تولید پولولاناز نمک دوست خارج سلولی توسط سویه *Halorubrum* Ha25 جدا شده از دریاچه پرشور آران و بیدگل

مصطفی فاضلی[۱]، محمدعلی آموزگار[۱*]، مهران حبیبی رضایی[۲] و مریم سیروسی[۱]

[۱] **تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی**

[۲] **تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه سلولی و مولکولی**

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۶

چکیده

امروزه کاربرد زیست‌فن‌آوری آنزیمهایی که در شرایط سخت صنعتی مانند دما و شوری بالا پایدارند رو به افزایش است، از این رو تلاشهای متعددی در جهت جداسازی این آنزیمها از میکروارگانیسم‌های کران دوست انجام گرفته که در این میان نمک-دوستها، مهم ترین تولید کننده این آنزیمها هستند. در این پژوهش یک آرکی نمک‌دوست که به عنوان جنس *Halorubrum* شناسایی شد، آنزیم پولولاناز خارج سلولی نمک‌دوست و گرمادوست نسبی را در محیط کشت دارای ۲۳ درصد نمک تام تولید کرد. تولید آنزیم پولولاناز در این سویه با میزان رشد هماهنگ بود و در میانه فاز سکون به بیشترین میزان خود رسید. در حضور غلظت ۳/۰ تا ۴/۰ مولار نمک NaCl بیشینه تولید آنزیم مشاهده شد ($۸۵\ U\ ml^{-1}$). دما و pH بهینه برای تولید آنزیم به ترتیب ۴۵ درجه سانتی‌گراد و۷/۰ تعیین شد. منابع مختلف کربن مانند مالتوز، نشاسته و پولولان به عنوان القاء کننده و گلوکز به عنوان مهار کننده تولید آنزیم شناسایی شدند. غلظت بهینه منیزیم برای تولید آنزیم ۰/۱ مولار تعیین و در نبود یونهای منیزیم، رشد سویه و تولید آنزیم مشاهده نشد. بیشینه فعالیت آنزیم در حضور غلظت ۳/۰ مولار نمک NaCl و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و در دمای ۴۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب کاهش ۲۵ درصد و ۷۲ درصد در فعالیت آنزیم مشاهده شد. pH بهینه برای فعالیت آنزیم ۸ تعیین و در pH ۶/۰ و ۹/۰، پس از مدت ۳۰ دقیقه به ترتیب ۴۹/۵ درصد و ۳۲/۴ درصد از فعالیت آنزیم باقی ماند.

واژه های کلیدی: تولید پولولاناز، نمک دوست، آرکی نمک دوست افراطی، *Halorubrum* ، پولولان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۱۱۱۳۵۵۷-۰۲۱، پست الکترونیکی: amozegar@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

گلیکوزیل هیدرولازها مانند آمیلازها، سلولازها، زایلانازها و غیره، به طور گسترده‌ای در هر سه قلمرو حیات شناسایی شده‌اند. این آنزیمها نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدراتها دارند، اما تاکنون مطالعات اندکی روی آنزیمهای آرکیایی صورت گرفته است (۶ و ۱۷). آنزیمهای آمیلولیتیک میکروبی کاربردهای متعددی در صنایع دارویی، مواد شوینده، صنایع غذایی و به خصوص صنایع نشاسته به منظور هیدرولیز نشاسته پیدا کرده‌اند (۶ و ۸).

پولولانازها (پولولان ۶- گلوکانوهیدرولاز، EC 3.2.1.41) گروهی از آنزیمهای شاخه‌شکن هستند که پیوندهای گلیکوزیدی α(۱-۶) را در پولولان، گلیکوژن، آمیلوپکتین و سایر کربوهیدراتهای مرتبط هیدرولیز کرده و مالتواولیگوساکاریدها، مالتوتریوز و مالتوز را به عنوان محصول نهایی تولید می‌کنند (۱۹ و ۳۸). پولولانازها به طور گسترده‌ای به همراه آمیلازهای ساکاریفیه کننده برای

بهبود ساکاریفیکاسیون و به عنوان عاملی برای جلوگیری از بیات شدن نان استفاده می‌شوند (۷ و ۳۸).

نمک‌دوستها میکروارگانیسم‌های کران‌دوستی هستند که در محیطهای پرشور نظیر دریاچه‌های شور و پرشور و غذاهای نمکی تخمیر شده زندگی می‌کنند. هالوباکتریها و هالوآرکیها در پروکاریوتها از جمله این میکروارگانیسم‌ها هستند.

به تازگی توجه به آنزیمهای میکروارگانیسم‌های نمک-دوست نسبی و کاربردهای زیست‌فن‌آوریشان افزایش یافته است (۳، ۲۳، ۳۴ و ۳۵). آنزیمهای نمک‌دوست علاوه بر اینکه عملکرد آنزیمی مشابهی با همتایان غیرنمک‌دوست خود نشان می دهند، ویژگیهایی از قبیل نیازمندی به غلظتهای بالای نمک برای فعالیت و پایداری نیز دارند. این آنزیمها اغلب تحمل کننده دما بوده و در آب فعال کم (آب فعال آبی است که برای هیدراته کردن ساختار پروتئینی به منظور حفظ ساختار صحیح در اختیار آن قرار دارد) نیز عملکرد دارند. بسیاری از فرآیندهای صنعتی در شرایط سختی انجام می‌شوند که آنزیمهای معمولی در این شرایط فعال نیستند (۹، ۲۲ و ۲۷). از این رو اکستریموزیم‌ها که در غلظتهای نمک زیاد، دمای بالا و pH های مختلف فعالیت بهینه دارند، دارای اهمیت هستند. آنزیمهای هیدرولیزکننده تولید شده توسط هالوآرکیها به دلیل فعالیت در دمای بالا و آب فعال کم، می‌توانند در صنعت به کار روند.

گلیکوزیل هیدرولازهای تولید شده توسط آرکیها نسبت به سایر قلمروها کمتر مطالعه شده‌اند، با این وجود آمیلازها و زایلانازها در برخی آرکیهای نمک‌دوست افراطی مانند *Haloferax mediterranei*، *Halobacterium* sp.، *Haloarcula hispanica*، *Natronococcus* sp. Ah-36 و *Halorhabdus utahensis* گزارش شده‌اند (۱۳، ۱۸، ۲۱، ۳۲، ۳۹).

در این پژوهش برای اولین بار، تولید آنزیم پولولاناز از آرکی نمک‌دوست افراطی جنس *Halorubrum* سویه Ha25 گزارش شده است. در این بررسی همچنین، شرایط بهینه جهت تولید و فعالیت آنزیم نیز تعیین شده است.

مواد و روشها

سویه آرکی و شرایط کشت: آرکی نمک‌دوست افراطی سویه Ha25 از دریاچه پرشور آران و بیدگل در ایران جدا شد. این سویه در شرایط هوازی در دمای ۴۰ درجه سانتی-گراد در محیط کشت دارای (w/v) ۱ درصد نشاسته محلول، ۱ درصد پپتون گوشت، ۰/۲ درصد عصاره مخمر و با پایه نمکی ($g\ l^{-1}$) NaCl ۱۸۴، $MgCl_2.6H_2O$ ۲۳، $MgSO_4$۲۷، KCl ۵/۴ و $CaCl_2$ ۴ (محلول $CaCl_2$ جداگانه اتوکلاو شد و سپس به میزان ۴ میلی لیتر بر لیتر به محیط کشت افزوده گردید) کشت داده شد. pH محیط نیز با استفاده از Tris – HCl در محدوده‌ی ۷/۴– ۷/۲ تنظیم شد.

شناسایی سویه: ویژگیهای ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک سویه Ha25 روی محیط MGM جامد و مایع محتوی ۲۳ درصد نمک تام (w/v) بررسی شد. رنگ آمیزی گرم این سویه بر اساس روش Dussault (۱۰) و بررسی حرکت آن نیز با روش لام مرطوب انجام شد (۱۲). فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تولید اندول، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات و مصرف سیترات مطابق Bergey's Manual of Systematic Bacteriology مورد بررسی قرار گرفتند (۴ و ۱۵). تولید اسید از کربوهیدراتها، رشد در شرایط بی‌هوازی و حساسیت به آنتی‌بیوتیکهای مختلف با روشهای ارائه شده توسط Oren و همکاران مطالعه شدند (۳۰). هیدرولیز توبین ۸۰ طبق روش González بررسی شد (۱۶).

DNA ژنومی این سویه با روش Wan Lam استخراج شد (۱۱). ژن ۱۶S rRNA این سویه با پرایمرهای عمومی ۲۱F (5′-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3′) و ۱۴۹۲R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و طبق برنامه زیرتکثیر شد:

دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. سپس ۳۰ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شدند. در انتها، برای تکمیل واکنش ساخت DNA دما برای ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با الکتروفورز بخشی از محصول و رنگ آمیزی آن با اتیدیوم برماید تأیید شد. این محصول از هر دو سو تعیین توالی شد و سپس شباهت توالی ۱۶S rRNA این سویه با سایرتوالیهای ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/; EzTaxon-e server Kim et al., 2012) تعیین شد (۲۰).

تولید پولولاناز و آماده‌سازی محلول آنزیمی خام: تولید آنزیم با تلقیح فلاسکهای ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت با کشت سه روزه سویه، انجام گرفت. کشتها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شدند. فلاسکها پس از مدت زمان ۹۶ ساعت برداشته شده و زیست‌توده با سانتریفیوژ محتویات فلاسک در ۹۰۰۰ x g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد حذف شد. مایع‌رویی جهت ارزیابی فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش فعالیت پولولاناز: ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۴۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۵) حاوی ۰/۵ درصد پولولان و ۲/۵ مولارNaCl در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرماگذاری و سپس مقدار قندهای احیاکننده آزاد شده با روش دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شد (۲۶). بر حسب تعریف یک واحد آنزیم پولولاناز مقدار آنزیمی است که موجب آزاد شدن یک میکرو مول قند احیایی مالتوتریوز در یک دقیقه در یک میلی لیتر محلول آنزیمی شود.

اثر دما، pH و غلظت نمک روی رشد و تولید آنزیم: جهت بهبود تولید آنزیم پولولاناز، اثر عوامل مختلف روی رشد سویه Ha25 و تولید آنزیم بررسی شد. برای دست-یابی به دمای بهینه جهت رشد و تولید آنزیم، از محیط پیش کشت به میزان ۱ درصد به محیطهای پایه آماده شده با (w/v) ۲۳ درصد نمک و pH معادل ۷/۴– ۷/۲ تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. برای تنظیم pH های مختلف به منظور تعیین pH بهینه، از بافرهای استاندارد استات سدیم (pH ۵/۰)، (۶/۰ MES (pH، HEPES (pH ۷/۰)، Tris (pH ۸/۰–۹/۰) و Glycine-NaOH (pH ۱۰/۰) استفاده شد. غلظتهای ۵/۵ – ۱/۵ مولار از NaCl و ۰/۵– ۰/۰ مولار از $MgCl_2$ **و** نمکهای کلرید پتاسیم، استات سدیم و نیترات سدیم با غلظتهای ۱/۰ تا ۴/۰ مولار جهت تعیین میزان بهینه این نمکها بررسی شدند.

اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن بر رشد و تولید پولولاناز: به منظور بررسی اثر منابع کربن، کربوهیدراتهای مختلفی شامل گلوکز، فروکتوز، مالتوز، لاکتوز، دکسترین، پولولان به میزان ۱ درصد (w/v) به عنوان تنها منبع کربن، در محیط پایه جایگزین نشاسته شدند. جهت تعیین غلظت بهینه نشاسته محلول برای تولید پولولاناز، نشاسته محلول با غلظتهای (w/v) ۵/۰ – ۰/۰ درصد به عنوان منبع کربن به محیط کشت اضافه شد. برای بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن آزمایشگاهی در تولید پولولاناز در محیط پایه، از منابع آلی و معدنی شامل عصاره مخمر، عصاره گوشت، پپتون، ترکیبی از عصاره گوشت و پپتون، عصاره مخمر و پپتون، کلرید آمونیوم (NH_4Cl)، سولفات آمونیوم ($(NH_4)_2SO_4$) ، نیترات آمونیوم و نیترات سدیم به میزان (w/v) ۱ درصد استفاده شدند.

خالص‌سازی نسبی آنزیم: کلیه مراحل خالص‌سازی در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفتند. رسوب‌دهی

پروتئینها با روش رسوب‌دهی توسط اتانول مطلق سرد انجام شد. برای این منظور ابتدا کشتهای میکربی ۴ روزه، در فالکونهای ۱۵ میلی‌لیتری در دمای۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور x g ۹۰۰۰، سانتریفیوژ شده و به این ترتیب سلولها و دیگر مواد جامد محیط حذف شدند. یک حجم اتانول مطلق سرد شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به صورت قطره قطره به مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ محیط کشت اضافه گردید. رسوب حاصل با استفاده از سانتریفیوژ با دور x g ۹۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع آوری شد. این رسوب در کمترین مقدار بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/۵ حل‌شد. سپس این مایع مورد دیالیز قرار گرفت. برای تخلیص بیشتر آنزیم، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی با محیط سفادکس G-100 انجام شد. با استفاده از این روش کروماتوگرافی، پروتئینها بر حسب اندازه از ستون خارج می‌شوند. با شستشوی ستون با بافر پروتئینهای بزرگتر زودتر و پروتئینهای کوچکتر با تأخیر از ستون خارج می‌شوند. ستون کروماتوگرافی (۴۰ cm × ۱/۵) با استفاده از بافر سدیم فسفات ۲۰ میلی مولار (pH ۷/۵) حاوی NaCl ۲مولار به حالت تعادل در آمد. جداسازی تفکیکی پروتئینها با استفاده از دو حجم از همان بافر با سرعت جریان ۰/۲ میلی لیتر بر دقیقه انجام شد. حجم بخشهای جمع آوری شده از ستون، یک میلی‌لیتر بود. بعد از اتمام شستشوی ستون، فعالیت آنزیمی تمام بخشهای خارج شده از ستون مورد بررسی قرار گرفتند. بخشهای فعال جمع‌آوری شده و به عنوان آنزیم خالص شده برای بررسیهای بیشتر استفاده شدند. در همه مراحل تخلیص، اندازه‌گیری میزان پروتئین با روش برادفورد انجام گرفت (۵).

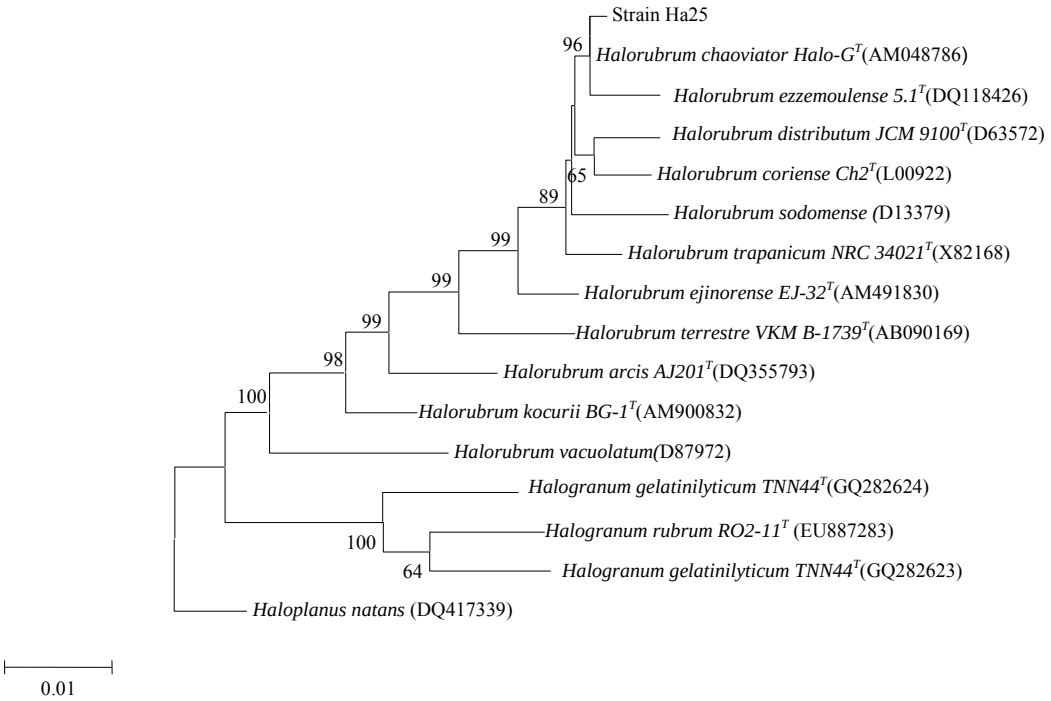
بررسی بیوشیمیایی فعالیت پولولاناز تخلیص شده نسبی: برای تعیین دمای بهینه فعالیت پولولانازی، واکنش آنزیمی در گستره دمایی ۵۵-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام شد و سنجش فعالیت پولولیتیک مطابق شرایط استاندارد انجام گرفت. برای تعیین pH بهینه فعالیت پولولیتیک بخشهای فعال، از محلول سنجش پولولان ۰/۵ درصد در بافرهایی با pH مناسب با غلظت ۲۰ میلی مولار(۵/۰، استات سدیم؛ ۶/۰، MES؛ ۷/۰، HEPES؛ ۸/۰ تا ۹/۰، Tris؛ ۱۰/۰، Glycine-NaOH) استفاده شد. فعالیت آنزیم تخلیص شده نسبی در حضور غلظتهای ۵/۲ – ۰/۰ مولار NaCl اندازه‌گیری شد، همچنین اثر غلظتهای مختلف NaCl (۳-۱ مولار) در گستره دمایی ۵۵-۲۵ درجه سانتی-گراد روی فعالیت آنزیم بررسی شد.

بررسی محصولات حاصل از عملکرد آنزیم: جهت تعیین محصولات حاصل از عملکرد آنزیمی بر روی پولولان، نشاسته و مالتوتریوز، از روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) استفاده شد. به این منظور، در تانک TLC، از سیستم حلال n- بوتانول- اسید استیک – آب (۱ : ۱ : ۳ ، v/v/v) و به منظور ردیابی محصولات حاصل از عملکرد آنزیم نیز از معرف دی فنیل آمین – آنیلین – اسید ارتو فسفریک استفاده شد (۳۱).

نتایج

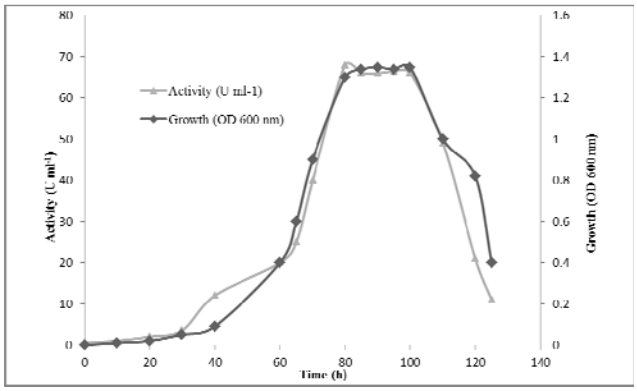
مطابق با آزمونهای بیوشیمیایی و اطلاعات حاصل از تعیین ترادف ژن ۱۶S rRNA، سویه Ha25 در جنس *Halorubrum* قرار گرفت. درخت فیلوژنی این سویه با روش Neighbour-joining رسم شد (شکل۱). این درخت موقعیت فیلوژنی سویه Ha25 را نشان داده و مطابق با آن نزدیکترین گونه به این سویه، *Halorubrum chaoviator* با شماره دسترسی Gene bank، AM048786 است (۲۴).

این سویه گرم منفی، چند شکلی، متحرک و هوازی بوده و اسپور تشکیل نمی‌دهد. کلنیهای آن بر روی محیط جامد حاوی ۲۳ درصد نمک تام (w/v) به رنگ قرمز و محدب با کناره‌های صاف بود.



شکل ۱- درخت فیلوژنی *Halorubrum* sp. strain Ha25

رشد این آرکی در غلظتهای ۱/۵ تا ۵/۲ مولار از NaCl و در محدوده pH بین ۶/۰ تا ۹/۰ و دمای ۲۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. غلظت نمک، pH و دمای بهینه برای رشد به ترتیب ۳/۰ مولار، ۷/۰ pH و۴۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. همچنین مشخص شد که حضور یونهای منیزیم برای رشد ضروری است. این سویه اکسیداز و کاتالاز مثبت بوده ، نیترات را به نیتریت احیاء کرده و قادر به مصرف کربوهیدراتهای گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، مانوز، سوکروز، مالتوز، ریبوز و نشاسته بود، ولی توان مصرف مانیتول را نداشت. این سویه قادر به هیدرولیز ژلاتین، کازئین و توبین ۸۰ نبوده، اندول و H_2S را تولید نکرده و به پنیسیلینG، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین و آمپی‌سیلین مقاوم بود.



شکل ۲- کینتیک رشد و تولید آنزیم پولولاناز *Halorubrum* sp. strain Ha25 در محیط پایه. نتایج نشان داده شده میانگین ۳ بار تکرار هستند.

جدول ۱- ویژگیهای افتراقی سویه Ha25-۱ با ۲- *Halorubrum chaoviator Halo-G^T*، ۳- *Halorubrum ezzemoulense 5.1^T* و ۴- *Halorubrum distributum JCM 9100^T*

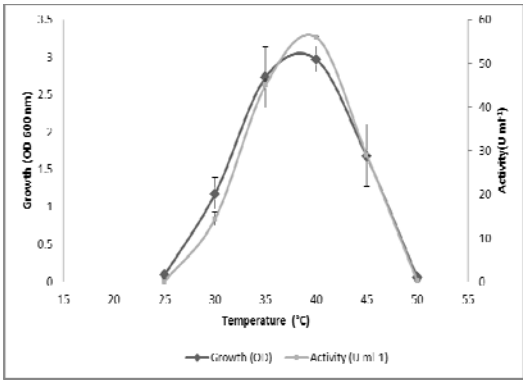
ویژگی	۱	۲	۳	۴
شکل ظاهری	چند شکلی	چند شکلی میله‌ای	چند شکلی	چند شکلی میله‌ای
نیازمندی به Mg^{2+}	۲۰۰-۱۰۰mM	۵۰mM	+	+
محدوده دمایی رشد (°C)	۲۵-۵۰	۲۸-۵۰	۲۲-۵۰	۲۶-۵۰
احیای نیترات	+	-	+	+
هیدرولیز توین ۸۰	-	-	-	-
هیدرولیز نشاسته	+	+	-	-
مصرف:				
گلوکز	+	+	+	-
سوکروز	+	-	+	-
لاکتوز	+	+	+	-
گالاکتوز	+	+	-	-
دمای بهینه (°C)	۴۰	۳۷	۳۷-۴۰	۳۷-۴۵
تولید H_2S	-	نا مشخص	نا مشخص	+
محدوده NaCl برای رشد (M)	۱/۵-۵/۲	۲-۵	۲/۵-۴/۳	۱/۷-۵/۲
G+C content (mol%)	نا مشخص	۶۵/۵	۶۱/۹	۶۳/۶

Data were taken from Kharroub (2006), Mancinelli (2009), Castillo (2007), Cui (2007)

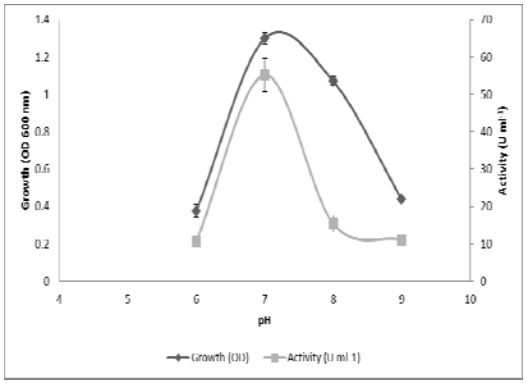
ویژگیهای تمایز دهنده سویه Ha25 از دیگر گونه‌های نزدیک جنس *Halorubrum* در جدول ۱ آمده است.

اثر دما، pH و غلظتهای مختلف نمک روی رشد و تولید پولولاناز: تولید آنزیم با میزان رشد همراه بوده و در میانه فاز سکون به بیشینه خود رسید. پیوستگی بین رشد و تولید آنزیم در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود، تولید آنزیم با رشد سویه شروع شده و زمانی که رشد به بیشترین میزان خود می‌رسد، تولید آنزیم نیز در بیشترین مقدار خود است. با وارد شدن سلولها به فاز مرگ، تولید آنزیم نیز کاهش پیدا می‌کند. رشد و تولید آنزیم در گستره دمایی ۵۰- ۲۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفته و بیشترین تولید ($U\ ml^{-1}$ ۰/۲۴± ۵۶) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دیده شد (شکل.۳. الف). رشد سلولی و ترشح پولولاناز در گستره pH بین ۶/۰ تا ۹/۰ بوده و بیشترین فعالیت پولولیتیک معادل $U\ ml^{-1}$ ۴/۴ ± ۵۵/۲ در pH ۷/۰ مشاهده گردید (شکل.۳.ب). بیشترین میزان تولید آنزیم در غلظت ۳/۵ مولار از NaCl معادل $U\ ml^{-1}$ ۴/۴ ± ۸۳/۲ تعیین شد (شکل.۳.پ). رشد و تولید آنزیم در نبود یونهای منیزیم مشاهده نشد و بیشترین میزان تولید پولولاناز ($U\ ml^{-1}$ ۰/۳۲± ۵۳/۴) در غلظت ۰/۱ مولار از $MgCl_2$ تعیین شد (شکل.۳.ت). این سویه قادر به تولید پولولاناز در حضور نمک NaCl بود. با جایگزینی نمک NaCl با نمکهای سدیم نیترات و سدیم استات رشد سویه بدون تولید آنزیم صورت گرفت. با جایگزینی نمک NaCl با KCl رشد و تولید آنزیم مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

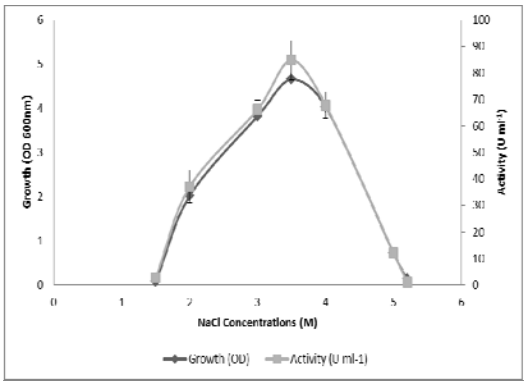
شکل.۳. (الف):



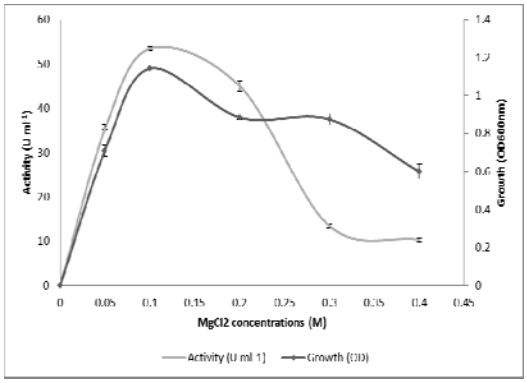
شکل ۳. (ب):



شکل ۳.(پ) :



شکل ۳. (ت) :



شکل۳. اثر دما، pH و غلظتهای مختلف نمک روی رشد وتولید پولولاناز توسط *Halorubrum* sp. strain Ha25. الف) اثر دما روی رشد و تولید آنزیم ب) اثر pH روی رشد و تولید آنزیم پ) اثر غلظتهای مختلف NaCl روی رشد و تولید آنزیم ت) اثر غلظتهای مختلف $MgCl_2$ روی رشد و تولید آنزیم

اثر منابع کربن و نیتروژن روی رشد و تولید پولولاناز: بیشینه رشد وتولید آنزیم به ترتیب در حضور نشاسته و مالتوز به عنوان تنها منابع کربن مشاهده شد. تولید آنزیم در محیطهای کشت حاوی منو، دی و پلی ساکاریدهای بررسی شده دیده شد. تولید پولولاناز در محیط حاوی مالتوز، القاء شد (۸۰/۵ U ml^{-1})، در حالی که گلوکز به طور کامل تولید آنزیم را در محیط کشت مهار کرد. در حضور دکسترین، نشاسته و پولولان به ترتیب U ml^{-1} ۲۶/۳، ۲۴/۵ و ۲۲/۲ تولید آنزیم مشاهده شد که در این میان نشاسته زی‌توده بیشتری تولید کرد. بیشترین تولید آنزیم (۵۹/۹ U ml^{-1}) در غلظت (w/ v) ۵ درصد نشاسته به دست آمد. با افزایش غلظت نشاسته، تولید زی‌توده کاهش پیدا کرد. تولید آنزیم بر روی ترکیب پپتون گوشت به همراه عصاره گوشت به عنوان منبع نیتروژن، به میزان ۱۱۸/۵ ± ۱/۸ U ml^{-1} مشاهده شد، با این وجود استفاده از پپتون گوشت به تنهایی (۱۱۵/۹ ± ۰/۳ U ml^{-1}) اختلاف زیادی را با آن نشان نمی‌دهد. میزان رشد روی منابع معدنی نیتروژن، بسیار کمتر از منابع آلی آن بود. جدول ۲ میزان رشد و تولید آنزیم پولولاناز را در روی منابع کربن و نیتروژن متفاوت نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن روی رشد و تولید آنزیم پولولاناز

منبع غذایی (w/v)	میزان رشد (OD 600 nm)	میزان فعالیت (U ml^{-1})	تولید پولولاناز (U OD^{-1} 600 nm)
گلوکز	۳/۲	۰ ± ۰	۰
فروکتوز	۳/۵	۰ ± ۰	۰
سوکروز	۲/۵۳	۶/۶ ± ۰/۳	۲/۶
لاکتوز	۲/۲۳	۷/۵ ± ۰/۱	۳/۴
مالتوز	۲/۹	۸۰/۵ ±۰/۴	۲۷/۵

دکسترین	۲/۴	۲۶/۳ ± ۱/۴	۱۱
پولولان	۲/۱	۲۲/۲ ± ۱	۱۰/۶
نشاسته ۰/۵٪	۱	۱۷/۸ ±۰/۴	۱۷/۸
نشاسته ۱٪	۳/۲	۲۴/۵ ±۰/۸	۷/۷
نشاسته ۲٪	۱	۳۵ ± ۰/۷	۳۵
نشاسته ۳٪	۱	۴۱/۵ ± ۰/۶	۴۱/۵
نشاسته ۴٪	۱	۴۲/۴۲ ± ۱/۲	۴۲/۲
نشاسته ۵٪	۰/۸	۵۹/۵ ±۲/۹	۶۷
عصاره مخمر	۰/۳	۳۵/۸ ± ۰/۲	۱۳۷/۷
عصاره گوشت	۱	۹۱/۳ ± ۰/۲	۹۱/۳
پپتون	۱	۱۱۶ ± ۰/۳	۱۱۶
عصاره گوشت و پپتون	۱	۱۱۸/۴ ± ۱/۸	۱۱۸/۴
عصاره مخمر و پپتون	۱/۱	۹۴/۴ ±۱/۱	۸۲/۸
کلرید آمونیوم	۰	۰	۰
سولفات آمونیوم	۰	۰	۰
نیترات آمونیوم	۰	۰	۰
نیترات سدیم	۰	۰	.

درصد های مشخصی از منابع مختلف کربن و نیتروژن ذکر شده در جدول ، جایگزین این منابع در محیط کشت پایه شده اند. داده‌ها به صورت میانگین سه بار تکرار آزمایش ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. درصد تمام منابع غذایی جز مواردی که در جدول ذکر شده است، به میزان (w/v) ۱٪ بوده است.

تخلیص نسبی آنزیم پولولاناز: پولولاناز خارج سلولی از محیطهای فاز سکون آرکی با رسوب‌دهی اتانولی و کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی به طور نسبی خالص‌سازی شد. نتایج تخلیص پولولاناز در جدول ۳ خلاصه شده است. یک پیک فعالیت پولولیتیک از ستون سفادکس G-100 شسته شد. تخلیص نسبی آنزیم نیز با استفاده از SDS-PAGE ثابت شد (نتایج نشان داده نشده‌اند).

اثر عوامل مختلف روی فعالیت پولولاناز تخلیص شده نسبی: تأثیر عوامل مختلف روی فعالیت آنزیم در شکل ۴ نشان داده شده است. آنزیم پولولاناز در pH های خنثی تا کمی قلیایی فعالیت بیشتری را نشان داد. فعالیت آنزیم در pH ۸/۰ به عنوان pH بهینه معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. فعالیت پولولیتیک در pH های اسیدی ۵/۰ و ۶/۰ وpH قلیایی ۹/۰ به ترتیب به میزان ۸۳/۵ درصد و ۵۰/۵ درصد و ۶۷/۶ درصد کاهش یافت (شکل .۴. الف).

جدول ۳- خلاصه تخلیص نسبی پولولاناز از مایع‌رویی کشتهای *Halorubrum* sp. سویه Ha25.

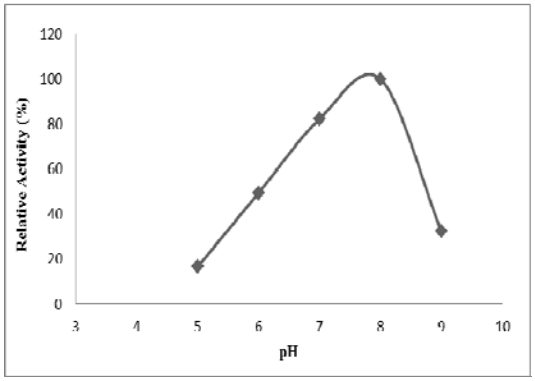
	مایع رویی محیط کشت	رسوب دهی اتانولی	محصول کروماتوگرافی
مقدار پروتئین تام (μg)	۲۶۰۰	۳۰۴	۸/۴
فعالیت آنزیمی (U)	۴۰۰۰	۵۴۶	۴۰/۸
فعالیت ویژه (U mg^{-1})	۱۵۳۸	۱۸۲۰	۴۸۵۱/۲
افزایش فعالیت	۱	۱/۱۸	۳/۵۱

اثر دما روی فعالیت پولولاناز *Halorubrum* sp. سویه Ha25 در شکل ۴. ب نمایش داده شده است. بیشینه فعالیت پولولاناز در۵۰ درجه سانتی‌گراد بوده، و آنزیم خالص شده در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۱۵ درصد، ۲۸ درصد و ۷۵ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد.

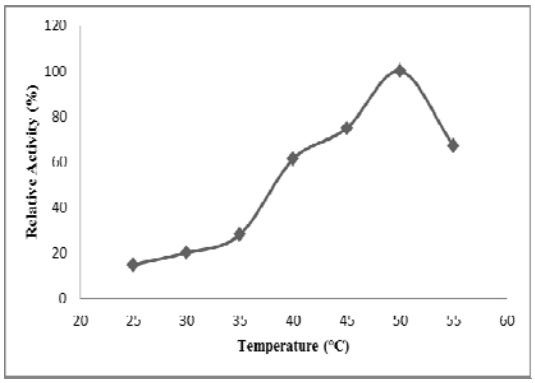
اثر غلظتهای مختلف NaCl روی فعالیت پولولاناز در شکل ۴. پ نشان داده شده است. آنزیم در گستره غلظتهای ۰/۰-۵/۰ مولار NaCl فعال بوده و بیشینه فعالیت آن در غلظت ۳/۰ مولار NaCl مشاهده شد. در دو غلظت ۰/۰ و ۵/۰ مولار NaCl، فعالیت آنزیمی به ترتیب حدود ۶ و ۳۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم بود.

در شکل ۴. ت، اثر دماهای مختلف روی فعالیت پولولاناز در غلظتهای مختلف NaCl، نشان داده شده است. با افزایش غلظت نمک، اثر دما بر فعالیت پولولاناز خالص شده نسبی مشهودتر است.

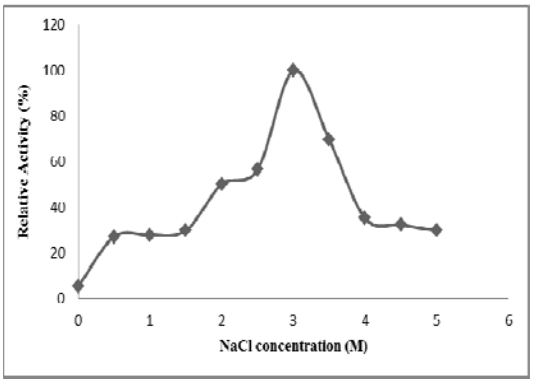
شکل ۴.(الف):



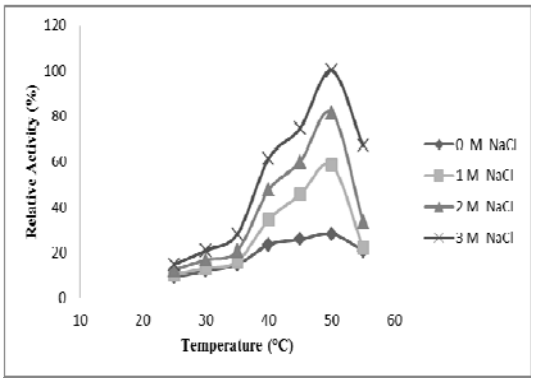
شکل.۴.(ب):



شکل.۴.(پ):



شکل .۴.(ت):



شکل ۴- اثر عوامل مختلف روی فعالیت آنزیم پولولاناز الف) اثر pH روی فعالیت پولولاناز در *Halorubrum* sp. سویه Ha25. فعالیت آنزیمی توسط سنجش استاندارد با استفاده از بافرهای مختلف اندازه‌گیری شد. فعالیت به صورت نسبی گزارش شده است و بیشینه فعالیت در pH ۸/۰، ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. ب) اثر دما روی فعالیت پولولاناز خالص شده نسبی. فعالیت به صورت نسبی گزارش شده است و بیشینه فعالیت در ۵۰°C ، ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. پ) اثر غلظتهای مختلف NaCl روی فعالیت آنزیم خالص شده نسبی. فعالیت برحسب سنجش استاندارد با غلظتهای NaCl از ۰/۰ تا ۵/۰ مولار اندازه‌گیری شده است. ت) اثر دماهای مختلف روی فعالیت پولولاناز خالص شده نسبی در غلظتهای مختلف NaCl. فعالیت بر حسب سنجش استاندارد تعیین شده است.

محصولات واکنش آنزیمی پولولاناز تخلیص شده نسبی:

پولولاناز، پولولان و نشاسته محلول را به مالتوتریوز و مالتواولیگوساکاریدهای بزرگتر می‌شکند (شکل ۵). همچنان که در شکل دیده می‌شود، آنزیم قادر به هیدرولیز مالتوتریوز نیست.

شکل ۵- الگوی فعالیت پولولاناز روی سوبستراهای مختلف. محصولات واکنش آنزیمی روی پولولان (خط ۱)، نشاسته محلول (خط ۲)، و مالتوتریوز (خط ۳) با استفاده از TLC مشخص شده‌اند. خط S نشانگر یک مخلوط استاندارد مالتواولیگوساکاریدها با گستره‌ای از گلوکز G۱ تا مالتوهپتائوز G۷ است.

بحث

میکروارگانیسم‌های نمک دوست افراطی، نمک دوست نسبی و تحمل‌کننده نمک اهمیت زیادی در زیست‌فن‌آوری دارند و کاربردهای آنها روز بروز در حال افزایش است. با توجه به اهمیت آنزیمهای هیدرولازی تولید شده توسط نمک‌دوست‌ها، تلاشهای متعددی در جهت جداسازی و شناسایی این آنزیمها صورت گرفته است (۱ و ۲). در این پژوهش، مشخص شد که تولید پولولاناز توسط سویه Ha25 در طول فاز لگاریتمی شروع شده و در فاز سکون، در چهارمین روز کشت، به بیشینه خود می‌رسد. سویه Ha25 قادر به تولید پولولاناز در محیط کشتهایی با منابع کربن متنوع است. آنچنان که در نتایج نشان داده شد، مالتوز بهترین و گلوکز نامناسب‌ترین منابع کربن برای تولید آنزیم هستند. ترشح آنزیم سویه Ha25 در حضور مالتوز القاء شده و این نمایانگر طبیعت القاءیی آنزیم است، در حالی که تولید آنزیم در هنگام رشد در محیط حاوی گلوکز و فروکتوز به عنوان تنها منبع کربن به شدت کاهش می‌یابد. مهار تولید آنزیم توسط گلوکز و سایر قندهای ساده در تولید پولولاناز و آمیلاز در *Micrococcus halobius* OR1، *Thermoanaerbacter thermohydrosulfuricus* و *Bacillus cereus* var. *mycoide* نیز گزارش شده است، با اینکه این میکروارگانیسم‌ها رشد بسیار خوبی روی این منابع کربنی دارند (۲۵، ۲۸ و ۲۹). از طرفی القاءی بیان پولولاناز توسط مالتوز در مورد پولولاناز باکتری *Rhodothermus marinus* نیز گزارش شده است. همچنان که در این پژوهش مشاهده شد، مالتوز در *Thermus hydrothermalis*، *T.profundus*، *thermosulfurogenes Clostridium* و *C. thermocellum* نیز القاءگر تولید آمیلاز و پولولاناز است. منابع کربنی مانند دکسترین، نشاسته و پولولان نیز تولید این آنزیم را القاء می‌کنند که مشابه این نتایج در مورد تولید پولولاناز *B. cereus* FDTA13 نیز به دست آمده است (۱۴، ۲۵، ۲۸، ۳۶ و ۳۷).

در میان منابع نیتروژن بررسی شده، ترکیب پپتون گوشت و عصاره گوشت ترشح پولولاناز را افزایش می‌دهند. این منابع به عنوان بهترین منبع نیتروژن برای ترشح پولولاناز در *B. cereus* var *mycoide* گزارش شده است و همچنین کاهش رشد و تولید در حضور منابع نیتروژن معدنی در سویه Ha25 مشابه *B.cereus* FDTA13 و *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 است. میزان نمک NaCl در محیط کشت به طور محسوسی ترشح پولولاناز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این سویه بیشینه تولید آنزیم را در محیط حاوی ۳/۵ مولار NaCl نشان داد، در حالی که توانایی تولید پولولاناز در حضور سایر نمکها را نشان نداد (۲۲، ۳۳ و ۳۶).

فعالیت بیشینه آنزیم در غلظت ۳ مولار NaCl در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۰ مشاهده شد. پولولاناز در pH های بالا فعالیت بیشتری را نشان داد ولی فعالیت پولولیتیک در pH ۹/۰ به شدت کاهش یافته طوری که تنها ۳۲ درصد فعالیت اولیه آن باقی ماند (شکل ۲). در دماهای بالاتر و پایین‌تر (۲۵ و ۵۵ درجه سانتی گراد)، به ترتیب ۸۵ درصد و ۳۳ درصد کاهش فعالیت آنزیم ردیابی شد. رفتار آمیلازهای *Natronococcus* sp، *Hfx. Mediterranei* و

پولولاناز *Thermoanaerbacter thermohydrosulfuricus* نیز در برابر عامل دما مشابه است (۲۱، ۲۵ و ۳۲).

فعالیت آنزمی پولولاناز با افزایش دما و غلظت NaCl افزایش می‌یابد، این رفتار در آمیلازهای *Micrococcus* sp. و *Halobacterium* sp. نیز مشاهده شده است. پولولاناز خالص شده از *Halorubrum* sp. سویه Ha25، پولولان و نشاسته محلول را به مالتوتریوز به عنوان محصول اصلی هیدرولیز می‌کند. بنابراین این آنزیم یک آمیلوپولولاناز است که توانایی شکستن پیوندهای (۴-۱) α و (۶- ۱) α را داراست. تاکنون تعداد اندکی از گلیکوزیل هیدرولازهایی که از نشاسته مالتوتریوز تولید می‌کنند، شناخته شده‌اند که آنزیمهای *Natronococcus* sp. Ah-36، *Streptomyces griseus* NA-468، *B. subtilis* و *M. imperial* از این قبیل هستند (۱۳، ۲۰ و ۲۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سویه Ha25 منبع بالقوه‌ای برای تولید پولولاناز نمک دوست افراطی و گرمادوست است، بنابراین آنزیم تولید شده در شرایط سخت چند عاملی مانند دمای بالا، شوری بالا و آب فعال کم می‌تواند از دیدگاه زیست‌فن‌آوری و تجاری ارزش داشته باشد.

منابع

۱. باباولیان ح، آموزگار م ح، پوربابایی ا ع (۱۳۸۸) شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده‌ی آنزیم-های هیدرولیتیک جداشده از دریاچه نمک آران و بیدگل. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۱، ۴۵- ۲۴

۲. زنجیربند م، کسری کرمانشاهی ر، گلبانگ ن (۱۳۸۸) جداسازی باکتریهای نمک دوست نسبی تولید کننده آنزیمهای هیدرولازخارج سلولی و تحمل کننده نمک و بررسی اثر غلظت نمک سدیم کلراید بر تولید آنزیم. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۳، ۴۹۷-۴۹۰

3. Amoozegar M.A., Malekzadeh F., Malik K. (2003) Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. Journal of Microbiological Methods, 52: 353-359.

4. Boone D.R., Castenhoiz R.W., Garrity G.M., (2001) Bergey's manual of systematic bacteriology: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria, 294–334.

5. Bradford M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.

6. Carol D. Litchfield, (2011) Potential for industrial products from the halophilic Archaea, Journal of industrial microbiology & biotechnology, 38:1635-1647.

7. Carroll J.O., Boyce C.O.L., Wong T.M., Starace C.A., (1987) Bread antistaling method. Patent application US4654216.

8. Crabb W.D., Mitchinson C., (1997) Enzymes involved in the processing of starch to sugars. Trends in Biotechnology, 15:349-352.

9. Demirjian D. C., Moris- Varas F., Cassidy C. S., (2001) Enzymes from extremophiles, Current Opinion in Chemical Biology, 5:144-151.

10. Dussault H., (1955) An improved technique for staining red halophilic bacteria. Journal of Bacteriology, 70 (4): p. 484.

11. Dyall-Smith M, (2009) The Halohandbook : Protocols for halobacterial genetics, P. 69.

12. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A., (2007) Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edn., p. 8089.

13. Good W.A., Hartman P.A., (1970) Properties of the Amylase from *Halobacterium halobium*, Journal of bacteriology, 104: 601-603.

14. Gomes I., Gomes J., Steiner W., (2003) Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization, Bioresource Technology, 90:207-214.

15. Grant W., et al., (2001) Class III. Halobacteria class. nov. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,: p. 294-301.

16. Gutiérrez and González C., (1972) Method for simultaneous detection of proteinase and

esterase activities in extremely halophilic bacteria. Applied Microbiology, 24(3): p. 516.

17. Henrissat B., (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochemical Journal, 280:309-316.

18. Hutcheon, G.W., Vasisht N., Bolhuis A., (2005) Characterisation of a highly stable amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. Extremophiles. 9(6): p. 487-495.

19. Kelkar, H.S., Deshpande, M., (1993) Purification and characterization of a pullulan-hydrolysing glucoamylase from *Sclerotium rolfsii*. Starch/Sta¨rke, 45:361-368.

20. Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 62:716–721.

21. Kobayashi T, Kanai H, Hayashi T, Akiba T, Akaboshi R, Horikoshi K , (1992) Haloalkaliphilic maltotriose-forming amylase from the archaebacterium *Natronococcus* sp. Strain Ah-36 Journal of bacteriology, 174:3439-3444.

22. Madern D., Ebel C., Zaccai G., (2000) Halophilic adaption of enzymes. Extremophiles, 4:91-98.

23. Makhdoumi Kakhki A., Amoozegar M. A., Mahmodi Khaledi E., (2011) Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake, International Journal of Environmental Science and Technology, 8(4): 705-714.

24. Mancinelli R.L., et al. (2009) *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt Baja California, Mexico,Western Australia and Naxos, Greece, international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59:1908-1913.

25. Melasneimi H, (1987) Effect of Carbon Source on Production of Thermostable a-Amylase, Pullulanase and α-Glucosidase by *Clostridium thermohydrosulfuricum*, Journal of General Microbiology, 133: 883-890.

26. Miller G., (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical chemistry, 31:426-8.

27. Mohaparta B.R., Baberjee U.C., Bapuji M., (1998) Characterization of a fungal amylase from Mucor sp. associated with the marine sponge Spirastrella sp. Journal of biotechnology, 60:113-117.

28. Nair S. U., Singhal R. S., Kamat M. Y., (2007) Induction of pullulanase production in Bacillus cereus FDTA-13, Bioresource Technology, 98: 856-859.

29. Onishi H., (1972) Halophilic Amylase from a Moderately Halophilic *Micrococcus*, Journal of bacteriology, 109: 570-574.

30. Oren A., Ventosa A., and Grant W., (1997) Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales.* International journal of systematic bacteriology, 47: p. 233.

31. Pastuska G. (1961) Untersuchungen uber die qualitative und quantitative Bestimmung der Zucker mit Hilfe der Kiesel-gelschicht-Chromatographie. Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, 179: 427-429.

32. Pérez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda-Egea F.C., Bonete M.J., (2003) Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. Extremophile 7:299-306.

33. Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K., (2009) Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant,thermostable, and alkali-stable a-amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101, Process Biochemistry, 44:210-215.

34. Rohban R., Amoozegar M. A., Ventosa A., (2009) Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36: 333-340.

35. Shafiei M., Ziaee A., Amoozegar, M. A., (2011) Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic a-amylase from the moderately halophilic Nesterenkonia sp. strain F. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 38:275-281.

36. Subhash U. Nair, Rekha S. Singhal, Madhusudan Y. Kamat (2006) Enhanced Production of Thermostable Pullulanase Type 1 Using *Bacillus cereus* FDTA 13 and Its Mutant, Food technology and Biotechnology, 44:275–282.

37. Sudharhsan S., Senthilkumar S., (2007) Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *bacillus* isolated

from spoiled food waste, African Journal of Biotechnology. 6: 430-435.

38. Takata H., Kuriki T., Okada S., Takesada Y., Iizuka M., Imanaka,T., (1992) Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(14) and alpha-(16) glucosidic linkages Journal of Biological Chemistry, 267: 18447-18452.

39. Wainø M., Ingvorsen K., (2003) Production of β-xylanase and β-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*, Extremophiles, 7: 87-93.

Production of an extracellular halophilic Pullulanase By *Halorubrum* sp. Strain Ha25 Isolated From Aran- Bidgol Lake

Fazeli M.[1]; Amoozegar M.A.[1]; Habibi Rezaei M.[2] and Siroosi M.[1]

Extremophiles Laboratory, Microbiology Dept., School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Protein Biotechnology Laboratory, Cell and Molecular Biology Dept., School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

The industrial application of enzymes which can withstand in harsh condition such as high salinity and temperature has greatly increased. An extracellular halophilic and moderately thermophilic pullulanase was produced by a newly isolated extreme haloarchaeal strain designated as *Halorubrum* Ha25 in culture medium with 23% of total salt. The enzyme production corresponded with growth. The isolate was capable of producing pullulanase in the presence of NaCl and the maximum enzyme production was observed at 3-4 M NaCl (85 U ml^{-1}). Optimum pH and temperature for enzyme production were 7.0 and 45 °C, respectively. Various carbon sources including maltose, starch and pullulan were induced enzyme production, while glucose repressed it. No cell growth and enzyme production were observed in the lack of Mg^{2+} and the optimum concentration was 0.1 M. The maximum pullulanase activity was obtained in the medium containing 3 M NaCl at 50 °C, with 25% and 72% activity reductions at temperature 45 and 35°C, respectively. The optimum pH for activity of the enzyme was 8.0, with 49.5% and 32.4% residual activities at pH 6.0 and 9.0, respectively.

Keywords: pullulanase production, extreme halophilic archaea, *Halorubrum*,pullulan