فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۵۲- ۱۴۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲

پروتئین‌زدایی میکروبی ضایعات پوسته میگوی *پنئوس مرگوئنسیس* با هدف جداسازی کیتین

فاطمه صداقت: کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشگاه هرمزگان، ایران، fatemehsedaghat5@gmail.com
مرتضی یوسف زادی *: دانشیار زیست‌شناسی، دانشگاه هرمزگان، ایران، morteza110110@gmail.com
حجت تویسرکانی: دانشیار شیمی، دانشگاه هرمزگان، ایران، toiserkani@yahoo.com
سهراب نجفی‌پور: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، ایران، sohrabnajafipour@yahoo.com

چکیده

مقدمه: کیتین، بعد از سلولز فراوان‌ترین پلیمر زیستی در طبیعت است. مهم‌ترین مشتق کیتین، کیتوزان نام دارد که از داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید. منابع عمده کیتین، پوسته سخت‌پوستان دریایی مثل خرچنگ، میگو و کریل است. استخراج کیتین از پوسته میگو می‌تواند به طور شیمیایی یا با روش‌های بیولوژیکی انجام شود. تخمیر میکروبی به عنوان یک روش سازگار با محیط زیست، جایگزین مناسبی برای فرایندهای شیمیایی و آنزیمی است. در این مطالعه اثر سه گونه باکتری تولیدکننده پروتئاز (*سودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسسنس، باسیلوس پومیلوس*)، روی بازده پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات میگوی *پنئوس مرگوئنسیس* بررسی شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدان هیدرولیزیت به‌دست‌آمده در طول فرایند تخمیر سنجش شد.

مواد و روش‌ها: به منظور پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات میگوی تحت تیمار باکتری‌ها، شرایط گرماگذاری به مدت شش روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه انجام پذیرفت.

نتایج: آنالیز آماری داده‌ها، اختلاف معنی‌داری بین درصد معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی در گونه‌های مختلف باکتری نشان داد ($p < ۰/۰۵$)؛ به طوری‌که بیشترین درصد پروتئین‌زدایی (۷۴/۷۶درصد) و معدنی‌زدایی (۷۸/۴۶درصد) در تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین میزان در تیمار *سراشیا مارسسنس* مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدان هیدرولیزیت مختلف نیز تفاوت معنی‌داری نشان داد. بیشترین قدرت احیایی در حجم ۴۰۰ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *سراشیا مارسسنس* و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در حجم ۱۰۰ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *باسیلوس پومیلوس* مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به سویه‌های دیگر، توانایی بالاتری در حذف مواد معدنی و پروتئین از ضایعات میگو دارد. بنابراین استفاده از این باکتری برای پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات سخت پوستان دریایی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کیتین، پوسته میگو، تخمیر میکروبی، پروتئین‌زدایی، معدنی‌زدایی، *سودوموناس آئروژینوزا*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

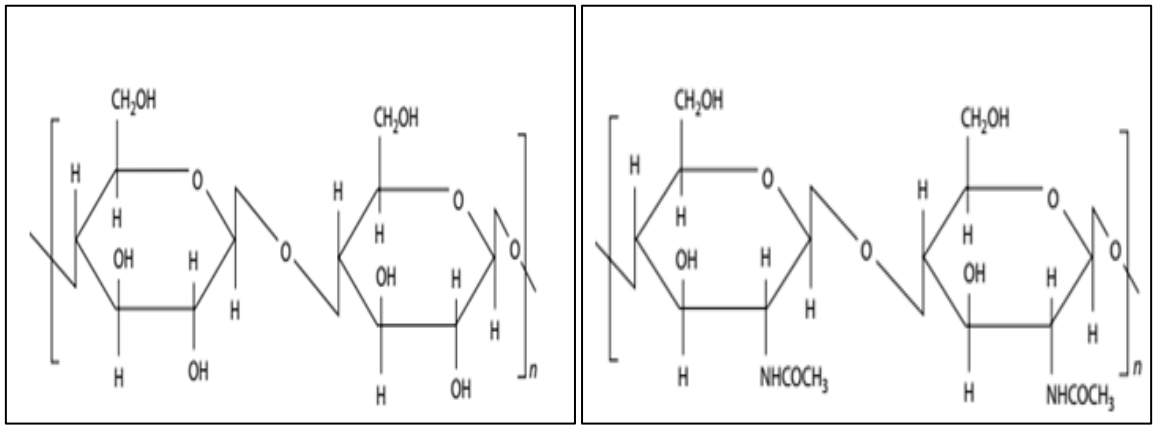
کیتین برگرفته از واژه یونانی کیتون[1] به معنی پوشش سخت‌پوستان است. این ماده پلی‌ساکاریدی طبیعی است که به‌طور عمده در اسکلت خارجی سخت‌پوستان، دیواره سلولی قارچ‌ها، حشرات و دیاتومه‌ها یافت می‌شود (۱ و ۲). کیتین را می‌توان به عنوان سلولزی که یک گروه هیدروکسیل در کربن شماره دو آن با یک گروه استامید جایگزین شده است، توصیف کرد (شکل۱). این پلیمر دارای عملکردی مشابه با سلولز در گیاهان و کلاژن در جانوران است. سلولز و کیتین هر دو پلی ساکاریدهایی هستند که نقش حفاظتی را به ترتیب برای گیاهان و جانوران ایفا می‌کنند، به‌طوری که گیاهان سلولز را در دیواره سلولی و حشرات و سخت‌پوستان کیتین را در پوسته خود تولید می‌کنند (۳ و ۴).

کیتین را بسیاری از ارگانیسم‌ها، به‌عنوان یک پلی ساکارید ساختاری سنتز می‌کنند. ارگانیسم‌های دریایی مثل میگو، خرچنگ، لابستر و کریل در مقایسه با ارگانیسم‌های خشکی‌زی مثل حشرات و قارچ‌ها، منبع غنی‌تری از کیتین می‌باشند(۱ و ۵). کیتین به دلیل زیست‌سازگاری، زیست‌تجزیه‌پذیری و فعالیت ضدباکتری، به طور وسیعی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی، کشاورزی، تصفیه فاضلاب، پزشکی و... استفاده می‌شود (۶).

براساس مقدار تولید سالیانه، کیتین، دومین پلیمر طبیعی فراوان بعد از سلولز است (۷ و ۸). درحال حاضر پوسته میگو، خرچنگ و کریل از منابع اصلی برای استخراج این پلیمر با توجیه اقتصادی هستند (۴).
تقریباً ۴۸-۴۵ درصد وزن میگو بسته به گونه، به عنوان ضایعات، دورریز می‌شود که شامل سر، پوسته و دم می‌باشد (۹). استخراج کیتین از ضایعات میگو می‌تواند به روش شیمیایی، آنزیمی و یا میکروبیولوژیکی انجام شود (۱۰ و ۱۱). روش شیمیایی شامل پروتئین‌زدایی[2] و معدنی‌زدایی[3] با استفاده از اسیدها و بازهای قوی است؛ اما استفاده از این مواد شیمیایی به طور جدی محیط زیست را آلوده می‌کند و برای سلامتی انسان مضر است. علاوه براین، استفاده از اسید و باز موجب هیدرولیز پلیمر شده و به خصوصیات فیزیکی نامناسب در محصول نهایی منجر می‌شود. در روش آنزیمی، استخراج کیتین با استفاده از آنزیم‌هایی مثل آلکالاز، تریپسین، پاپایین و پپسین صورت می‌گیرد، که هزینه بر بودن و استخراج کم‌بازده، برخی از اشکالات این روش می‌باشد (۱۱).

اخیراً توجه زیادی به استفاده از پروتئاز، کیتیناز و لاکتیک اسید تولیدشده بوسیله تخمیر میکروبی، جهت استخراج کیتین شده است؛ چون این روش، یک روش نسبتاً ساده و ارزان است و از داستیلاسیون ناخواسته و کاهش وزن مولکولی که به وسیله اسید و باز قوی ایجاد می‌شود نیز جلوگیری می‌کند (۱۰). *لاکتو باسیلوس پلانتاروم*[4]، *باسیلوس سوبتیلیس*[5]، *لاکتو باسیلوس پاراکازئی*[6]، *سودوموناس مالتوفیلیا*[7] و... از جمله گونه‌های میکروبی مطالعه‌شده می‌باشند (۱۲).

نظر به این امر در این مطالعه اثر سه گونه باکتری تولیدکننده پروتئاز (*سودوموناس آئروژینوزا*[8]، *سراشیا مارسسنس*[9]، *باسیلوس پومیلوس*[10]) بر بازده پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات میگوی *پنئوس مرگوئنسیس*[11] بررسی شد. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدان هیدرولیت به‌دست‌آمده در طول فرایند تخمیر با تکنیک‌های قدرت احیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل محاسبه شد.



(ب) **(الف)**

شکل۱- ساختار کیتین (الف) و سلولز (ب) (۱۳)

مواد و روش‌ها

شیمی مواد: تمامی مواد استفاده‌شده در این پژوهش از شرکت مرک[۱۲] آلمان تهیه شد.

آماده‌کردن نمونه: از ضایعات سر و کاراپاس میگوی *پنئوس مرگوئنسیس*، گونه غالب صیدشده در استان هرمزگان و شهر بندرعباس، به‌عنوان نمونه استفاده شد. ضایعات میگو به‌صورت دستی از گوشت جدا و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد و بعد از شست‌وشو با آب مقطر، به مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. سپس پوسته‌ها خردشده و در اندازه ۸ تا ۱۰ میلی‌متر جهت انجام فرایند پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی آماده شد.

سویه های باکتریایی: عملکرد سه سویه باکتری تولیدکننده پروتئاز، شامل *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 85327)، *سراشیا مارسسنس* (ATCC 29737)، *باسیلوس پومیلوس* (PTCC 1274)، در تخمیر محیط کشت حاوی پوسته‌های میگو بررسی شد. باکتری‌های استفاده‌شده در این پژوهش از مؤسسه پاستور تهران تهیه شدند.

آماده سازی محیط کشت: محیط کشت مولر هینتون آگار شامل (گرم در لیتر): عصاره گوشت ۲، کازآمینواسیدها ۱۷/۵، نشاسته ۱/۵ و آگار ۱۵، به‌میزان ۳۶ گرم در لیتر آب مقطر و محیط کشت مولر هینتون براث به میزان ۲۱ گرم در لیتر آب مقطر تهیه شد. pH محیط در دمای اتاق، ۷/۲ تا ۷/۴ است.

کشت باکتریایی و تخمیر در فلاسک: از سه سویه باکتری با روش خطی پلیت تهیه شد. در شرایط کاملاً استریل از پلیت کشت باکتری، تک کلونی برداشته شد و در لوله‌های حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مولرهینتون کشت داده شد. لوله‌ها به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا باکتری رشد کند. بعد از گذشت ۴ ساعت، کدورت محیط حاوی باکتری با استاندارد مک فارلند نیم[۱۳] (تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد کلونی باکتری در میلی لیتر) سنجش شد. جهت انجام فرایند تخمیر، مقدار ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری، به ارلن ۱۰۰میلی لیتری حاوی ۱۰درصد گلوکز و ۵ درصد پوسته میگو اضافه شد و به‌مدت ۶ روز در انکوباتور شیکر (۱۰۰ rpm) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس فاز جامد جدا و

بعد از شست‌وشو با آب مقطر به‌مدت ۲۴ ساعت در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود (۱۰ و ۱۲). فاز مایع در ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

تعیین وزن خشک و درصد خاکستر: وزن خشک نمونه باقی‌مانده، بعد از قراردادن نمونه در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت محاسبه شد (۶).

برای تعیین درصد خاکستر، یک گرم نمونه (کیتین و پوسته میگو)، به بوته چینی منتقل و در کوره‌ای به دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت گرما داده شد (۱۴).

سنجش محتوی پروتئین: برای اندازه گیری مقدار پروتئین در نمونه (کیتین و پوسته میگو)، به نمونه (۰/۰۵گرم) سدیم هیدروکسید ۵ درصد اضافه شد (۱۰ میلی‌لیتر) و به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۵). از محلول رویی برای سنجش پروتئین با استفاده از روش برادفورد[۱۴] استفاده گردید (۱۶). میزان پروتئین با سرم آلبومین گاوی مقایسه شد.

تعیین درصد معدنی زدایی و پروتئین زدایی: درصد معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی (Y) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$Y(\%) = \frac{[(X_0 \times S_0) - (X_R \times S_R)]}{(X_0 \times S_R)} \times 100$$

که X_0 و X_R به ترتیب مقدار پروتئین یا خاکستر (گرم/ گرم) قبل و بعد از فرایند تخمیر و S_0 و S_R مقدار نمونه اولیه و نمونه باقی‌مانده (گرم) بعد از تخمیر می‌باشند (۱۷).

سنجش فعالیت پروتئازی: فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای آزوکازئین بررسی شد. در یک لوله آزمایش، مقدار ۴۵۰ میکرولیتر آزوکازئین ۱درصد حل‌شده در بافر فسفات (pH= ۷) با ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی (فاز رویی بعد از تخمیر باکتری) ترکیب شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت. سپس با اضافه کردن ۲۵۰ میکرولیتر محلول تری کلرو استیک اسید، واکنش متوقف شد. بعد از ۱۵ دقیقه، مخلوط واکنش در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول رویی (حاوی اسیدهای آمینه هیدرولیزشده سوبسترای آزوکازئین) با ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم هیدروکسید یک نرمال ترکیب و جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر سنجش شد (۱۲). منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های ۱۲-۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیروزین ترسیم شد. بیشترین فعالیت آنزیمی به‌دست‌آمده، ۱۰۰درصد در نظر گرفته شده و میزان فعالیت در دیگر سویه های باکتریایی نسبت به آن سنجیده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدان هیدرولیزیت

سنجش قدرت احیاکنندگی: توانایی هیدرولیزیت برای احیاء یون‌های آهن سه‌ظرفیتی با این آزمون ارزیابی شد. حجم های مختلفی از هیدرولیزیت (۴۰۰-۲۵ میکرولیتر)، با یک میلی لیتر بافر فسفات (pH= ۷) و یک میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱درصد مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۱۹۲۰ میکرولیتر از هر حجم برداشته شد و با یک میلی‌لیتر تری کلرواستیک‌اسید ۱۰درصد (وزنی: حجمی)، یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر کلرورفریک ۰/۱درصد ترکیب شد. بعد از ده دقیقه جذب نمونه ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۸).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل[۱۵]: تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت باکتری، مطابق با روش میتسودا[۱۶] و همکاران صورت گرفت (۱۹). بدین صورت که ۷/۴۵ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید (۰/۶ مولار) با ۰/۹۹ گرم سدیم‌سولفات (۲۸ میلی‌مولار) و ۱/۲۳گرم آمونیوم مولیبدات (۴ میلی‌مولار) ترکیب، با آب مقطر به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده و به‌عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نظر گرفته شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از حجم‌های مختلف هیدرولیزیت (۱۰۰- ۱۲/۵ میکرولیتر) با یک میلی‌لیتر TAC مخلوط شد و بعد از ۱۵ دقیقه جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس نگارش ۱۹[۱۷] و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۹۵درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار مایکروسافت آفیس اکسل ۲۰۱۰[۱۸] استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های به‌دست‌آمده، اختلاف معنی‌داری بین میزان خاکستر در نمونه‌های تیمار با نمونه شاهد نشان داد ($p < ۰/۰۵$)؛ به طوری‌که میزان خاکستر در نمونه‌های تیمار به مراتب کمتر بود. کمترین میزان خاکستر (۱/۲ گرم) در تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* و بیشترین میزان (۲/۳ گرم) در نمونه شاهد مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین وزن خشک باقی‌مانده و نیز میزان پروتئین در نمونه‌های تیمار با نمونه شاهد مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$)؛ به طوری‌که کمترین میزان پروتئین و وزن خشک باقی‌مانده مربوط به تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* و بیشترین میزان مربوط به نمونه شاهد بود. بررسی میزان فعالیت پروتئازی نیز نشان داد که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* دارای بیشترین فعالیت پروتئازی (۱۰۰درصد) و باکتری *سراشیا مارسسنس* دارای کمترین میزان این فعالیت (۵۷درصد) است (جدول۱). این سنجش آنزیمی تنها می‌تواند نشان‌دهنده قدرت برتر *سو دو موناس آئروژینوزا* در تولید آنزیم در یک زمان مشخص از کشت باشد؛ اما امکان دارد سویه‌های دیگر استفاده‌شده در بقیه ساعات کشت، آنزیم بیشتری تولید کنند.

معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی: هر سه سویه باکتری، قادر به حذف پروتئین و مواد معدنی از ضایعات میگو بودند. آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین درصد معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی در گونه‌های مختلف باکتری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). بیشترین درصد پروتئین‌زدایی (۷۴/۷۶درصد) و معدنی‌زدایی (۷۸/۴۶درصد) در تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین میزان در تیمار *سراشیا مارسسنس* مشاهده شد (شکل۲).

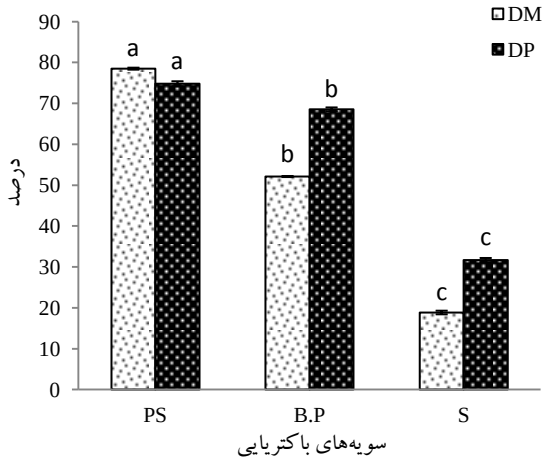
جدول۱- میانگین وزن خشک، خاکستر و پروتئین در نمونه شاهد و تیمار.

تیمار	وزن خشک (گرم)	خاکستر (گرم)	پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	فعالیت پروتئازی (درصد)
شاهد	۵/۰۳±۰/۰۳[a]	۲/۳±۰/۰۱[a]	۳۲/۹±۰/۵۵[a]	-
سودوموناس آئروژینوزا	۳/۳۶±۰/۱۵[c]	۱/۲±۰/۰۴[c]	۱۷/۴±۰/۳۱[b]	۱۰۰
سراشیا مارسسنس	۴/۴۶±۰/۰۴[b]	۲/۱۵±۰/۰۳[a]	۲۸/۲±۰/۰۹[a]	۵۷
باسیلوس پومیلوس	۳/۶۵±۰/۳۱[c]	۱/۹۵±۰/۰۳[b]	۱۹±۰/۱۶[b]	۸۴

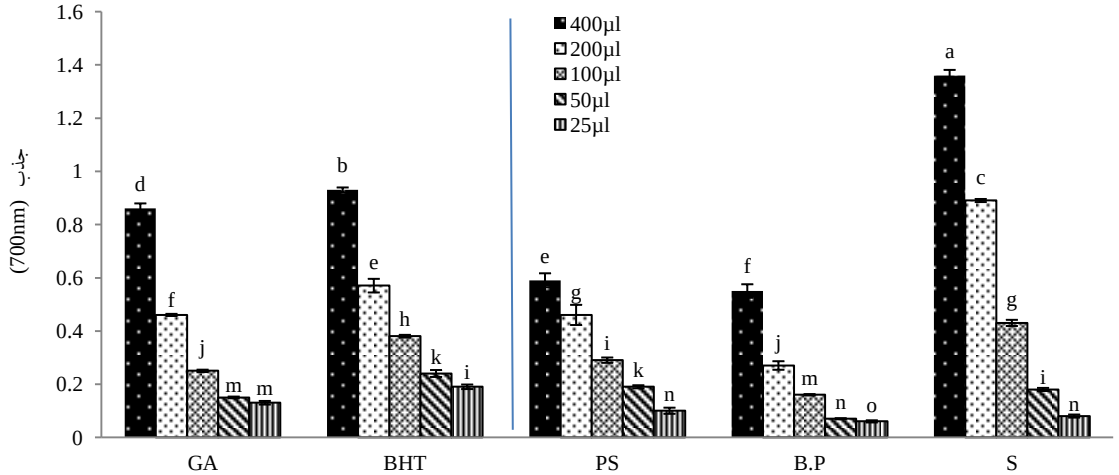
حروف یکسان، نبودِ اختلاف معنی‌دار و حروف نایکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به دو سویه باکتریایی دیگر، توانایی بالاتری در حذف پروتئین و مواد معدنی از ضایعات میگو دارد.

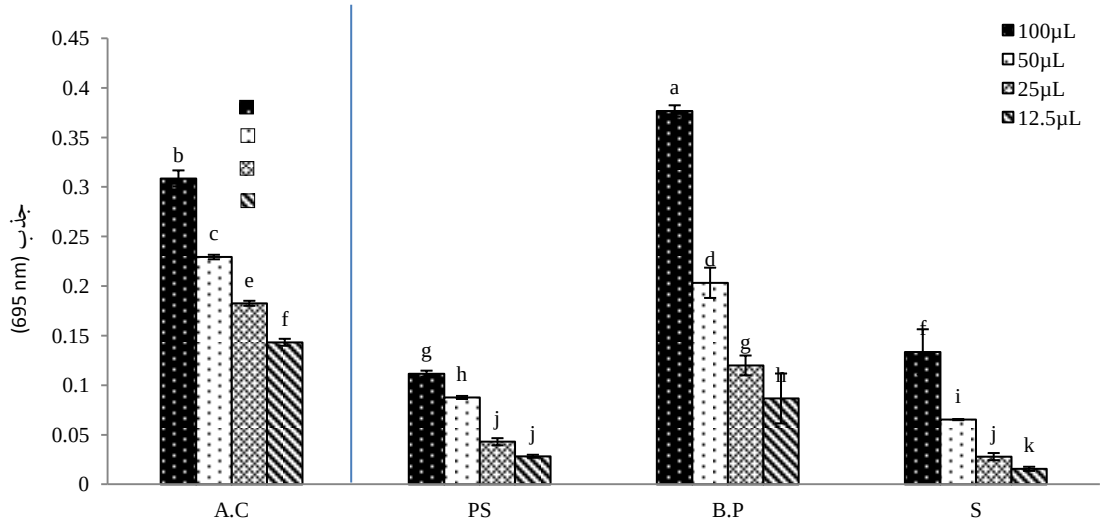
قدرت احیاکنندگی: نتایج آنالیز واریانس یک طرفه حاصل از بررسی توانایی هیدرولیزیت برای احیاء آهن سه‌ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دوظرفیتی، اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاکنندگی هیدرولیزیت به‌دست‌آمده در طول فرایند تخمیر در هر سه باکتری نشان داد ($p < ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که افزایش حجم هیدرولیزیت تأثیر معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بر قدرت احیاکنندگی دارد، به‌طوری‌که با افزایش حجم، قدرت احیاکنندگی افزایش می‌یابد. بیشترین قدرت احیاکنندگی در حجم ۴۰۰ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *سراشیا مارسسنس* و کمترین قدرت احیاکنندگی در حجم ۲۵ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *باسیلوس پومیلوس* مشاهده شد (شکل۳). هیدرولیزیت باکتری *سراشیا مارسسنس* در اکثر حجم‌ها، قدرت احیاکنندگی برابر یا بیشتر با غلظت‌های مشابه در استانداردهای گالیک اسید[۱۹] و بوتیل هیدروکسی تولوئن[۲۰] نشان داد.



شکل۲- درصد معدنی‌زدایی (DM) و پروتئین‌زدایی (DP)، درتیمارهای *سودوموناس آئروژینوزا (PS)*، *سراشیا مارسسنس (S)* و *باسیلوس پومیلوس (BP)*. حروف یکسان، نبودِ اختلاف معنی‌دار و حروف نایکسان، اختلاف معنی دار بین میانگین این پارامترها را در سویه‌های باکتریایی موردِ مطالعه مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.



شکل۳- قدرت احیایی هیدرولیزیت *سودوموناس آئروژینوزا (PS)*، *سراشیا مارسسنس (S)* و *باسیلوس پومیلوس (BP)* در مقایسه با استاندارد گالیک اسید (GA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT). حروف یکسان، نبودِ اختلاف معنی‌دار و حروف نایکسان، اختلاف معنی‌دار بین قدرت احیایی هیدرولیزیت حاصل از تخمیر سویه‌های باکتریایی موردِ مطالعه و استانداردهای گالیک اسید و بوتیل هیدروکسی تولوئن را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.



شکل ۴- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت *سودوموناس آئروژینوزا (PS)*، *سراشیا مارسسنس (S)* و *باسیلوس پومیلوس (BP)* در مقایسه با استاندارد اسیدآسکوربیک (A.C). حروف یکسان، نبودِ اختلاف معنی‌دار و حروف نایکسان، اختلاف معنی‌دار بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت حاصل از تخمیر سویه‌های باکتریایی مطالعه شده و استاندارد اسید آسکوربیک را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت حاصل از تخمیر هر سه باکتری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در حجم ۱۰۰ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *باسیلوس پومیلوس* و کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *سراشیا مارسسنس* مشاهده شد (شکل۴). در تمامی باکتری‌های آزمایش شده، با افزایش حجم هیدرولیزیت، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافته است. همچنین نتایج نشان می‌دهند که از بین باکتری‌های آزمایش‌شده، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت باکتری *باسیلوس پومیلوس*، در اکثر حجم‌ها بیشتر یا برابر با غلظت‌های مشابه در استاندارد اسیدآسکوربیک[۲۱] است.

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد تجدیدپذیر برای تولید ترکیبات زیستی با ارزش و همچنین کاهش ترکیبات دورریز، به یک چالش در پژوهش های اخیر تبدیل شده است. سالانه حدود ۷۰-۴۰ درصد سخت‌پوستان دریایی (میگو و خرچنگ) صیدشده، تبدیل به ضایعات می‌شوند که حدود ۳۰-۲۰ درصد اسکلت خارجی این سخت‌پوستان کیتین است (۲۰ و ۲۱). استخراج کیتین شامل دو مرحله پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی است که می‌تواند به طور شیمیایی یا با روش‌های بیولوژیکی انجام شود (۷). در حال حاضر، کاربرد میکروارگانیسم‌ها برای پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات سخت‌پوستان دریایی، به عنوان یک روش متداول در تبدیل ضایعات به مواد زیستی فعال، مطرح است. این روش به عنوان یک روش ساده و سازگار با محیط زیست، جایگزین مناسبی برای فرایندهای شیمیایی به‌کارگرفته شده در روند استخراج کیتین، است (۱۰). در این مطالعه از

ضایعات میگوی *پنئوس مرگوئنسیس*، گونه میگوی غالب صیدشده در استان هرمزگان، جهت استخراج کیتین استفاده شد.

قوربل- بلاج[۲۲] و همکاران، مقدار پروتئین و مواد معدنی موجود در ضایعات میگوی *متاپنائوس مونوسروس*[۲۳] را به ترتیب ۲۴/۹ و ۴۶/۱ درصد گزارش کردند (۱۰). در مطالعه دیگری که چوریت[۲۴] و همکاران بر روی ضایعات میگوی *لیتوپنائوس وانامی*[۲۵] انجام دادند؛ مقدار پروتئین و مواد معدنی به ترتیب ۲۸/۴۸ و ۴۲/۷ درصد گزارش شد (۲۲). در مطالعه حاضر، آنالیز شیمیایی ضایعات میگوی *پنئوس مرگوئنسیس* مقدار پروتئین و مواد معدنی موجود در این ضایعات را به ترتیب ۳۲/۹ و ۴۶ درصد نشان داد. به طورکلی می‌توان گفت تفاوت‌های تقریبی مشاهده شده در ترکیب پوسته‌های میگو، به دلیل تفاوت در نوع گونه، مرحله فیزیولوژیکی ارگانیسم، فصل برداشت و موقعیت جغرافیایی است (۹).

در مطالعه حاضر، سه سویه باکتریایی برای تخمیر پوسته‌های میگو به منظور جداسازی کیتین بررسی شدند. بیشترین درصد معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی در تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین میزان در تیمار *سراشیا مارسسنس* مشاهده شد (شکل۲).

اه[۲۶] و همکاران از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* برای معدنی‌زدایی ضایعات خرچنگ استفاده کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که در دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد میزان پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی به ترتیب ۶۳ و ۹۲ درصد است (۱۲)؛ بنابراین، نتایج این پژوهش و پژوهش حاضر نشان می‌دهد که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توانایی بیشتری در حذف مواد معدنی نسبت به حذف پروتئین دارد.

قوربل- بلاج و همکاران، عملکرد شش گونه باکتری تولیدکننده پروتئاز را در تخمیر ضایعات میگو مطالعه کردند (۱۰). نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که باکتری *باسیلوس پومیلوس* با حداکثر فعالیت پروتئازی دارای کمترین میزان پروتئین‌زدایی است. اما در پژوهش حاضر بین فعالیت پروتئازی و میزان پروتئین‌زدایی ارتباط مستقیمی مشاهده شد؛ به طوری‌که بیشترین فعالیت پروتئازی در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده شد (جدول ۱) که این باکتری بیشترین میزان پروتئین‌زدایی را نیز نشان داد.

استفاده از *سراشیا مارسسنس* برای پروتئین‌زدایی ضایعات خرچنگ بوسیله جو[۲۷] و همکاران مورد مطالعه قرارگرفت(۲۳). حدود ۸۴ درصد پروتئین و ۵۰ درصد مواد معدنی بعد از هفت روز تخمیر از ضایعات خارج شد. این نتایج نشان داد پروتئازی که باکتری *سراشیا مارسسنس* تولید کرده، می‌تواند به طور مؤثری برای پروتئین‌زدایی ضایعات خرچنگ استفاده شود. نتایج پژوهش حاضر نیز مؤید توانایی بیشتر این باکتری در حذف پروتئین نسبت به مواد معدنی است.

به طورکلی تخمیر پوسته‌های میگو در محیط شامل قند و باکتری، باعث تشکیل لاکتیک اسید می‌شود، این اسید با کلسیم کربنات، ماده معدنی اصلی در پوسته‌های میگو واکنش می دهد و منجر به تشکیل کلسیم لاکتات می‌شود که رسوب می‌کند و با شست‌وشو از محیط حذف می‌شود (۲۴). بالاتر بودن درصد معدنی‌زدایی در تیمار *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به تیمارهای دیگر احتمالاً به دلیل تولید بیشتر لاکتیک اسید در محیط حاوی این باکتری است.

پروتئین‌زدایی ضایعات میگو که یک مرحله کلیدی در تولید کیتین است، اساساً به‌وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها و

همچنین به‌وسیله پروتئاز موجود در ضایعات صورت می‌گیرد (۱۲). در این پژوهش، بیشترین فعالیت پروتئازی در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مشاهده شد که احتمالاً این عامل منجر به حذف بیشتر پروتئین در تیمار این باکتری بوده است.

به دلیل پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی، مقدار پروتئین و مواد معدنی در نمونه باقی‌مانده کاهش می‌یابد و محلول رویی غنی از مواد زیستی فعالی چون پپتیدها، اسیدهای آمینه ،کیتو اولیگو ساکاریدها و... می‌شود (۱۰).

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که واکنش‌های اکسیداتیو را به‌وسیله مهار رادیکال‌های آزاد در سلول‌های بدن کاهش می‌دهند و بنابراین یک نقش مهم در سلامتی انسان ایفا می‌کنند (۲۵ و ۲۶). به‌دلیل نگرانی درباره سمیت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، در دهه گذشته جستجو برای یافتن ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی افزایش یافته است (۲۷). به همین منظور و برای استفاده بیشتر از ضایعات میگو، در مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدان محلول رویی حاصل از تخمیر با استفاده از سه سویه باکتریایی، با تکنیک‌های قدرت احیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، سنجش شد. نتایج نشان داد که قدرت احیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزیت مختلف با افزایش حجم افزایش می یابد؛ به طوری‌که بالاترین قدرت احیاکنندگی در حجم ۴۰۰ میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *سراشیا مارسسنس* و بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در حجم ۱۰۰میکرولیتر هیدرولیزیت باکتری *باسیلوس پومیلوس* مشاهده شد (شکل ۳ و ۴). نتایج مطالعات پیشین نیز مؤید خواص آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزیت حاصل از تخمیر است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزیت به‌دست‌آمده در طول فرایند تخمیر ضایعات میگو توسط شش گونه باکتری *باسیلوس* را قوربل- بلاج و همکاران مطالعه کردند. نتایج حاصل از سنجش قدرت احیایی نشان داد که با افزایش غلظت هیدرولیزیت، قدرت احیایی افزایش می‌یابد که این امر با نتایج مطالعه حاضر هم‌سو است. در مطالعه ایشان، بیشترین قدرت احیایی در هیدرولیزیت تولید شده توسط باکتری *باسیلوس پومیلوس* مشاهده شد (۱۰).

سنجش قدرت احیایی، اغلب برای ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدان به اهدای الکترون یا هیدروژن است (۱۸). قدرت احیایی محلول رویی حاصل از تخمیر ضایعات میگو، احتمالاً به‌دلیل حضور ترکیبات زیستی فعالی چون فنول‌ها، اولیگو پپتیدها و یا کیتو اولیگو ساکاریدها است. این ترکیبات دارای توان اهدا کنندگی زیادی برای الکترون هستند و می‌توانند واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی را به‌وسیله تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی با پایداری بیشتر متوقف کنند (۱۰). بنابراین، بیشتر بودن قدرت احیایی نشان‌دهنده توانایی بیشتر آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال‌های آزاد است و به عنوان یک مزیت محسوب می‌شود.

بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه و همچنین گزارش‌های پیشین (۱۲ و ۲۸) به دلیل توانایی زیاد باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در حذف پروتئین و مواد معدنی، استفاده از این باکتری برای پروتئین زدایی و معدنی زدایی ضایعات سخت‌پوستان دریایی پیشنهاد می‌شود. این باکتری که یک باکتری گرم منفی است، پتانسیل فراوانی نیز برای کاربردهای زیست‌فناوری و زیست‌محیطی دارد (۲۹). همچنین نظر به خواص آنتی‌اکسیدانی محلول رویی حاصل از تخمیر باکتری‌ها، امید است خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در محلول رویی در مطالعات بعدی ارزیابی شود.

References

(1) Du Y., Zhao Y., Dai Sh., Yang B. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2009; 10 (1): 103- 7.

(2) Venugopal V. *Marine products for healthcare*: *Functional and Bioactive Natraceutical Compounds from the Ocean*. New York: CRC Press; 2009.

(3) Muzzarelli R.A.A., Jeuniaux C., Gooday G.W. *Chitin in nature and technology*. New York: Plenum; 1986. p. 385.

(4) Pillai C., Paul W., Sharma C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 2009; 34 (7): 641-78.

(5) Venugopal V. *Marine polysaccharides: Food Applications*. New York: CRC Press; 2011.

(6) Jung W.J., Jo G.H., Kuk J.H., Kim Y.J., Oh KT., Park R.D. Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydrate polymers* 2007; 68 (4): 746-50.

(7) Arbia W., Arbia L., dour L., Amrane A. Chitin Extraction from Crustacean Shells using biological Methods – A Review. *Food Technology Biotechnology* 2013; 51(1): 12-25.

(8) Jayakumar R., Prabaharan M., Nair S.V., Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N. Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science* 2010; 55 (7): 675- 709.

(9) Ghorbel-Bellaaj O., Hajji S., Younes I., Chaabouni M., Nasri M., Jellouli K. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A_1 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013; 61(10): 243- 50.

(10) Ghorbel- Bellaaj O., Younes I., Maalej H., Hajji S., Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus bacteria*. *International journal of Biological Macromolecules* 2012; 51(5): 1196- 201.

(11) Zhang H., Jin Y., Deng Y.,Wang D., Zhao Y. Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. *Carbohydrate Research* 2012; 362 (4): 13-20.

(12) Oh K.T., Kim Y.J., Nguyen V.N., Jung W.J., Park R.D. Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Process Biochemistry* 2007; 42 (7): 1069- 74.

(13) Ravi Kumar M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers* 2000; 46 (1): 1- 27.

(14) A.A.O.C. *Official methods of analysis: Association of official analytical chemists*.13th ed. Washington, DC: 1990. p. 1094.

(15) Setoguchi T., Kato T., Yamamoto K., Kadokawa J.-i. Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid. *International Journal of Biological macromolecules* 2012; 50 (3): 861- 64.

(16) Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram method Quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Analytical Biochemistry 1*976; 72 (1-2): 248- 54.

(17) Pacheco N., Garnica-Gonzalez M., Ramirez-Hernandez J.Y., Flores- Albino B., Gimeno M., Barzana E., et al. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology* 2009; 100 (11): 2849- 54.

(18) Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 2*001; 49 (8): 4083-9.

(19) Mitsuda H., Yuasumoto K., Iwami J. Antioxidation action of indole compounds during the autooxidation of linoleic acid. *Eiyo to shokuryo* 1996; 19 (3): 210- 14.

(20) Bolat Y., Sengul B., Ali G., Levent L., Seval B.K., Soner C., et al. Chitin-chitosan yield of freshwater crab (Potamon Potamios, Oliver 1804) shell. *Pakistan Veterinary Journal* 2010; 30 (4): 227- 31.

(21) Thirunavukkarasu N., Dhinamala K., Moses Inbaraj R. Production of chitin from two marine stomatopods Oratosquilla spp. (Crustacea). *Chemical and Pharmaceutical Research* 2001; 3 (1): 353- 59.

(22) Choorit W., Patthanamanee W., Manurakchinakorn. Use of response surface method for the determination of demineralization efficiency in fermented shrimp shells. *Bioresource Technology* 2008; 99 (14): 6168- 73.

(23) Jo G.H., Jung W.J., Kuk J.H., Oh., K.T., Kim Y.J., Park R.D. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. *Carbohydrate Polymers* 2008; 74 (3): 504- 8.

(24) Rao M.S., Munoz J., Stevens W.F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp bio waste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; 54 (6): 808- 13.

(25) Kokabi M., Yousefzadi M., Aliahmadi A., Feghhi M.A., Keshavarz M. Antioxidant activity of extracts of selected algae from the Persian Gulf, Iran. *Journal of the Persian Gulf* 2013; 4 (12): 45- 50.

(26) Samarakoon K., Jeon., Y- J. Bio-functionalities of proteins derived from marin algae- A review. *Food Research International* 2012; 48 (2): 948- 60.

(27) Zubia M., Robledo D., Freile- Pelegrin Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 2007; 19 (5): 449- 58.

(28) Ghorbel- Bellaaj O., Jridi M., Ben Khaled H., Jellouli K., Nasri M. Bioconversion of shrimp shell waste for the production of antioxidant and chitosan used as fruit juice clarifier. *International Journal of Food Science and Technology* 2012; 47 (9): 1835- 41.

(29) Mostafapour-Rami M., Ahmady-Asbchin S. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Pseudomonas aeruginosa* and antibacterial effects of biosurfactant production in vitro. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (6): 41- 58.

---

[1]- Chiton
[2]- Deproteinization
[3]- Demineralization
[4]- *Lactobacillus plantarum*
[5]- *Bacillus subtilis*
[6]- *Lactobacillus paracasei*
[7]- *Pseudomonas maltophilia*
[8]- *P. aeruginosa*
[9]- *Serratia marcescens*
[10]- *B. pumilus*
[11]- *Fenneropenaeus merguiensis*
[12]- Merck
[13]- McFarland 0.5
[14]- Bradford
[15]- Total antioxidant capacity (TAC)
[16]- Mitsuda
[17]- SPSS ver. 19
[18]- Microsoft Office Excel 2010
[19]- Gallic acid (GA)
[20]- Butyl hydroxy toluene (BHT)
[21]- Ascorbic acid (A.C)
[22]- Ghorbel-Bellaaj
[23]- *Metapenaeaus monoceros*
[24]- Choorit
[25]- *Litopenaeus vannamei*
[26]- Oh
[27]- Jo

Microbial deproteinization of shrimp shell *penaeus merguiensis* for chitin extraction

Fatemeh Sedaghat
MSc. student of Marine biology, Hormozgan University, Iran, fatemehsedaghat5@gmail.com
Morteza Yousefzadi *
Associate Professor of Biolgogy, University of Hormozgan, Iran, morteza110110@gmail.com
Hojjat Toiserkani
Associate Professor of Chemistry, University of Hormozgan, Iran, toiserkani@yahoo.com
Sohrab Najafipour
Assistant Professor of Microbiolgogy, Fasa University of Medical Sciences, Iran, sohrabnajafipour@yahoo.com

Abstract

Introduction: After cellulose, Chitin is the most abundant biopolymer in nature. The most important derivative of chitin is chitosan, obtained by deacetylation of chitin. Major sources of chitin are the exoskeleton of marine crustaceans such as crab, shrimp, and krill. Chitin extraction from shrimp shells can be carried out chemically or using biological methods. Microbial fermentation as an eco-friendly procedure is a suitable alternative for the chemical and enzymatic processes. In this study, the effect of three protease-producing bacteria species *(Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens,* and *Bacillus pumilus)* on the efficiency of microbial demineralization (DM) and deproteinization (DP) of the shrimp shell *penaeus merguiensis,* was investigated. Furthermore, the antioxidant activity of hydrolysate obtained during the fermentation process was measured.

Materials and methods: Demineralization and deproteinization was carried out by incubating shrimp waste inoculated with bacteria at 30°C and 100 rpm for 6 days.

Results: Statistical analysis of data showed a significant difference between the percentage of demineralization and deproteinization in different bacteria species ($p<0.05$). The highest deproteinization (74.76%) and demineralization rate (78.46%) were obtained with *P. aeruginosa*, while the lowest was observed for *S. marcescens*. Antioxidant activity of hydrolysate also showed a significant difference. The highest reducing power and total antioxidant capacity were observed in volumes of 400 µl hydrolysate of *S.marcescens* and 100 µl hydrolysate of *B. pumilus,* respectively.

Discussion and conclusion: The results indicated that *P. aeruginosa* in comparison with other bacterial strains, had a higher ability to remove proteins and minerals from shrimp shell waste. Therefore, the use of this bacterium is suitable for protein and minerals removal from marine crustaceans.

Key words: Chitin, Shrimp shell, Microbial fermentation, Deproteinization, Demineralization, *Pseudomonas aeruginosa*

* Corresponding author
Received: September 13, 2014 / **Accepted:** April 22, 2015