مختلف تعیین شد(٦ و۱۱). در بهترین pH برای فعالیت آنزیمی pH= ٥ و بهترین دما در٤٠ درجه سانتی گراد است(نمـودار۳و٤).

آنزیم پلولاناز این باکتری نیز مانند باکتری باسیلوس اسیدو پلولیتیکوس از نوع تیپ ۱ می باشد، یعنی تنها روی پلولان و دیگر اولیـگو ساکارید های شـاخه دارحاوی پیوند(٦-۱)α اثر می کند، بعبارتـی این تیپ تنها روی پیـوند های (٦-۱)α موثر می باشد (٥).



نمودار(۳) : منحنی اثر pH بر فعالیت آنزیمـی پلولاناز *کلبسیلا پنومونیه* بهترین pH برای فعالیت آنزیمی این باکتری pH= ٥ است.



نمودار(٤) : منحنی اثر دما بر فعالیت آنزیمی پلولاناز *کلبسیلا پنومونیه* دمای بهینه فعالیت پلولانازی باکتری ٤٠ درجه سانتی گراد است.

پس احتمالاً اگر پلیمری مجهول با سوپرناتانت حاوی آنزیم یا سوسپانسیون خود این باکتری بررسی گردد، می توان با قرار دادن شاهد هایی از نشاسته و پلولان معلوم، پلولان بودن پلیمر مجهول را ثابت کرد، زیرا همان طور که در این بررسی مطالعه شد مقدار قند آزاد شده از پلیمرهای دیگر مانند نشاسته طی فعالیت آنزیمی این باکتری، محاسبه شده با استفاده از جذب نوری قند آزاد شده، در مقایسه با پلولان بسیار ناچیز است. بعبارتی با مقایسه جذب نوری مقدار مساوی پلیمر مجهول و پلولان استاندارد این تفاوت را می توان بررسی کرد. در این بررسی از سلولز نیز بعنوان شاهدی بر درستی فعالیت آنزیمی این باکتری استفاده شد، بطوریکه در مورد سلولز هیچ قند احیاء آزاد نمی شود. اما در مورد نشاسته جذب نوری فوق العاده کمی بدست آمد که جذب بدست آمده در مورد دوم بدلیل فعالیت آنزیمی پلولاناز روی شاخه های پلیمر نشاسته می باشد. برای تأئید پلولاناز بودن این آنزیم جدا از استفاده پلولان استاندارد خالص از پلولاناز خالص (سیگما- آلدریچ) نیز استفاده گردید و فعالیتهای آنها مقایسه شد. این نتایج نشان داد که با استفاده از سوپرناتانت دارای آنزیم پلولاناز این باکتری و یا هر باکتری دیگر مولد این آنزیم می توان در شناسایی این پلیمراستفاده کرد. البته ابتدا باید مطمئن شد که باکتری مورد نظر هیچ فعالیتی بر سلولز ندارد و اثر آن بر نشاسته چگونه است. باکتریهای دارای پلولاناز تیپ ۱ روی پیوندهای(٦-۱)α اثر کرده بی آنکه هیچ اثری روی

Archive of SID

www.SID.ir

پیوندهای (٤-١)α داشته باشد، اما باکتریهای دارای تیپ ۲ آنزیم بعلاوه روی(٤-١)α نیز اثر گذار است. از آن جایی آنزیم پلولاناز این باکتری با اثر بر روی نشاسته و انـدازه گیری قنـد های احیاء حاصله جذب زیـادی تولید نکرد می توان نتیـجه گرفت که آنزیم پلولاناز این باکتـری از نوع ۱ می باشد. این خصوصیت آنزیم فوق بعلاوه طی مقایسه اثر آنزیم خالص پلولاناز بر روی پلولان نیز ثابت شد(٦ و ١١). طبق مطالعات انجام گرفته شرایط بهینه برای فعالیت آنزیمی آنزیم پلولاناز بسته بنوع باکتری حتی در حد سویه نیز متفاوت است. بطوریکه بهترین شرایط فعالیت آنزیمی در مورد آنزیم پـلولاناز کلبـسیلا پنومونیه ATCC 9621 بترتیب pH ٦-٥/٥ و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد می‌باشد(۱۰)، و در مورد فعالیت این آنزیم در باکتری باسیلوس *اسیدوپلولیتیکوس* pH و دمای بهینه بترتیب ٥/٥ و ٤٠ درجه سانتی گراد است(۱۱). فعالیت آنزیمی سویه PTCC 1053 بر روی پلولان خالص در pH ، ٥ و دما ی٤٠ درجه سانتی گراد بالاترین فعالیت می باشد.

همه باکتریهای مولد آنزیم ، آن را در فاز رشد تولید می کنند. در این بررسی نیز با مقایسه زمان بهینه تولید آنزیم و منحنی رشد مشخص می شود که باکتری این آنزیم را در فاز رشد تولید می کند(۷).

منابع

1-Antranikian, G., Herzberg, C. and Gottschalk, G. 1987. Production of Thermostable α-Amylase, Pullulanase, and α-Glucosidase in Continuous Culture by a New *Clostridium* Isolate. Appl Environ Microbiol. 53: 1668–1673.

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

3-Ducrey Santopietro, K. M., Sineriz, F. and Castro, G. R. 1992. A spectrophotometric method the quantitative measurement of pullulan. Journal of Microbiological Methods.16: 253-258.

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

5-Pugsley, A. P., Chapon, C. and Schwartz, M. 1986. Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein. J Bacteriol. 166: 1083–1088.

6-Renneberg,R., Kaiser, G., Scheller, F. and Tsujiseka, Y. 1985. Enzyme Sensor for Pullulan and Pullulanase Activity. Biotechnology Letters. 7: 809.812.

7-Saha, B. C., Lamed, R., Lee, CH. Y., Mathupala, S. P. and Zekius, J. G. 1990. Chracterization of an endo-Acting Amylopullulanase from *Thermoanaerobacter B6A*. 56: 881-886.

8- Smith, K. A., Salyers, A. A. 1989. Cell-associated pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: cloning, characterization, and insertional mutagenesis to determine role in pullulan utilization. Journal of Bacteriology. 171: 2116-2123.

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

10-Suzaki,Y. and Chishiro, M. 1983. Production of extracellular thermostable pullulanase by an amylolytic obligate thermophilic soil bacterium *Bacillus stearothermophilus*. Europ. J. Appl. Microbial. Biotechnol.17: 24-29.

11-Wallenfels, k., Bender, H. and Rached, J. R. 1966. Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*; production in a cell-bound state. Purification and properties of the enzyme. Biochem Biophys Res Common. 22: 254- 261.

Archive of SID
www.SID.ir

Application of *Klebsiella Pneumoniae* in Determination of Pullulan Polymer and Optimization of Activity Factors

Ghezelbash Gh.R.[1], Nahvi I[2]., Tavasoli M.[3] and Emtiazi G.[2]

[1]**Biology Dept., Faculty of Science, University of Shahid Chamran, rghezelbash@scu.ac.ir**

[2] **Microbiology Dept., Faculty of biology, University of Isfahan.**

[3]**Genetics Dept., Faculty of Biology, University of Isfahan**

Abstract

Pullulanse is an enzyme that can be Produced by *K.Pneumoniae*, *Bacillus acidopullulyticus* and e few other Bacteria. This Enzme can brak pullulan biopolymer specifically and it is the most reliable method in this polymer detection. A suppernatant of *K.Penamonia* culture that cotains pullulanase used in detection and measurment of pullulan. At first, *K.Penamonia* was cultured in a preliminaty active nutrient agar containing pullulan (the enzyme specific substrate) for 24 hours .Then 2ml of this culture was added to the 16ml of a culture media and it was incubated in 37º C and 120 rpm.The Enzymatic activity of this strain was determined at 5 hour intervals and the activity was seen after 10 hours .the enzymatic activity of produced pullulanase measured according to released maltotrise in gram/lit, and 32.43g/l of maltotriose were release after 10 hours. The PH =5 and 40º C are the optimimum condition for enzymes activity.

Key Words: Pullulan, Pullulanase, *K. Pneumoniae* PTCC 1053

Archive of SID

www.SID.ir