جداسازی سویه بومی باسیلوس آلتی‌شودنیس با پتانسیل بالا در تخمیر پوست میگو و مقایسه فعالیت آنزیم کیتیناز آن با باسیلوس لیکنی فورمیس

سهیلا عباسی[1]، گیتی امتیازی[2*]

1- دانشجوی دکتری، گروه زیست سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

2- استاد، گروه زیست سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: 1398/10/9 پذیرش:1399/8/6

***نویسنده مسئول:** emtiazi@yahoo.com

چکیده:

روند توسعه پایدار محیط زیست و اقتصاد، موجب شده است درباره استفاده از زباله‌های دریایی در مقیاس بزرگ بحث شود. میگو در سال‌های اخیر بخشی مهم از صنایع غذایی را تشکیل داده است. زباله‌های انباشته‌شده میگو بدون استفاده مناسب، به نابودی منابع و مشکلات دفع زباله و آلودگی محیط زیست منجر شده است. تخمیر پسماند میگو با میکروارگانیسم‌ها یک روش برای بازیابی مواد بیولوژیکی فعال است. کیتیناز باکتریایی به‌عنوان آنزیم تجزیه‌کننده در نظر گرفته می‌شود، که باندهای گلیکوزیدی را در کیتین می‌شکند. در این مطالعه باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ کیتین از محیط‌های متفاوت جدا و سپس کارآمدترین انتخاب شده است. سپس با خصوصیات میکروسکوپی، فیزیولوژیکی و خصوصیات مولکولی با تعیین توالی ژن 16SrRNA شناسایی و با سویه *Bacillus.licheniformis* که بیشترین میزان کیتیناز تاکنون از آن گزارش شده است، مقایسه شد. سویه جداشده *Bacillus.altitudinis* شناسایی شد و قادر است با فعالیت آنزیم 5/1 U/mL در طول 4 روز، کیتیناز مقاوم به حرارت بالا را روی پوست میگو تولید کند، ولی روی نوترینت آگار در شرایط عادی رشد نمی‌کند. بنابراین، استفاده از آن آلودگی برای محیط زیست ایجاد نمی‌کند. در نتیجه، میزان فعالیت کیتیناز، روش ساده و ارزان جداسازی آن، مقاومت بالای آنزیم در شرایط دمایی بالا، فعالیت در محدوده وسیع pH و استفاده از سوبسترای ارزان پوست میگو، کیفیت برتر کاربردی این سویه را در تخمیر پوست میگو نشان می‌دهد.

کلید واژگان: کیتیناز، پوست میگو، کیتین، *باسیلوس آلتی‌شودنیس*، *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

مقدمه

در سال‌های اخیر با توسعه کشت آبی، پرورش میگو افزایش یافته است. پرورش میگو به‌ویژه در آسیا در این سال‌ها 80درصد رشد سالانه داشته و در ایران نیز سه‌برابر شده است. تقریباً 50 تا 60درصد کل وزن میگو و خرچنگ را مواد غیر خوراکی تشکیل می‌دهد مانند سر و دم و اسکلت خارجی که جزو آلاینده‌های مهم زیست-محیطی به شمار می‌روند اما غنی از کیتین و البته پروتئین هستند [1]. در صنایع دامپزشکی، خشک‌کردن پوست میگو در آفتاب جهت خوراک دام و کشت آبی انجام می‌شود ولی شرایط آماده‌کردن تهیه غذای دام بسیار غیر بهداشتی است، به‌علاوه پسماند میگو روی سواحل خشک می‌شود که بوی بسیار بد، آلودگی سطوح و آلودگی‌های محیطی دارد [2]. باوجود این، افزایش پسماند میگو به دلیل افزایش مقدار مصرف آن اجتناب‌ناپذیر است. دورریختن پسماند میگو به‌ویژه با پسماند ماهی هم یک بحران زیست‌محیطی و هم یک مشکل اقتصادی است، زیرا مواد بیولوژیکی باارزشی تلف می‌شود. به این ترتیب، کاربرد تکنولوژی مناسب برای تبدیل مواد بیولوژیکی از پسماند میگو به تولیدات باارزش ضروری است.

محصولات مهم تولیدشده از پوست میگو عبارت‌اند از: پروتئین، کیتین، کیتوزان، لیپید و مواد معدنی ازجمله کربنات کلسیم و همچنین مقدار کمی از کاروتنوئیدهای باارزش [3]. کیتین که بیشترین میزان این مواد را تشکیل می‌دهد پلیمری خطی از واحدهای ان استیل گلوکز آمین است که با پیوندهای β- 1,4 به یکدیگر متصل شده‌اند. این پلیمر، پس از سلولز، فراوان‌ترین پلیمر زیستی موجود در طبیعت به شمار می‌رود. کیتین، علاوه بر قارچ‌ها در ساختار بدن حشرات، دیاتومه‌ها، پروتوزوئرها، نماتدها و سخت‌پوستان یافت می‌شود [4]. تیمارهای شیمیایی (با اسید و باز قوی) برای بازیافت کیتین و پروتئین و کاروتنوئیدها استفاده می‌شود ولی نتیجه این عمل قیمت بالا و تولید مضر فاضلاب است، که برای شرایط اقتصادی و محیطی مناسب نیست [2]. امروزه کیتین اهمیت بیوتکنولوژی ویژه‌ای به خود اختصاص داده است. کیتین نه‌تنها پتانسیل ویژگی‌های دارویی مطلوبی مانند فعالیت ضد میکروبی، ضد کلسترول و ضد تومور دارد بلکه دارای پتانسیل بالایی در تیمار فاضلاب، تحویل دارو و بهبود زخم است و به‌عنوان یک فیبر رژیمی هم از آن استفاده می‌شود [5].

آنزیم‌های کیتین از نوعی گلیکوزیل هیدرولاز با قدرت کاتالیز هستند که با شکست پیوند گلیکوزیدی بتا 1 و 4 در بین واحدهایN– استیل گلوکز آمین می‌توانند پلیمر کیتین را به اولیگوساکاریدهای کیتینی، تجزیه کنند [6]. کیتین به حلال‌های آلی بسیار مقاوم است و برای حلال‌بودن به اسیدهای معدنی قوی نیاز دارد. محصول هیدرولیزشده کیتین می‌تواند منبع کربن یا نیتروژن برای میکروارگانیسم‌ها باشد و آن را ذخیره کرد. کیتینازها گلیکوزیل هیدرولازهایی هستند که در طیفی گسترده از موجودات زنده از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات، گیاهان و جانوران وجود دارند [7].

با توجه به اینکه کیتین در گیاهان عالی وجود ندارد، بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آنزیم‌های کیتیناز در گیاهان، بخشی از پاسخ ایمنی گیاه در رویارویی با عوامل بیماری‌زای کیتین‌دار است و چون تولید این آنزیم‌ها با هجوم عوامل بیماری‌زای قارچی و حشرات افزایش می‌یابد، آنها را به‌عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌شناسند. میکروارگانیسم‌هایی که آنزیم ضد قارچی را ترشح می‌کنند به‌عنوان عوامل کنترل بیماری‌های گیاهی نیز در نظر گرفته می‌شوند.

کیتینازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که در صنایع کشاورزی، صنایع غذایی، کنترل حشرات، داروسازی، پزشکی، بیوتکنولوژی، پاکسازی محیط زیست، تولید پروپلاست قارچی، تولید واحدهای پروتئین

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

سلولی برای حیوانات و تغذیه موجودات آبزی [6] و نیز در کنترل قارچ‌های پاتوژن گیاهی و آفات کاربردهای بسیار مهمی دارند [8]. کیتینازها می‌توانند عامل مؤثری در مهار زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی (فیتوپاتوژن) باشند [9]. در سال‌های اخیر کیتینازها به دلیل داشتن توانایی در ازبین‌بردن کیتین دیواره سلولی قارچی و اسکلت خارجی حشرات، به‌عنوان عوامل ضد قارچی و حشرات شناخته شده‌اند [10].

آنزیم‌های کیتیناز موجود در باکتری‌ها و برخی از تک-سلولی‌های دریایی، بیشتر نقش تغذیه‌ای دارند. این موجودات، برای استفاده از منابع کیتینی موجود در اطراف، انواعی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین را تولید و ترشح می‌کنند. چندین جنس باکتریایی مانند سودوموناس، سراشیا و باسیلوس برای تولید کیتیناز شناخته شده‌اند. در اینجا کیتین به‌عنوان منبع نیتروژن و کربن عمل می‌کند و تولید کیتیناز وقتی در محیط کشت منبع کیتینی فراهم باشد، افزایش پیدا می‌کند.

تا به حال در مطالعات بالاترین مقدار کیتیناز از باسیلوس لیکنی فورمیس گزارش شده است. باسیلوس لیکنی فورمیس توانایی تولید طیف وسیعی از انزیم‌ها را دارد که در صنعت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [11]. این باکتری در تولید آنتی بیوتیک [12]، بیوسورفکتانت [13]، پروتئازهای قلیایی [14] و آمیلاز [15] نقش دارد. گونه‌های باسیلوس لیکنی فورمیس به طور گسترده در محیط زیست پراکنده‌اند. آنها در بیشتر خاک‌ها چه خاک‌های فقیر و چه غنی مانند تالاب‌ها و بیابان‌ها وجود دارند. درحالی‌که، مطالعات بسیار کمی تا به حال روی باسیلوس آلتی شودنیس انجام گرفته که در برخی از آنها خاصیت ضد قارچی این گونه به دلیل تولید کیتیناز بررسی شده است.

همچنین در سال‌های اخیر روش‌های بیوتکنولوژی به جای مسیرهای شیمیایی خطرناک به جریان اصلی پژوهش‌های آینده تبدیل شده است. متأسفانه هنوز در کشور ما با وجود منابع اولیه برای تولید کیتین، آنزیم کیتیناز و مشتقات ارزشمند آن این کار به شکل صنعتی انجام نشده و یکی از علل آن کمبود اطلاعات از خصوصیات کیفی و عملکردی آن است.

در این مطالعه، فعالیت آنزیم کیتیناز بر پوست میگو و آزادسازی پروتئین پوست میگو توسط تخمیر باکتری بررسی و نیز فعالیت آنزیم کیتیناز *باسیلوس آلتی شودنیس* با *باسیلوس لیکنی فورمیس* که تاکنون بیشترین گزارش تولید کیتیناز را داشته، مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم‌ها

در این مطالعه 56 نمونه از استخرهای پرورش میگو، پسماند پوست ماهی و میگو، لجن فاضلاب و همچنین از خاک ریزوسفر بوته‌های چای، شمعدانی و شبدر در فصل بهار، سال 1396 از مناطق اطراف شهر اصفهان و رامسر جمع‌آوری شد. پس از تهیه رقت، از رقت‌های 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7} به محیط کشت غربالگری به صورت سفره‌ای روی محیط کشت CCA کشت داده شد.

محیط کشت و انتخاب سویه‌های برتر مولد آنزیم

برای جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتین از محیط کشت (Chitin Colloidal Agar) CCA حاوی 0/5درصد کیتین کلوئیدال، 0/2درصد دی سدیم ئیدروژن فسفات، 0/1درصد پتاسیم دی ئیدروژن فسفات، 0/1 گرم کلرید آمونیوم، 0/05درصد کلرید سدیم، 0/05درصد سولفات منیزیوم، 0/05درصد کلرید کلسیم، 0/05درصد عصاره مخمر و دو درصد آگار است، استفاده شد. نمونه‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز گرما داده شدند. طی این مدت وجودداشتن یا نداشتن هاله مبنی بر هیدرولیز

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

کیتین در اطراف کلنی‌ها بررسی شد. یکی از سویه‌ها که بیشترین میزان هاله شفاف را در اطراف خود ایجاد کرده بود برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

طرز تهیه کیتین کلوئیدال برای سنجش فعالیت آنزیمی

کیتین کلوئیدال مطابق با روش هسو (Hsu) و همکاران از کیتین استخراج‌شده از پوست میگوی *Penaeusse misulcatus* به شرح زیر به دست آمد.

ده گرم پوست میگو به صد میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک 37% اضافه و به مدت 2 ساعت در حرارت اطاق روی همزن قرار داده شد تا کاملاً حل شود. سوسپانسیون رسوب‌کرده آرام آرام به 500 میلی‌لیتر اتانول افزوده و با سود 10 نرمال خنثی کردیم. پس از سانتریفوژ 8000 به مدت 10 دقیقه سوسپانسیون در حرارت 50 درجه خشک شد.

شناسایی مولکولی

سویه‌ای که بیشترین هاله شفاف در اطراف آن مشاهده شد و در بررسی‌های بعدی بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را نشان داد و روی محیط نوترینت آگار رشد نداشت، برای آزمایش‌های مورفولوژی، فیزیولوژی، بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی انتخاب شد. برای شناسایی مولکولی و تأیید سویه انتخاب‌شده، نمونه به مرکز ذخایر ژنتیکی ایران ارسال شد. نتایج تعیین توالی نیز با استفاده از برنامه BLAST در سایت .Eztaxon ارزیابی شد.

برای مقایسه، سویهٔ *باسیلوس لیکنی فورمیس* (PTCC =1721) خریداری‌شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران انتخاب شد.

تخریب میگو و تولید قند و پروتئین

محتوای پروتئینی موجود در مایع رویی محیط پوست میگو قبل از افزودن باکتری و پس از چهار روز تخمیر با هر دو باکتری *باسیلوس لیکنی فرمیس* و *باسیلوس آلتی شودنیس* با روش برادفورد اندازه‌گیری شد. محتوای قند نیز در شرایط فوق با روش دی نیترو سالیسیلیک اسید DNS محاسبه شد.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

به این منظور، در ابتدا باکتری در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در محیط مایع کیتین کلوئیدی (CCB) کشت داده شد. سپس فعالیت آنزیمی باکتری در روزهای اول تا هفتم به صورت زیر سنجیده شد:

ابتدا نمونه باکتری به مدت 5 دقیقه در دور rpm 8000 سانتریفیوژ و محلول رویی آن برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. ارزیابی فعالیت کیتیناز با مقداران استیل گلوکز آمین به‌دست‌آمده از کیتین کلوئیدی انجام شد.

مخلوط واکنش شامل 0/05 میلی‌لیتر محلول رویی، 0/5 میلی‌لیتر کیتین کلوئیدی 0/5% و 0/45 میلی‌لیتر از بافر سدیم استات 50 میلی مولار با (pH =5) به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس 200 میکرولیتر NaOH یک‌درصد نرمال جهت توقف واکنش اضافه شد. در ادامه، نمونه در دور rpm 1000 به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد. 750 میکرولیتر از مایع رویی با یک میلی‌لیتر معرف Schales مخلوط شد و به مدت 15 دقیقه در بن ماری آب جوش قرار گرفت. جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 585 نانومتر خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از منحنی استاندارد غلظت‌های مختلفان استیل گلوکز آمین آزادشده در مدت زمان یک ساعت تعیین شده است و با واحد IU/mL گزارش می‌شود. یک واحد فعالیت آنزیم کیتیناز (IU/mL)، مقدار آنزیمی است که یک میکرومول ان استیل گلوکز

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

آمین در مدت یک ساعت تحت شرایط مورد مطالعه آزاد کند.

تست LC- mass در مقابل ان استیل گلوکز آمین استاندارد برای اطمینان از فعالیت آنزیم کیتیناز و تبدیل کیتین به ان استیل گلوکز آمین انجام شد.

آنالیز تخمیر پوست میگو با FTIR

از نمونه پوست میگو در محیط کشت استریل‌شده قبل از افزودن باکتری و 72 ساعت پس از تلقیح باکتری و عمل تخمیر، آنالیز FTIR انجام گرفت.

آنالیز پوست میگو با XRF

پوست میگوی *Penaeusse misulcatus* از خلیج فارس جمع‌آوری و پس از خشک‌شدن، پوسته‌پوسته و ترکیبات کل با XRF تجزیه و تحلیل شدند. در آزمایش‌های ما این نوع پوست میگو به‌عنوان منبع کربن، و نیتروژن به‌عنوان کیتین کلوئیدال استفاده شده است.

مقایسه ژنوم

هم‌ترازی سکوانس ژن *chiA* از سویه *باسیلوس آلتی‌شودنیس* با ژنوم *باسیلوس لیکنی فورمیس* با استفاده از نرم‌افزار Clustal omega در سایت Multiple Sequence Alignment انجام شد.

تعیین اثر حرارت بر آنزیم ناخالص

فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از محلول تغلیظ‌شده کیتیناز در دماهای مختلف در محدوده 70-10 درجه سانتی‌گراد در pH=6 در بافر فسفات سدیم (50mM) بررسی شد. همچنین برای تعیین پایداری حرارتی آنزیم کیتیناز به مدت ده ساعت و در دمای 60 درجه سانتی‌گراد انکوباسیون انجام و سپس میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در هر ساعت اندازه‌گیری شد.

تعیین اثر pH

بهینه pH آنزیم ناخالص در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با استفاده از محلول تغلیظ‌شده کیتیناز اندازه‌گیری شد. pH محیط با استفاده از بافرهای زیر تنظیم شد:

بافر گلیسین- اسید کلریدریک (pH=3-5)، بافر NaH2PO4- Na2HPO4 (pH=5-8)، بافر بورات (pH=8-9) و بافر گلیسین- سود (pH=10-12).

تغلیظ آنزیم کیتیناز

برای افزایش غلظت آنزیم کیتیناز و انجام تست‌های بعدی از محیط کشت نیمه‌جامد که حاوی 10 درصد پوست میگو، 0/2درصد دی سدیم ئیدروژن فسفات، 0/1درصد پتاسیم دی ئیدروژن فسفات، 0/1گرم کلرید آمونیوم، 0/05درصد کلرید سدیم، 0/05درصد سولفات منیزیوم و 0/05درصد کلرید کلسیم بود، استفاده شد. نمونه‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز گرما داده شدند. سپس برای جداسازی آنزیم کیتیناز، ابتدا با 15 دقیقه سانتریفیوژ 4000 دور در دقیقه سلول‌ها جدا شدند و سپس با افزودن سولفات آمونیوم به مایعِ رویی به مدت 24 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و سانتریفیوژ به مدت 40 دقیقه با دور 12000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد رسوب‌ها جمع‌آوری شدند. برای حذف نمک سولفات آمونیوم این رسوبات در 5 میلی‌لیتر آب مقطر حل و در برابر آب مقطر دیالیز شدند. سپس، محلول حاصل دو ساعت در 65 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. نمونه به‌دست‌آمده به‌عنوان محلول کیتیناز تغلیظ در آزمایش‌های بعدی استفاده شد [16, 17].

تعیین الگوی پروتئینی با ژل الکتروفورز و زایموگرام آنزیم کیتیناز

الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات به شرح زیر انجام شد:

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

20 میکرولیتر از نمونه محلول کیتیناز تغلیظ‌شده با 80 میکرولیتر از بافر نمونه مخلوط و به مدت 10 دقیقه جوشانده و روی ژل 12% بارگیری شد. پس از انجام‌دادن الکتروفورز نمونه با رنگ کوماسی بلو 25% رنگ‌آمیزی و با اسید استیک 10% و متانول 7% رنگ‌بری شد.

زایموگرام به شرح زیر فراهم شد:

نمونه پروتئین به بافر نمونه (حاوی 60 میلی‌مولار تریس- HCl، گلیسرول 15%، SDS 2% و برموفنل بلو 0/1% با pH برابر 6/8) اضافه و حرارت داده شد. نمونه آماده‌شده روی ژل پلی آکریل آمید 10% حاوی 0/1% کیتین کلوئیدال بارگذاری شد. پس از الکتروفورز جهت حذف SDS باقی‌مانده از ژل با استفاده از بافر (0/4 مولار تریس- HCl، کازئین 1%، 2 میلی‌مولار EDTA، 0/02% سدیم آزید، pH برابر 7) به مدت دو ساعت چندبار شستشو داده شد. سپس این ژل به بافر 5 میلی-مولار تریس- HCl با pH 7، دو بار و هربار به مدت 15 دقیقه انتقال یافت و با آب مقطر استریل شست. سپس به مدت 5 دقیقه در محلول 2- پروپانول روی شیکر قرار داده شد. پس از آن ژل در بافر هضم (حاوی 50 میلی‌مولار تریس- HCl، یک میلی‌مولار EDTA، و 0/1% کیتین کلوئیدال با pH 7/1) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 ساعت انکوبه شد تا اجازه دهد هیدرولیز بستر کیتین کلوئیدی توسط آنزیم انجام شود. سرانجام ژل با محلول کنگورد 0/1درصد به مدت 15 دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با کلرید سدیم یک نرمال شستشو داده شد.

استخراج پروتئین از ژل پلی آکریل آمید و تعیین پایداری حرارتی *Bacillus.altitudinis*

پس از انجام الکتروفورز و بلافاصله پس از خاموش‌کردن دستگاه الکتروفورز، ژل از شیشه‌ها جدا و دو نوار طولی از دو طرف ژل مورد نظر بریده شد (یکی از دو نوار، پروتئین مارکر و یکی از چاهک‌های محتوی،، نمونه مورد نظر است و نوار دیگر نیز همان نمونه را شامل می‌شود). این دو نوار در محلول رنگی کوماسی بلو و بخش دیگر ژل در ظرف آب مقطر قرار گرفته و درب آن بسته و به یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد منتقل شد. بعد از اینکه دو نوار مورد نظر رنگ شد، در محلول رنگ‌بر قرار گرفتند. پس از آنکه باندهای پروتئینی به وضوح دیده شد، نوارها را در کنار ژل داخل یخچال گذاشته و بر اساس باندهای مشاهده-شده در بخش رنگی ژل به‌عنوان راهنما، هر باند در راستای باند راهنما بریده شد. باندهای بریده‌شده در یک اپندروف 2/5میلی‌لیتری قرار گرفت و سه بار و هر بار به مدت 5 دقیقه در EDTA 250 میلی‌مولار با pH 7/4 شستشو داده شد. سپس سه بار و هر بار به مدت 5 دقیقه با آب مقطر شستشو شد. ژل را به قطعات کوچک‌تر، تقسیم و یک میلی‌لیتر از بافر تریس و SDS (1 درصد حجمی- حجمی) با pH 7/4 به اپندروف اضافه شد. نمونه مورد نظر به مدت 3 دقیقه در حمام یخ سونیکیت (شش پالس 30 ثانیه‌ای با ولتاژ 50) شد. برای جداسازی تکه‌های ژل از محلول پروتئین، از رزین سفادکس G75 استفاده شد. مایع زیرین جمع-آوری‌شده به دو بخش تقسیم شد. بخشی از آن برای تیمار حرارتی به مدت دو ساعت در دمای 65 درجه قرار گرفت و بخش دیگر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از آن، فعالیت آنزیم کیتیناز درهر دو نمونه اندازه‌گیری شد [18].

نتایج

از بین 38 سویه جداشده روی محیط پوست میگو یکی از سویه‌ها که بیشترین هاله شفاف در اطراف آن مشاهده شد و در بررسی‌های بعدی بیشترین میزان

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

تولید آنزیم کیتیناز را نشان داد برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد. این باکتری در محیط کشت کیتین کلوئیدال رشد کرد و پس از 5 روز در دمای 30 درجه سانتی‌گراد هاله‌ای به قطر 9 میلی‌متر ایجاد کرد. با توجه به اینکه این سویه روی محیط‌های ساده پپتون‌دار مانند نوترینت آگار قابلیت رشد ندارد و بنابراین، آلودگی محیط زیست به دنبال ندارد، پتانسیل بالایی برای کاربرد در بیوتکنولوژی محیطی و صنعتی دارد. ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جداشده در جدول شماره 1 با سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* مقایسه شده است.

جدول 1 خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جداشده باسیلوس آلتی شودنیس و مقایسه آن با سویه باسیلوس لیکنی فورمیس

Morphological characteristics	**Bacillus.altitudinis**	**Bacillus.licheniformis**
Colony morphology	White round irregular edges	Rough
Form	Rod	Rod
Gram stain	Positive	Positive
Spore	Positive	Positive
Flagella	Terminal tuft of flagella	Latheral
Motility	Positive	Positive
Physiological characteristics		
Anaerobic growth	Positive	Positive
Acid from glucose	Positive	Positive
Gas from glucose	Positive	Positive
Hydrolysis of mannose	Positive	Positive
Hydrolysis of mannitol	Positive	Positive
Hydrolysis of rhamnose	Positive	Negative
Hydrolysis of lactose	Positive	Negative
Hydrolysis of xylose	Negative	Positive
Hydrolysis of sucrose	Negative	Positive
Hydrolysis of gelatin	Positive	Negative
Hydrolysis of Chitin	Positive	Positive
Utilization of citrate	Positive	Positive
Hydrolysis of Casein	Positive	Positive
Indol formation	Negative	Negative
H2S	Positive	Negative
Metyl Red test	Positive	Negative
VP-test	Negative	Positive
Urease	Negative	Negative
Nitrate reduction	Negative	Negative
Growth temperature	25-80˚C	25- 60

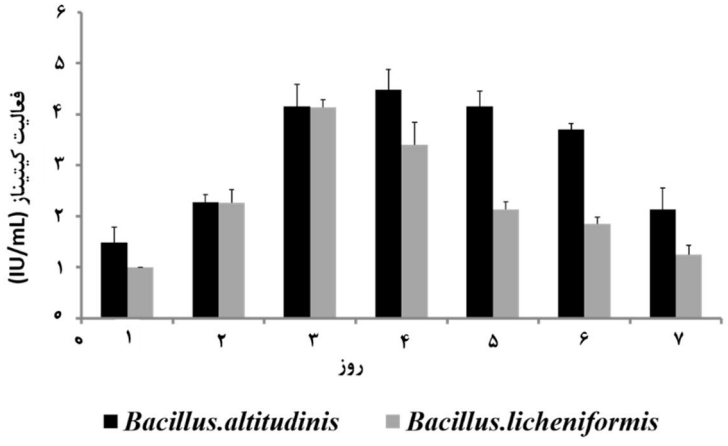
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

بر اساس راهنمای سیستماتیک برگی تشخیص داده شد که سویهٔ انتخاب‌شده از جنس باسیلوس است. سپس ژن 16SrRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی، کلون و سکوانس و تجزیه و تحلیل شد. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار جستجوگر BLAST در سایت Eztoxon با توالی‌های موجود دیگر در بانک ژنی مقایسه شد. نتایج حاصل از توالی‌خوانی ژن 16SrRNA نشان دادند که این سویه با 1452 نوکلئوتید به میزان 100% با سویهٔ *Bacillus altitudinis* قرابت فیلوژنی داشت. این سویه با شماره دسترسی Gen bank MK773490 در پایگاه داده NCBI به ثبت رسید.

مجموع میزان قند موجود در مایعِ رویی محیط تخمیر پس از 24 ساعت که با روش DNS انجام شد، mg/l 73/4 بود و میزان پروتئین آزادشده از پوست میگو در مایعِ رویی فوق که با روش برادفورد اندازه‌گیری شد mg/l 65/6 بود.

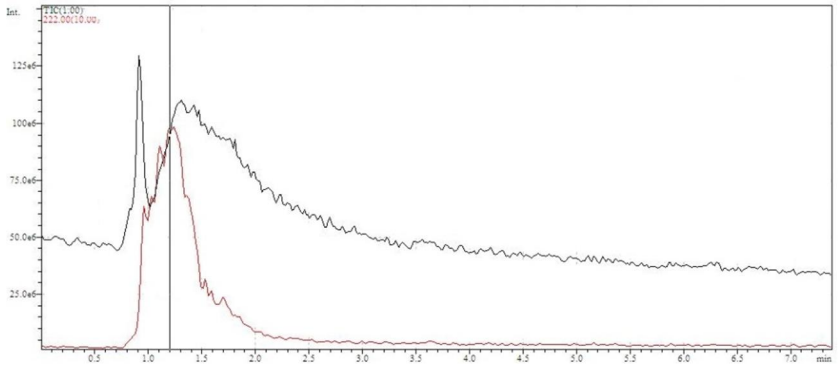
در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف از N- استیل گلوکزآمین محاسبه و بین دوسویه مورد مطالعه بررسی شد (شکل 1). باتوجه به مقادیر به‌دست‌آمده دامنهٔ فعالیت آنزیمی سویهٔ جداسازی‌شده *باسیلوس آلتی شودنیس* بین IU/mL 1/48 تا IU/mL 4/48 بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با IU/mL 4/48 پس از 4 روز مشاهده شد. درحالی‌که دامنه فعالیت آنزیمی سویه *باسیلوس لیکنی فرمیس* بین IU/mL 1 تا IU/mL 4/13 بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با IU/mL 4/13 نیز پس از سه روز مشاهده شد. در ضمن، کروماتوگرام LC- mass تولیدان- استیل گلوکز آمین را در مایع رویی محیط کشت پوست میگو تخمیرشده با سویه جداشده نشان می‌دهد (شکل 2).



شکل 1 مقایسه فعالیت کیتیناز در دو سویه باسیلوس آلتی‌شودنیس و باسیلوس لیکنی فورمیس در محیط پوست میگو در 37درجه سلسیوس به مدت 7روز

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

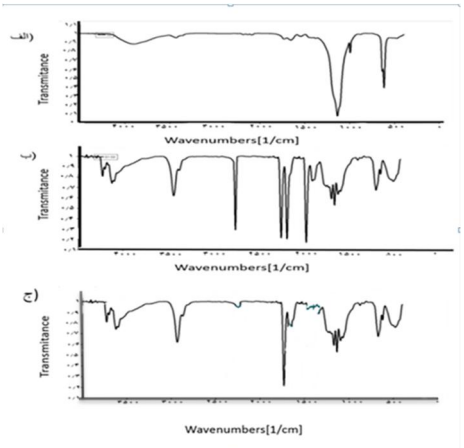
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]



شکل 2 کروماتوگرام LC- mass از مایعِ رویی پوست میگو تخمیرشده با سویه جداشده. خط قرمز نشان‌دهنده کروماتوگرام ان- استیل گلوکز آمین استاندارد است.

آنالیز FTIR تاحدودی ترکیباتی را نشان می‌دهد که طی عمل تخمیر آزاد می‌شوند. با مقایسه این سه کروماتوگرام در شکل سه مشاهده می‌شود که کروماتوگرام نمونه پوست میگو که عمل تخمیر باکتری روی آن انجام نشده، تعداد پیک‌های کمتری دارد که فقط مربوط به خود پوست میگو است. ولی در تخمیر پوست میگو با *باسیلوس لیکنی فرمیس* پیک‌های مربوط به کیتین، پروتئین و پلی ساکاریدها و الیگوساکاریدهای حاصل از تجزیه کیتین مشاهده می‌شود، این در حالی‌ست که در نمونه تخمیر پوست میگو با سویه جداشده *باسیلوس آلتی شودنیس* در هر قسمت پیک‌های بیشتری مشاهده می‌شود و این نشان می‌دهد پس از تخمیر آزاد ترکیبات بیشتری می‌شود.

در طیف‌سنجی FTIR روی کیتین وجود باندهای جذبی $3487/9\ cm^{-1}$، $2892/8\ cm^{-1}$، $1560/3\ cm^{-1}$، $1665/6\ cm^{-1}$، $1319\ cm^{-1}$، $1019/1\ cm^{-1}$ و وجود گروه‌های آمینواستیل، C-H-OH در پلیمر کیتین نشان داده شده است (شکل 3).



شکل 3 نتایج FTIR از الف- پوست میگوی خام. ب- پوست میگوی تخمیرشده با *باسیلوس آلتی‌شودنیس* پس از سه روز در دمای 37درجه سلسیوس. ج- پوست میگوی تخمیرشده با سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* پس از سه روز در دمای 37درجه سلسیوس.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

جذب اتمی و XRF از پوسته میگو خام در جدول 2 نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل XRF نشان داد که هیچ‌گونه مواد سمی در پوسته وجود ندارد. بنابراین، فعالیت ضد قارچی پوسته تخمیرشده برای انسان ایمن است و به‌راحتی می‌توان از محصولات تولیدشده در صنایع غذایی و پزشکی استفاده کرد.

جدول 2 جذب اتمی و XRF از پوسته میگو خام *Penaeusse misulcatus*

Element	Concentration%W/W	Detection
	62/5	
	19/13	
Na	8/41	XRF
Ca	3/3	XRF
S		XRF
Cl	2/64	XRF
P		XRF
Si	2/35	XRF
Fe	0/585	XRF
Sr		XRF
Ar	0/234	Atomic
Cd	0	Atomic
Pb		Atomic
Al	0	XRF
	0	
	1/06	

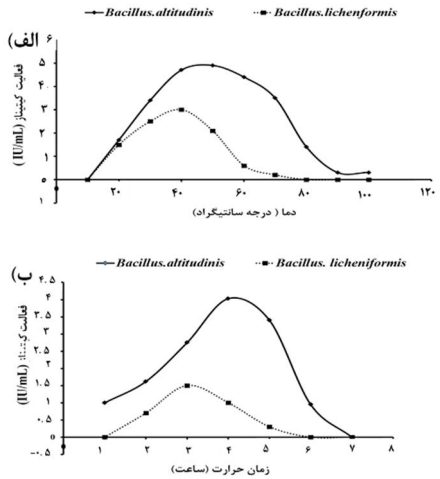
PYH25666.1----------MRHP 4
ACW83016.1 AENGNFITYDDEQSFGHKTDFIKANGLSGAMFWDFSGDSNRTLLNKLAADLDFAPDGGNP 420
:*
PYH25666.1 KQ----PQNLSF-TATSDSITVTWDAVEGATSYNVYRGADKRLDKNVTGTSYVATGMNPD 59
ACW83016.1 EPPSSAPVNVRVTGKTATSVSLAWDAPSSGANIAEYVVSFENRSISVKETSAEIGGLKPG 480
: * *:. *: *::::*** ....:. *:....*. ** *::*.
PYH25666.1 TKLTINVTAVNEAGESP---MSEIVTQTAPAS----------TGE---------- 91
ACW83016.1 TAYSFTVSAKDADGKLHAGPTVEVTTNSDQACSYDEWKETSAYTGGERVAFNGKVYEAKW
540
::.:*: *: *:.*:: *. **
PYH25666.1---------- 91
ACW83016.1 WTKGDRPDQSGEWGVVWRLIGGCE 563

نتایج هم‌ترازی سکوانس ژن تولید کیتیناز *chiA* از سویه *باسیلوس آلتی‌شودنیس* با ژنوم *باسیلوس لیکنی فورمیس* در شکل 4 آورده شده است. نتایج نشان داده است که تقریباً 40درصد تشابه وجود دارد. این عدد میزان تشابه اسیدهای آمینه در ساختمان آنزیم‌های دو سویهٔ مورد مقایسه را نشان می‌دهد که با نرم‌افزار Clustal omega نشان داده شده است و اختلاف زیاد بین ساختمان آنزیمی این دو سویه احتمالاً تفاوت کاربردی و عملکردی دو سویه را توجیه می‌کند که به مطالعه و آزمایش‌های بیشتر نیاز دارد.

فعالیت آنزیم کیتیناز باکتری باسیلوس لیکنی فرمیس در محدوده دمایی بین 60-20 درجه سانتی‌گراد و با فعالیت بهینه در 45 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و این فعالیت با افزایش دما کاهش می‌یابد. درحالی‌که فعالیت آنزیم کیتیناز سویهٔ جداشده *باسیلوس آلتی شودنیس* در محدوده دمایی بین 80-20 درجه سانتی‌گراد و با فعالیت بهینه در 55 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل 5 الف). پایداری آنزیم در دمای 60 درجه سانتی‌گراد در شکل 5 ب مشاهده می‌شود.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

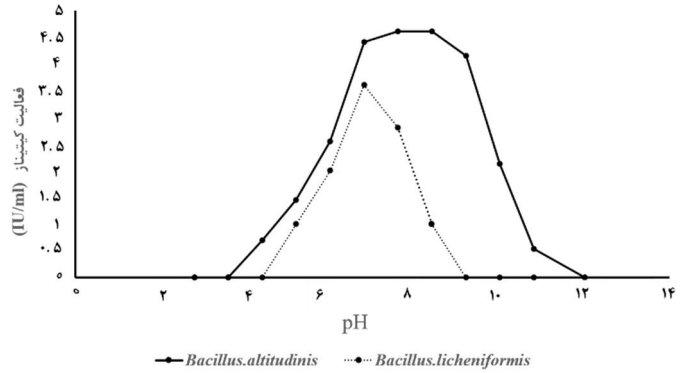
[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]



شکل 5 الف مقایسه تأثیر دما بر فعالیت کیتیناز در مایعِ رویی بستر جامد محیط پوست میگو در *باسیلوس آلتی‌شودنیس و باسیلوس لیکنی فورمیس*؛ ب- مقایسه تأثیر پایداری حرارتی کیتیناز *باسیلوس آلتی‌شودنیس و باسیلوس لیکنی فورمیس* در دمای 60درجه سلسیوس به مدت 7ساعت.

همان‌طور که در شکل 5 ب نشان داده شده است آنزیم کیتیناز به مدت 6 ساعت فعالیت خود را در دمای 60 درجه سانتی‌گراد حفظ کرده است. بنابراین، در مقایسه با آنزیم‌ها و پروتئین‌های دیگرِ موجود در مایع رویی، پایداری بیشتری دارد. آنزیم در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت می‌تواند پایداری خود را در برابر حرارت حفظ کند. درحالی‌که، سایر پروتئین‌های حساس به گرما در درجه حرارت بالا تخریب می‌شوند. ما از این روش برای افزایش غلظت آنزیم کیتیناز تولیدشده از *باسیلوس آلتی‌شودنیس* استفاده کردیم.

آنزیم کیتیناز در باکتری *باسیلوس لیکنی فرمیس* فعالیت بهینه خود را (3/2IU/mL) در pH 6/8 در مایعِ رویی محیط پوست میگو در دمای 37 درجه سانتی‌گراد نشان داد، درصورتی‌که سویه جداشده فعالیتی به مراتب بیشتر در حدود 4/73IU/mL در محدوده pH 6/8 تا 9/2 در شرایط فوق از خود نشان می‌دهد (شکل 6).

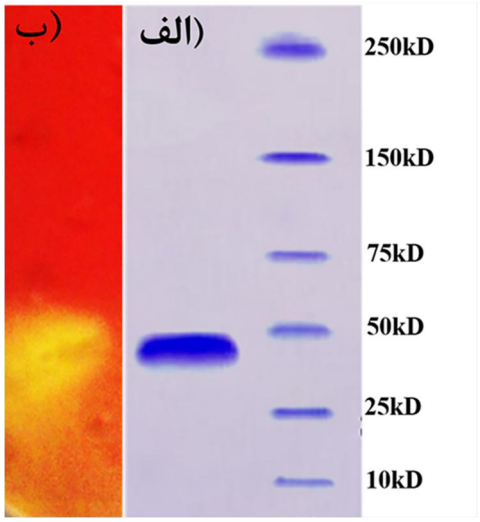


شکل 6 تأثیر pH بر فعالیت کیتیناز دو باکتری *باسیلوس آلتی‌شودنیس و باسیلوس لیکنی فورمیس*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

نتایج تجزیه و تحلیل پروتئین با الکتروفورز SDS-PAGE نشان‌دهنده یک باند منفرد در نزدیکی 50 کیلو دالتون است که فعالیت کیتینولیتیک این باند با زایموگرام تأیید شد و نشان داد باند پروتئین نزدیک 50 کیلودالتون فعالیت کیتینازی دارد (شکل 7).



شکل 7 الف الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) نمونه مایع رویی کشت باسیلوس آلتی‌شودنیس روی کشت جامد پوست میگو پس از تیمار حرارتی و تغلیظ آن با سولفات آمونیوم؛ ب- آنالیز زیموگرام نمونه روی ژل حاوی کیتین کلوئیدال رنگ‌آمیزی‌شده با کنگورد.

خالص‌سازی آنزیم از ژل فقط برای یک سویه انجام گرفت چون فقط آنزیم ناخالص باسیلوس *باسیلوس آلتی شودنیس* در برابر حرارت مقاوم بود. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ناخالص تغلیظ‌شده پس از فرایند حرارتی (65 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت) و آنزیم استخراج‌شده از ژل الکتروفورز نشان داد فعالیت آنزیم نسبت به فعالیت آن قبل از الکتروفورز افزایش (7/2IU/mL) دارد و بین نمونه حرارت‌دیده و شاهد (7/1IU/mL) هیچ تفاوتی مشاهده نشد و در این آزمایش، پایداری حرارتی آنزیم کاملاً ثابت می‌شود. به این ترتیب نشان داده شد که مطابق آنچه انتظار می‌رفت با خالص‌سازی آنزیم هم فعالیت آنزیم افزایش یافته و هم پایداری حرارتی تغییر نکرده است.

بحث

با توجه به اینکه برای تولید آنزیم‌های صنعتی به سویه مناسب و سپس تکنولوژی مربوط نیاز است. در این مطالعه با جداسازی و شناسایی سویه منحصربه‌فرد تجزیه-کننده کیتین، ضمن بومی‌سازی و ذخیره‌سازی این نوع باکتری باارزش می‌توان در مطالعات بعدی نیز از تولیدات آن بهره‌مند شد. در ضمن با مقایسه این سویه با سویه استاندارد *باسیلوس لیکنی فرمیس* که اکنون برای تولید کیتیناز در صنعت استفاده می‌شود، پتانسیل بالای این سویه جهت کاربردهای صنعتی تأیید شد.

باکتری جداشده در این مطالعه، منحصربه‌فرد است و روی آگار مغذی یا هیچ محیط کشت غنی دیگری رشد نمی‌کند. اما روی کیتوزان، کیتین و پوسته میگو به‌عنوان تنها منبع نیتروژن و کربن قادر است رشد کند. به این ترتیب به‌راحتی می‌توان از این سویه برای تبدیل مواد بیولوژیکی زباله‌های میگو به محصولات باارزش بدون اینکه به محیط زیست و چرخه مواد در طبیعت آسیبی وارد شود، استفاده کرد. تخریب زیستی پوسته میگو توسط باکتری کیتینولیتیک، یک روش مقرون به صرفه است و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

می‌تواند پیشنهادی مناسب برای تولید کیتیناز، کیتین، کیتوالیگوساکاریدها و N- استیل گلوکز آمین در مقیاس بزرگ باشد. نتایج این مطالعه نشان داده است که *باسیلوس آلتی‌شودنیس* جداشده از استخر پرورش میگو، از کیتین پوست میگو به‌عنوان تنها منبع کربن در طول فاز جامد تخمیر استفاده و کیتین را به مواد با ارزش ذکرشده تبدیل می‌کند. محیط کشت نیمه‌جامدی که در تحقیق ما برای به دست آوردن آنزیم بیشتر طراحی شده است مزایای بسیاری دارد. این روش به سرمایه‌گذاری اندکی نیاز دارد و امکان استفاده از بستر یا محتوای خشک بیشتری فراهم می‌آورد. ازاین‌رو، غلظت آنزیم بالاتری به همراه دارد و در صنعت، تولید آنزیم را افزایش می‌دهد.

کیتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی است که در سال‌های اخیر به علت کاربرد وسیع به‌ویژه در کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا به آن توجه بسیاری شده و اثر آن روی قارچ‌های بیماری‌زای رشته‌ای [19] و مخمری [20] نیز ثابت شده است. در این مطالعه میزان آزادشدن آنزیم کیتیناز سویه جداسازی‌شده باسیلوس *باسیلوس آلتی‌شودنیس* با سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* به‌عنوان سویه استاندارد مقایسه و توانایی سویه جداشده مشخص شد.

دما و pH آنزیم دو پارامتر متمایزی هستند که تعیین‌کننده آنزیم مناسب برای برنامه‌های بیوتکنولوژی هستند. در این تحقیق، فعالیت آنزیم کیتیناز سویه جداسازی‌شده *باسیلوس آلتی‌شودنیس* پس از گرم‌شدن در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 ساعت بسیار افزایش یافت. آنزیم در دمای 80- 60 درجه سانتی‌گراد پایدار است و حتی پس از 5 ساعت در دمای 60 درجه سانتی‌گراد و حتی 2 ساعت در دمای 70 درجه سانتی‌گراد پایدار است، با توجه به اینکه آنزیم کیتیناز باکتری سویه جداشده به مدت طولانی در دمای 70 درجه سانتی‌گراد فعالیت خود را حفظ می‌کند، از این استراتژی می‌توان برای خالص‌سازی آنزیم کیتیناز استفاده کرد، که روشی بسیار ساده و ارزان است چون در این دما بقیه آنزیم‌ها و پروتئین‌ها که به دما مقاوم نیستند از بین می‌روند و فقط آنزیم مقاوم به دما پایدار باقی می‌ماند. علت این پایداری حرارتی می‌تواند تعامل الکتروستاتیک شدید (مانند تشکیل پل نمکی)، پیوند هیدروژنی، اتصال دی سولفیدی داخل مولکولی یا بسته‌بندی جمع و جور مولکول آنزیم باشد و چنین پایداری حرارتی بالایی تاکنون از یک کیتیناز تولیدشده از *Bacillus.SP*.13.26 و توسط Puwani.E Yuli گزارش شده [17] که نوعی آرکئا است و تاکنون در باکتری‌ها گزارش نشده است.

در این مطالعه، pH بهینه برای تولید کیتیناز توسط سویه جداشده در شرایط خنثی متمایل به شرایط قلیایی است، که تقریباً مشابه کیتیناز *Beauveria. Bassiana* درpH 9/2 فعال است [21]. درحالی‌که *P.aeroginosa* K.187 [22] و کیتیناز باسیلوس *B.circulans* WL-12 و باسیلوس سویه MH-1 در شرایط اسیدی بهتر عمل می‌کنند [23].

بنابراین کیتیناز به‌دست‌آمده از سویه مورد استفاده در این مطالعه می‌تواند برای همه برنامه‌های کاربردی صنعتی که در شرایط قلیایی، خنثی یا اسیدی می‌شوند، بسیار مفید باشد. همچنین برای اهداف پزشکی مانند تولید کیتوالیگوساکاریدها که به شرایط خنثی نیاز هست می‌توان از آن استفاده کرد.

در این مطالعه، تداخل اثر درجه حرارت و pH بررسی نشده است. در هر زمان، یک عامل بررسی شده و بقیه عوامل ثابت در نظر گرفته شده است. هدف اصلی این مطالعه، مقایسه دو سویه -سویه *باسیلوس آلتی‌شودنیس* و سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس*- از نظر فعالیت آنزیم کیتیناز است و با توجه به اینکه pH بهینه برای هرکدام از سویه‌ها متفاوت است، در هنگام بررسی، اثر درجهٔ حرارت pH ثابت و برای رشد هردو سویه مناسب در نظر گرفته شده است.

طبق معادلات درجه استیل‌زدایی کیتوسان تولیدی در این پژوهش حدود 53% است. در وضعیت کنونی، استیل-

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

زدایی با استفاده از هیدروکسید سدیم انجام می‌گیرد که آلودگی محیط زیست را در پی دارد ولی در این مطالعه، هنگام عمل تخمیر مقدار کمی استیل‌زدایی هم انجام شده است. برای تعیین درجه استیلاسیون کیتوزان طبق روش Brugnerotto و همکاران (2001) از میزان جذب نمونه در طول موج‌های $1320\ cm^{-1}$ و $1420\ cm^{-1}$ استفاده شده است. باند $1320\ cm^{-1}$، باند اختصاصی برایان استیل گلوکز آمین است. طبق تحقیق Garcia و همکاران (2017) در باند $1420\ cm^{-1}$ بین کیتین و کیتوزان تفاوت آشکاری وجود دارد [24].

در مطالعات متعددی نقش مهم باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتین به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی گیاهی نشان داده شده است [25]. با توجه به اهمیت بیماری‌های انسانی و گیاهی که انواع قارچ‌های بیماری‌زا ایجاد کرده‌اند بررسی راهکارهای مقابله با این بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. یکی از راه‌های مهمی که می‌توان به آن توجه کرد ممانعت از ایجاد بیماری با تخریب یا مهار فعالیت عوامل مؤثر در بیماریزایی قارچ است. این روش در مقایسه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، قارچ‌کش‌ها و آفت‌کش‌های شیمیایی که استفاده زیاد آنها سبب تجمع ترکیبات سمی خطرناک برای انسان و محیط زیست می‌شود، بسیار مفید و سودمند است. استفاده از محلول حاوی آنزیم کیتیناز به‌دست‌آمده در این مطالعه که حاصل رشد باسیلوس *آلتی‌شودنیس* بر پوست میگو است در این زمینه می‌تواند بسیار کارساز باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه می‌توان پیشنهادهایی ارائه کرد: خالص‌سازی آنزیم کیتیناز در سویه جداسازی‌شده، بهینه‌سازی شرایط رشد این سویه برای تولید بیشتر آنزیم کیتیناز، استفاده از این سویه در مطالعات مربوط به کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، انتقال سویه جداشده به گیاهان مختلف و بررسی میزان مقاومت آنها علیه عوامل بیماری‌زا .

منابع

1. Islam MS, Khan S, Tanaka M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Mar Pollut Bull. 2004;49(1-2):103-10.

2. Mao X, Guo N, Sun J, Xue C. Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. J. Clean. Prod. 2017;143:814-23

3.García J, Ruiz-Durántez E, Valderruten N. Interpenetrating polymer networks hydrogels of chitosan and poly (2-hydroxyethyl methacrylate (for controlled release of quetiapine. React. Funct. Polym. 2017;117:52-9.

4. Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. Mar Biotecnol. 2005;96: 219-262.

5. Shi C, Zhu Y, Ran X, Wang M, Su Y, Cheng T. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. J. Surg. Res. 2006;133(2):185-92.

6. Hashimoto M, Ikegami T, Seino S, Ohuchi N, Fukada H, Sugiyama J, et al .Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. J. Bacteriol. 2000;182(11):3045-54.

7. Howard MB, Ekborg NA, Weiner RM, Hutcheson SW. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. J. Ind. Microbiol. 2003;30(11):627-35.

8. Viterbo A, Haran S, Friesem D, Ramot O, Chet I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum Rifai* TM. Fems Microbiol lett. 2001;200(2):169-74.

9. Gokul B, Lee J-H, Song K-B, Rhee S, Kim C-H, Panda T. Characterization and applications of

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]

chitinases from *Trichoderma harzianum*–a review. Bioprocess Eng. 2000;23(6):691-4.

10. Karasuda S, Tanaka S ,Kajihara H, Yamamoto Y, Koga D. Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003;67(1):221-4.

11. Lü C, Ge Y, Cao M, Guo X, Liu P, Gao C, et al. Metabolic Engineering of *Bacillus licheniformis* for Production of Acetoin. Front Bioeng Biotech. 2020;125(8):1-7.

12. Smitha S, Bhat S. Thermostable Bacteriocin BL 8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. J. Appl. Microbiol. 2013;114(3):688-94.

13. Dewaliya V, Jasodani R. Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* for biosurfactant production. Tech J Microbiol. 2013;2:14-9.

14. Pouryafar F, Najafpour G, Noshadi N, Jahanshahi M. Thermostable alkaline protease production via solid state fermentation in a tray bioreactor using *Bacillus licheniformis* ATCC 21424. Int J Environ Res. 2015;9(4):1127-34.

15. Mishra S, Behera N. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. Afr. J. Biotechnol. 2008;7(18): 3326-3331.

16. Velusamy P, Kim K. Chitinolytic activity of *Enterobacter sp*. KB3 antagonistic to Rhizoctonia solani and its role in the degradation of living fungal hyphae. Int Res J Microbiol. 2011;2(6):206-14.

17. Yuli PE, Suhartono MT, Rukayadi Y, Hwang JK, Pyun YR. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian Bacillus sp. 13.26. Enzyme Microb Techno. 2004;35(2-3):147-53.

18. Kurien, Biji T., Rachna Aggarwal, and R. Hal Scofield. "Protein Extraction from Gels: A Brief Review." Electrophoretic Separation of Proteins. Humana. Press. 2019, 479-482.

19. Li B, Wang B, Pan P, Li P, Qi Z, Zhang Q ,et al. *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab. Biocontrol Sci. Technol. 2019;29(10):1009-22.

20. Abassi S, Emtiazi G, Hosseini-Abari A, Kim BG. Chitooligosaccharides and Thermostable Chitinase Against Vulvovaginal Candidiasis and Saprophyte Fungi: LC Mass Studies of Shrimp Shell Fermentation by *Bacillus altitudinis*. Curr. Microbiol. 2020;77(1):40-8.

21. Suresh P, Chandrasekaran M. Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine Beauveria bassiana in solid state fermentation. Process Biochem. 1999;34(3):257-67.

22. Wang S-L, Chang W-T. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. Appl. Environ. Microbiol. 1997;63(2):380-6.

23. Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, Moriguchi M. Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus strain*, MH-1, isolated from chitin-containing compost. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64(9):3397-402.

24. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea F, Argüelles-Monal W, Desbrieres J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Int J Polym Anal Ch.Polymer. 2001;42(8):3569-80.

25. Kamil Z, Rizk M ,Saleh M, Moustafa S. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. Int. J. Mol. Sci. 2007;2(2):57-66.

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Isolation of the native potential of Bacillus.altitudinis with high potential in shrimp shell fermentation and the comparison of its chitinase enzyme activity with Bacillus.licheniformis

Soheila Abbasi[1], Giti Emtiazi[2*]

1. PhD Student, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
2. Professor, Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Accepted: 2020/10/27 Received: 2019/12/30

*Corresponding author: emtiazi@sci.ui.ac.ir

Abstract:
The trend toward sustainable development of the environment and economy has led to a large-scale debate on the use of seafood wastes. In recent years shrimp has been a major part of the food industry. The accumulated waste of shrimp without proper use has resulted in the destruction of the resources and problems of waste disposal and environmental pollution. Shrimp waste fermentation with microorganisms is a method for recovering biologically active material. Bacterial chitinase is considered as a degenerate enzyme. In this study, chitin degrading bacteria were isolated from different environments and then the most efficient strain was selected. Then it was identified by Microscopic, physiological and molecular characteristics and sequencing the 16SrRNA gene and was compared with the *Bacillus licheniformi*s strain, the highest rate of chitinase that has been reported so far. The isolated strain identified as *Bacillus altitudinis* can ferment shrimp shell as the only sources of energy and produce high-temperature chitinase, with a 5.1 U/mL activity of over a period of 4 days, and 65.6 mg/l protein on semisolid shrimp shell but it does not grow on the agar under normal conditions. Therefore, its use can't cause pollution to the environment. As a result, the activity of chitinase, its simple and inexpensive method of concentration by heat, high enzyme resistance at high temperatures, activity in a wide range of pH and the use of cheap shrimp shell substrate, show the superior functional quality of this strain in shrimp shell fermentation.

Keywords: chitinase, shrimp shell, chitin, *Bacillus.altitudinis, Bacillus.licheniformis.*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1399.11.4.5.0]