

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

سهیلا عباسی<sup>1</sup>، گیتی امتیازی<sup>\*2</sup>

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

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

پذیرش: 1399/8/6

دریافت: 1398/10/9

\*نویسنده مسئول: emtiaz@yahoo.com

## چکیده:

روند توسعه پایدار محیط زیست و اقتصاد، موجب شده است درباره استفاده از زباله های دریایی در مقیاس بزرگ بحث شود. میگو در سال های اخیر بخشی مهم از صنایع غذایی را تشکیل داده است. زباله های انباشته شده میگو بدون استفاده مناسب، به نابودی منابع و مشکلات دفع زباله و آلودگی محیط زیست منجر شده است. تخمیر پسماند میگو با میکروارگانیسم ها یک روش برای بازیابی مواد بیولوژیکی فعال است. کیتیناز باکتریایی به عنوان آنزیم تجزیه کننده در نظر گرفته می شود، که باندهای گلیکوزیدی را در کیتین می شکند. در این مطالعه باکتری های تجزیه کننده کیتین از محیط های 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 جدا شده *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 نمی کند. بنابراین، استفاده از آن آلودگی برای محیط زیست ایجاد نمی کند. 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 می دهد.

**کلید واژگان:** کیتیناز، پوست میگو، کیتین، باسیلوس آلتی شودنیس، باسیلوس لیکنی فورمیس.

## مقدمه

در سال‌های اخیر با توسعه کشت آبی، پرورش میگو افزایش یافته است. پرورش میگو به‌ویژه در آسیا در این سال‌ها 80 درصد رشد سالانه داشته و در ایران نیز سه برابر شده است. تقریباً 50 تا 60 درصد 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، خشک کردن 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]. با وجود 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 با ارزشی تلف می‌شود. به این ترتیب، کاربرد تکنولوژی مناسب برای تبدیل مواد بیولوژیکی از پسماند میگو به تولیدات با ارزش ضروری است.

محصولات مهم تولیدشده از پوست میگو عبارت‌اند از: پروتئین، کیتین، کیتوزان، لیپید و مواد معدنی از جمله کربنات کلسیم و همچنین مقدار کمی از کاروتنوئیدهای با ارزش [3]. کیتین که بیشترین میزان این مواد را تشکیل می‌دهد پلیمری خطی از واحدهای ان استیل گلوکز آمین است که با پیوندهای 1,4- $\beta$  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 واحدهای N- 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

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 CCA (Chitin Colloidal Agar) حاوی 0/5 درصد کیتین کلونیدال، 0/2 درصد دی سدیم نیدروژن فسفات، 0/1 درصد پتاسیم دی نیدروژن فسفات، 0/1 گرم کلرید آمونیوم، 0/05 درصد کلرید سدیم، 0/05 درصد سولفات منیزیم، 0/05 درصد کلرید کلسیم، 0/05 درصد 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 وجود داشتن یا نداشتن هاله مبنی بر هیدرولیز

سلولی برای حیوانات و تغذیه موجودات آبی [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 از بین بردن کیتین دیواره سلولی قارچی و اسکلت خارجی حشرات، به عنوان 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، سراسیا و باسیلوس برای تولید کیتیناز شناخته شده‌اند. در اینجا کیتین به عنوان 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 آنزیم‌ها 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

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 کلونیدی (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 کلونیدی انجام شد.

مخلوط واکنش شامل 0/05 میلی‌لیتر محلول رویی، 0/5 میلی‌لیتر کیتین کلونیدی 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

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 کلونیدال برای سنجش فعالیت آنزیمی

کیتین کلونیدال مطابق با روش هسو (HSU) و همکاران از کیتین استخراج‌شده از پوست میگوی *Penaeus* *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 سانتریفیوژ 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، سویه باسیلوس لیکنی فورمیس (1721=PTCC) 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

### 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=5-8)، بافر بورات (pH=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، 0/2 درصد دی سدیم تیدروژن فسفات، 0/1 درصد پتاسیم دی تیدروژن فسفات، 0/1 گرم کلرید آمونیوم، 0/05 درصد کلرید سدیم، 0/05 درصد سولفات منیزیم و 0/05 درصد 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 مایع 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 پروتینی با ژل الکتروفورز و زایموگرام آنزیم کیتیناز**  
الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دودسیل سولفات به شرح زیر انجام شد:

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.

### FTIR آنالیز تخمیر پوست میگو با

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 *Penaeus monodon* 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 کلئیدال 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.

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 2/5 میلی‌لیتری 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 - آوری شده 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 در هر 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

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 انجام دادن 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 کلونیدال 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 هر بار 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 کلونیدال با pH 7/1) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 ساعت انکوبه شد تا اجازه دهد هیدرولیز بستر کیتین کلونیدی توسط آنزیم انجام شود. سرانجام ژل با محلول کنگورد 0/1 درصد 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 خاموش کردن دستگاه الکتروفورز، ژل از شیشه‌ها جدا و

آلودگی محیط زیست به دنبال ندارد، پتانسیل بالایی برای کاربرد در بیوتکنولوژی محیطی و صنعتی دارد. ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جدا شده در جدول شماره 1 با سویه باسیلوس لیکنی فورمیس مقایسه شده است.

تولید آنزیم کیتیناز را نشان داد برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد. این باکتری در محیط کشت کیتین کلونیدال 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 پتون‌دار مانند نوترینت آگار قابلیت رشد ندارد و بنابراین،

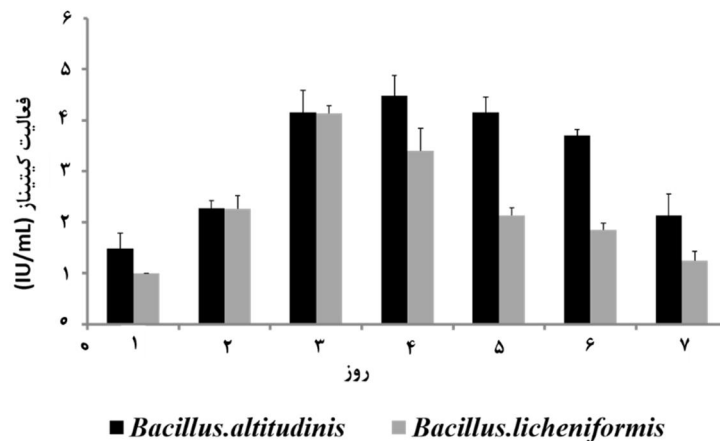
جدول 1 خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جدا شده باسیلوس آلتی شودنیس و مقایسه آن با سویه باسیلوس لیکنی فورمیس

Morphological characteristics	<i>Bacillus.altitudinis</i>	<i>Bacillus.licheniformis</i>
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
H <sub>2</sub> S	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

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 به دست آمده دامنه فعالیت آنزیمی سویه جداسازی شده باسیلوس آلتی شوندنس بین 1/48 IU/mL تا 4/48 IU/mL بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با 4/48 IU/mL پس از 4 روز مشاهده شد. درحالی که دامنه فعالیت آنزیمی سویه باسیلوس لیکنی فرمیس بین 1 IU/mL تا 4/13 IU/mL بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی با 4/13 IU/mL نیز پس از سه روز مشاهده شد. در ضمن، کروماتوگرام LC-mass تولیدان- استیل گلوکز آمین را در مایع رویی محیط کشت پوست میگو تخمیر شده با سویه جدا شده نشان می‌دهد (شکل 2).

بر اساس راهنمای سیستماتیک برگگی تشخیص داده شد که سویه انتخاب شده 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 نرم افزار 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 سویه *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 مایع رویی محیط تخمیر پس از 24 ساعت که با روش DNS انجام شد، 73/4 mg/l بود و میزان پروتئین آزاد شده از پوست میگو در مایع رویی فوق که با روش برادفورد اندازه‌گیری شد 65/6 mg/l بود.



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













#### 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 Biotechnol.* 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

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 استیل‌سیون کیتوزان طبق روش Brugnerotto و همکاران (2001) از میزان جذب نمونه در طول موج‌های  $1320\text{ cm}^{-1}$  و  $1420\text{ cm}^{-1}$  استفاده شده است. باند  $1320\text{ cm}^{-1}$ ، باند اختصاصی برایان استیل گلوکز آمین است. طبق تحقیق Garcia و همکاران (2017) در باند  $1420\text{ cm}^{-1}$  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 جداسازی شده، 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.



