

## تأثیر غلظت گلوکز و میزان تلقیح بر استخراج کیتین از ضایعات میگو به روش تخمیر میکروبی

فاطمه صداقت<sup>1</sup>، مرتضی یوسف زادی<sup>2\*</sup>، حجت توپسرکانی<sup>3</sup>، سهراب نجفی پور<sup>4</sup>

1- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

2- دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

3- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

4- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی فسا

\* هرمزگان، صندوق پستی 7916193145

Morteza110110@gmail.com

(دریافت مقاله: 94/7/2 پذیرش مقاله: 94/10/14)

**چکیده-** کیتین، یکی از فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای تجدیدپذیر در طبیعت است که به طور گسترده در پوسته‌ی سخت‌پوستان، کوتیکول حشرات و دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود. این پلیمر به دلیل خواص منحصر به فردی چون زیست‌سازگاری، زیست‌تجزیه‌پذیری و غیر سمی بودن دارای کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر، ضایعات میگوی موزی، *Penaeus merguensis* (ضایعات خرد شده در اندازه 8-10 میلی‌متر)، جهت استخراج کیتین به روش تخمیر میکروبی با استفاده از باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، مورد استفاده قرار گرفت. به منظور پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات تحت تیمار باکتری، در غلظت‌های مختلف گلوکز (0، 10، 15 و 20% وزنی - حجمی) و مایع تلقیح (10، 15 و 20% حجمی - حجمی)، شرایط گرماگذاری به مدت 4 روز در دمای 30 درجه‌ی سانتی‌گراد و در انکوباتور شیکردار (100 دور در دقیقه) انجام پذیرفت. نتایج حاصل ارتباط مستقیمی بین غلظت این پارامترها با میزان پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی نشان داد. در بررسی اثر این پارامترها، غلظت گلوکز 20% و مایع تلقیح 20% به عنوان مقدار بهینه تعیین شد که منجر به تولید کیتینی با 86% حذف پروتئینی و 76% حذف مواد معدنی گشت. بنابراین، تخمیر میکروبی، به عنوان یک روش مثبت و سازگار با محیط زیست، می‌تواند جهت استخراج کیتین با کیفیت بالا مورد استفاده قرار گیرد.

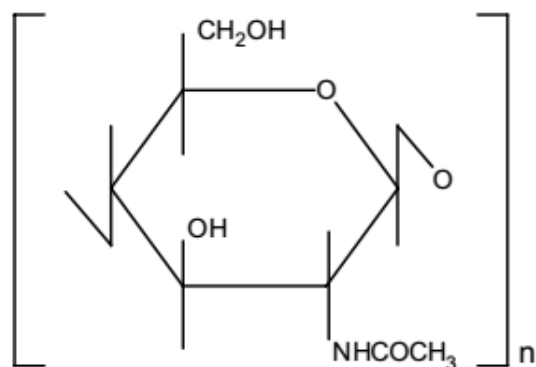
کلید واژگان: تخمیر میکروبی، کیتین، میگوی موزی.

### 1- مقدمه

کوتیکول حشرات و دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهد. این ترکیب به عنوان یک منبع تجدیدپذیر، بسیار حائز اهمیت است و به عنوان فراوان‌ترین پلیمر زیستی

کیتین، پلیمر (1-4)  $\beta$ -N استیل D- گلوکز آمین است که اصلی‌ترین ترکیب ساختاری اسکلت خارجی بی‌مهرگان،

بازهای قوی، فرایند استخراج کیتین را به لحاظ اکولوژیکی غیر قابل قبول می‌سازد [9].



شکل 1 ساختار شیمیایی کیتین [12]

علاوه بر این، 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، پاپاین<sup>3</sup> و پپسین صورت می‌گیرد که هزینه بر بودن و استخراج کم بازده، برخی از اشکالات این روش می‌باشد [10].

اخیراً توجه زیادی به استفاده از پروتئاز و لاکتیک اسید تولید شده به وسیله تخمیر میکروبی، جهت استخراج کیتین معطوف شده است، چون این روش نسبتاً ساده و ارزان بوده، و از داستیلاسیون ناخواسته و کاهش وزن مولکولی که به وسیله اسید و باز قوی ایجاد می‌شود نیز جلوگیری می‌کند [9]. در این روش باید از میکروارگانیزمی استفاده گردد که قابلیت حذف مواد پروتئینی و معدنی موجود در پوسته سخت‌پوستان را داشته باشد. در واقع وظیفه میکروارگانیزم این است که با تولید لاکتیک اسید بوسیله شکستن گلوکز، باعث حل شدن کلسیم کربنات و دیگر مواد معدنی موجود در پوسته می‌گردد. علاوه بر این، آنزیم‌های پروتئولیتیک

بعد از سلولز شناخته می‌شود؛ بطوری که میزان تولید سالانه‌ی آن در سطح بیوسفر به بیش از 1011 تن می‌رسد [1] (شکل 1). نام این پلیمر زیستی از واژه یونانی کیتون<sup>1</sup> به معنی زره یا پوشش گرفته شده است. این پلیمر از نظر ساختار مولکولی، حلالیت محدود و میل کم به ترکیب شیمیایی، شبیه به سلولز است، با این تفاوت که در موقعیت کربن شماره دو آن به جای گروه هیدروکسیل (-OH)، گروه استامید ( $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ ) قرار گرفته است [۲،۳]. کیتین در انواع بسیار گسترده‌ای از گونه‌ها از جمله مژک‌داران، آمیب‌ها، برخی جلبک‌ها، قارچ‌ها و جانوران پست نظیر سخت‌پوستان، حشرات و نرم‌تنان یافت می‌شود. با این وجود، مهره‌داران، گیاهان و پروکاریوت‌ها فاقد کیتین هستند [4].

مهم‌ترین و پرکاربردترین مشتق به‌دست آمده از کیتین، کیتوسان<sup>2</sup> نام دارد. داستیلاسیون جزئی کیتین، روش اصلی استفاده شده برای آماده کردن کیتوسان در صنعت و آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است [5]. کیتین و کیتوسان به دلیل داشتن ویژگی‌هایی چون زیست‌سازگاری، تجزیه‌پذیری، غیر سمی بودن، خواص ضد باکتریایی و ضد اکسندگی و کیلیت کردن یون‌های فلزی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند که باعث کاربرد گسترده‌ی آن‌ها در صنایع مختلف از جمله داروسازی، پزشکی، کشاورزی، تصفیه فاضلاب، صنایع نساجی و ... شده است [۶،۷].

پوسته‌ها و پوشش‌های بندپایان بطورکلی شامل 15-40% کیتین در وزن خشک است [8]. از نقطه نظر کاربردی می‌توان از ضایعات صنایع فرآوری شیلاتی که به مقادیر بسیار زیاد در دسترس است، به عنوان منابع تولید تجاری کیتین بهره‌برداری نمود. تولید کیتین از ضایعات می‌تواند به روش شیمیایی، فیزیکی، آنزیمی و میکروبیولوژیکی صورت گیرد. در روش شیمیایی، استفاده از اسیدها و

1. Chiton  
2. Chitosan

3. Papain

استریل، از پلیت کشت باکتری، تک کلونی برداشته و در لوله‌های حاوی 4 میلی‌لیتر محیط کشت مایع<sup>3</sup> انتقال داده شد. لوله‌ها به مدت 4 ساعت در انکوباتور 37 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند تا باکتری‌ها رشد کنند. بعد از گذشت 4 ساعت، کدورت محیط حاوی باکتری با استاندارد نیم مک فارلند<sup>4</sup> (تعداد  $1/5 \times 10^8$  واحد کلونی باکتری در میلی‌لیتر) سنجش شد و بعد از تنظیم کدورت آن معادل استاندارد نیم مک فارلند، به عنوان مایع تلقیح<sup>5</sup> جهت ادامه فرایند در نظر گرفته شد.

#### 2-4- تخمیر در فلاسک

به منظور تعیین غلظت بهینه‌ی پارامترها، فرایند تخمیر با استفاده از غلظت‌های 0، 10، 15 و 20% وزنی - حجمی گلوکز و 10، 15 و 20% حجمی - حجمی مایع تلقیح، در فلاسک‌های حاوی 5% پوسته‌ی میگو انجام گرفت. فلاسک‌های مذکور، به مدت 4 روز در انکوباتور شیکردار (100 rpm)، در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان 4 روز تخمیر، فاز جامد جدا و بعد از شستشو با آب مقطر، به مدت 24 ساعت در آن 60 درجه‌ی سانتی‌گراد قرارداده شد تا خشک شود [9، 11]. تمامی آزمایشات با سه تکرار انجام پذیرفت.

#### 2-5- آنالیزهای شیمیایی

وزن خشک نمونه باقی‌مانده، بعد از قرار دادن نمونه در آن 60 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت محاسبه گردید [6].

برای تعیین درصد خاکستر، یک گرم نمونه (کیتین و پوسته‌ی میگو)، به بوته چینی منتقل و در کوره‌ای به دمای 500 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 3 ساعت گرما داده شد [13]. درصد خاکستر از فرمول (1) محاسبه گردید:

تولید شده توسط میکروارگانیزم، می‌تواند منجر به شکسته شدن پروتئین به هیدرولیزات پروتئین محلول در آب شود [11].

نظر به اینکه فرایند تخمیر میکروبی بوسیله‌ی پارامترهای مختلف تحت تأثیر قرار می‌گیرد، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر دو پارامتر غلظت گلوکز و مقدار مایع تلقیح بر روی پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی ضایعات میگوی موزی، *penaeus merguensis*، به منظور استخراج کیتین به روش تخمیر میکروبی با استفاده از باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، می‌باشد.

#### 2-2 مواد و روش‌ها

##### 2-2-1- شیمی مواد

تمامی مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک<sup>1</sup> آلمان تهیه شد.

##### 2-2-2- آماده سازی نمونه

پوسته‌ی میگو (*P. merguensis*)، از بازار ماهی فروشان شهر بندرعباس به شکل ضایعات جمع آوری و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از شستشو با آب مقطر، به مدت 24 ساعت در آن 60 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. سپس پوسته‌ها خرد شده و در اندازه‌ی 8-10 میلی‌متر جهت انجام فرایند تخمیر و استخراج کیتین آماده گردید.

##### 2-2-3- کشت باکتریایی و تهیه سوسپانسیون میکروبی

در این مطالعه از باکتری *P. aeruginosa*، به منظور بررسی توانایی آن در تخمیر ضایعات میگو، استفاده شد. باکتری مورد استفاده از موسسه پاستور تهران تهیه گردید. جهت آماده کردن مایع تلقیح، کشت خطی باکتری در محیط مولر هیتون آگار<sup>2</sup> انجام گرفت. در شرایطی کاملاً

3. Mueller-Hinton broth

4. McFarland 0.5

5. Inoculum

1. Merck

2. Mueller-Hinton agar

**3- یافته‌ها****3-1- استخراج کیتین**

در جدول 1، خصوصیات ماده خام اولیه و کیتین حاصل از تیمارهای مختلف نشان داده شده است. در بررسی نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح بر روی میزان وزن خشک، خاکستر و پروتئین، بیشترین میزان این پارامترها در نمونه‌ی شاهد و کمترین در نمونه‌ی حاصل از تخمیر در محیط شامل 20% گلوکز - 20% مایع تلقیح مشاهده شد. نتایج هم‌چنین نشان داد که در محیط شامل 10% و 15% مایع تلقیح با افزایش غلظت گلوکز از 15- 0%، میزان وزن خشک و خاکستر کاهش می‌یابد و در غلظت 20% گلوکز، مقادیر این پارامترها افزایش می‌یابد؛ اما در محیط شامل 20% مایع تلقیح، با افزایش غلظت گلوکز روند کاهشی در میزان وزن خشک و خاکستر مشاهده گردید. سنجش میزان پروتئین نیز نشان داد که در محیط‌های شامل 10%، 15% و 20% مایع تلقیح، با افزایش غلظت گلوکز میزان این پارامتر در نمونه‌های حاصل از تخمیر کاهش می‌یابد. بر اساس نتایج حاصل به طور کلی، اختلاف معنی‌داری بین میزان وزن خشک، پروتئین و خاکستر در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

میزان معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی ضایعات میگو در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح، به ترتیب در شکل‌های 2 و 3 نشان داده شده است. نمونه‌ی حاصل از تخمیر در محیط شامل 20% گلوکز - 20% مایع تلقیح، بیشترین میزان معدنی‌زدایی (76/12%) و پروتئین‌زدایی (86/08%) را نشان داد. در حالی که کمترین میزان معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی به ترتیب در محیط فاقد گلوکز - 20% مایع تلقیح و محیط فاقد گلوکز - 15% مایع تلقیح به دست آمد. نمونه‌های حاصل از تخمیر در محیط فاقد گلوکز با 10% و 15% مایع تلقیح نیز مقادیر پایینی از معدنی‌زدایی را نشان دادند که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با درصد معدنی‌زدایی در این محیط‌ها با محیط فاقد گلوکز و 20% تلقیح مشاهده نشد.

$$100 \times (\text{وزن نمونه اولیه}) / (\text{وزن خاکستر}) = \text{خاکستر (\%)} \quad (1)$$

به منظور استخراج پروتئین از نمونه (کیتین و پودر خام اولیه)، به نمونه (0/05 گرم)، سدیم هیدروکسید 5% اضافه شد (10 میلی‌لیتر) و به مدت 2/5 ساعت در دمای 95 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت [14]. سپس در 5000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به دست آمده برای سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد<sup>1</sup> مورد استفاده قرار گرفت [15]. میزان پروتئین با سرم آلبومین گاوی مقایسه شد. در نهایت به منظور تعیین درصد معدنی‌زدایی<sup>2</sup> و پروتئین‌زدایی<sup>3</sup> (Y) از فرمول (2) استفاده گردید:

$$Y (\%) = [(X_O \times S_O) - (X_R \times S_R)] \times 100 / (X_O \times S_O) \quad (2)$$

که  $X_O$  و  $X_R$  به ترتیب مقدار پروتئین یا خاکستر (g/g) قبل و بعد از فرایند تخمیر و  $S_O$  و  $S_R$  مقدار نمونه اولیه و نمونه باقی مانده (g) بعد از تخمیر می‌باشند [16].

**2- 6- آنالیز FT-IR**

گروه‌های عاملی پودر خشک شده‌ی نمونه‌ی کیتین، توسط آنالیز FT-IR تعیین گردید. در این آزمایش، پودر خشک شده‌ی کیتین با KBr با نسبت 1 به 300 مخلوط و تحت فشار به قرص تبدیل شد و طیف FT-IR با اسکن در محدوده‌ی 500 و 400 بر سانتی‌متر حاصل گردید.

**2- 7- تجزیه و تحلیل داده‌ها**

داده‌های حاصل با کمک نرم افزار SPSS 19 و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح اطمینان 95% مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel 2010 استفاده شد.

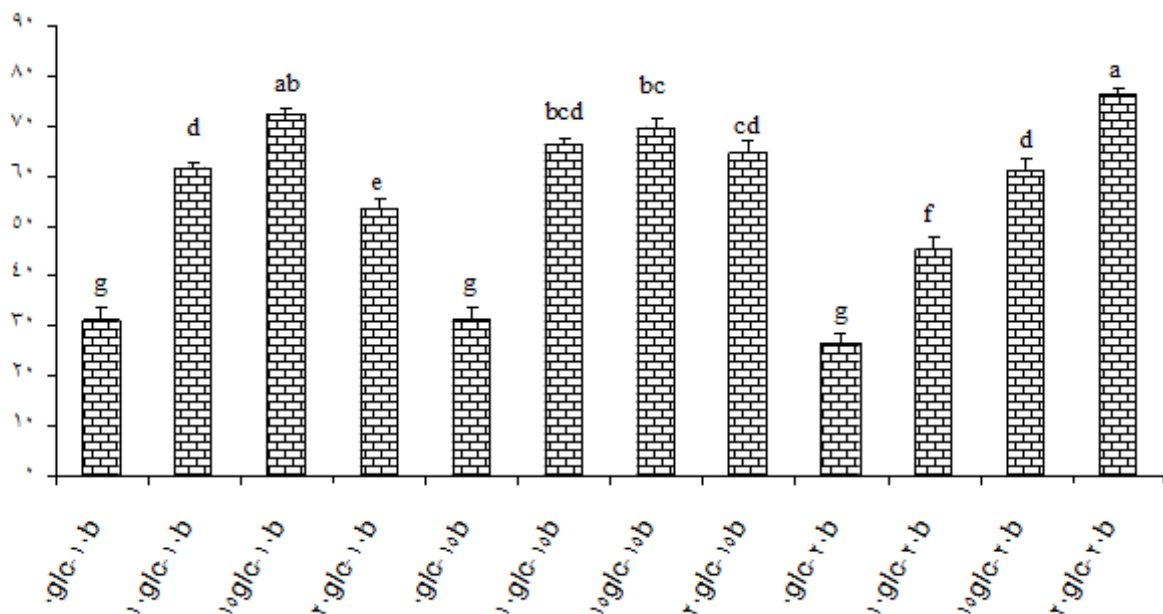
1. Bradford
2. Demineralization
3. Deproteinization

جدول 1 اثر غلظت‌های مختلف گلوکز و مقدار مایع تلقیح روی میزان وزن خشک، خاکستر و پروتئین بعد از 4 روز تخمیر ضایعات با

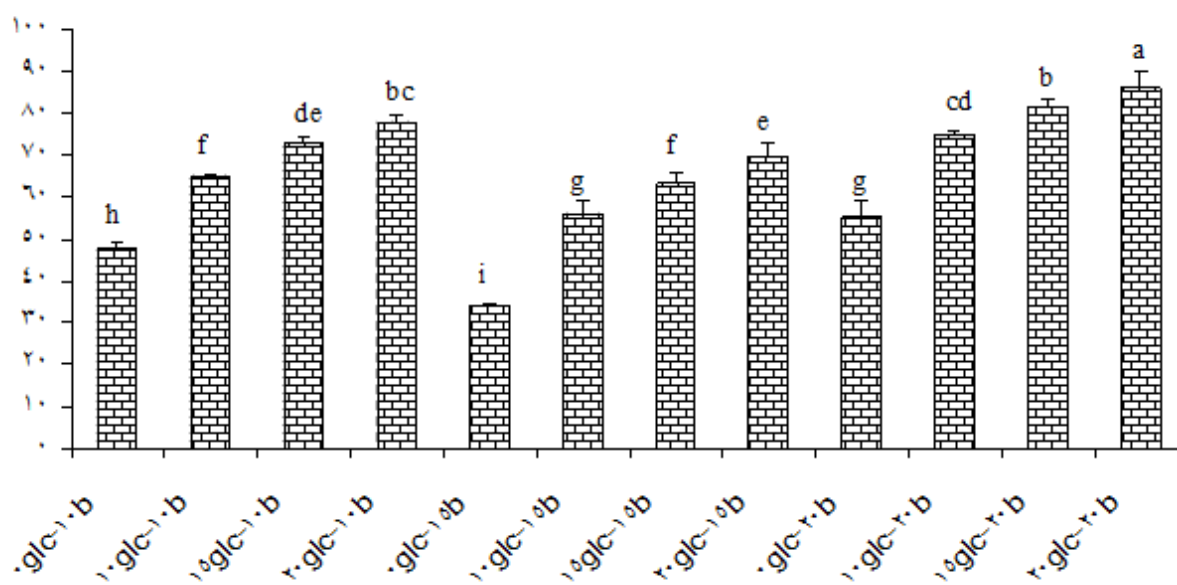
باکتری *P.aeruginosa*

تیمار	مقدار باکتری (%)		غلظت گلوکز (%)	وزن خشک (گرم)	خاکستر (%)	پروتئین (میلی گرم / میلی لیتر)
کنترل				2/15 ± 0/04 <sup>a</sup>	52/5 ± 0/5 <sup>a</sup>	0/90 ± 0/02 <sup>a</sup>
10			0	1/6 ± 0/06 <sup>b</sup>	49 ± 1 <sup>c</sup>	0/63 ± 0/01 <sup>d</sup>
			10	1/25 ± 0/03 <sup>def</sup>	35 ± 2 <sup>def</sup>	0/54 ± 0/02 <sup>ef</sup>
			15	1/15 ± 0/01 <sup>ef</sup>	28 ± 2 <sup>h</sup>	0/45 ± 0/01 <sup>gh</sup>
			20	1/44 ± 0/05 <sup>c</sup>	37 ± 1 <sup>d</sup>	0/21 ± 0/04 <sup>j</sup>
15			0	1/59 ± 0/04 <sup>b</sup>	49/5 ± 0/5 <sup>bc</sup>	0/80 ± 0/02 <sup>b</sup>
			10	1/21 ± 0/04 <sup>def</sup>	33/16 ± 1/04 <sup>f</sup>	0/70 ± 0/03 <sup>c</sup>
			15	1/20 ± 0/02 <sup>def</sup>	31 ± 1 <sup>g</sup>	0/59 ± 0/02 <sup>de</sup>
			20	1/30 ± 0/03 <sup>d</sup>	34/33 ± 1/52 <sup>ef</sup>	0/45 ± 0/03 <sup>gh</sup>
20			0	1/63 ± 0/04 <sup>b</sup>	51/5 ± 0/5 <sup>ab</sup>	0/49 ± 0/01 <sup>fg</sup>
			10	1/26 ± 0/08 <sup>de</sup>	49/5 ± 1/5 <sup>bc</sup>	0/29 ± 0/04 <sup>i</sup>
			15	1/25 ± 0/01 <sup>def</sup>	35/5 ± 1/5 <sup>de</sup>	0/39 ± 0/02 <sup>h</sup>
			20	1/13 ± 0/02 <sup>f</sup>	24 ± 1 <sup>h</sup>	0/22 ± 0/04 <sup>j</sup>

حروف یکسان، عدم اختلاف معنی دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.



شکل 2 اثر غلظت‌های مختلف گلوکز (glc) و میزان تلقیح (b) روی درصد معدنی‌زدایی بعد از 4 روز تخمیر ضایعات با باکتری *P.aeruginosa*. حروف یکسان عدم اختلاف معنی دار و حروف غیر یکسان اختلاف معنی دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.



شکل 3 اثر غلظت‌های مختلف گلوکز (glc) و میزان تلقیح (b) روی درصد پروتئین‌زدایی بعد از 4 روز تخمیر ضایعات با باکتری *P. aeruginosa*. حروف یکسان، عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

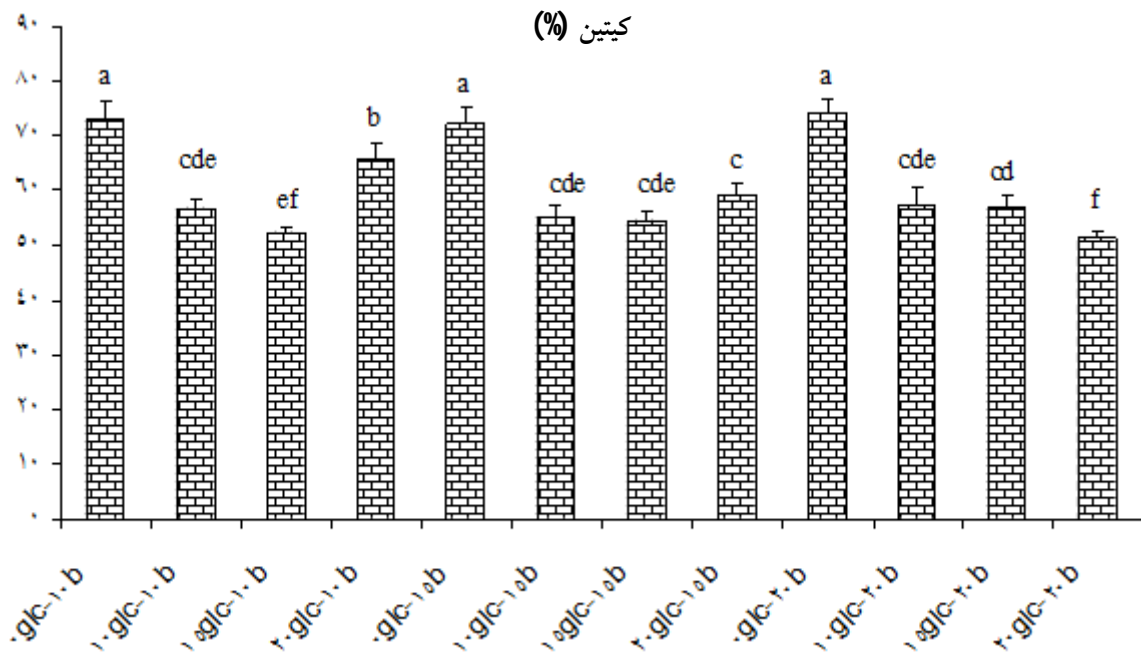
گلوکز - 20% مایع تلقیح به ترتیب، بیش‌ترین و کم‌ترین بازده را نشان دادند. از نظر آماری نیز به طور کلی اختلاف معنی‌داری بین بازدهی تولید کیتین در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). به طور کلی نتایج حاصل از بررسی اثر دو پارامتر، میزان درصد تلقیح و غلظت گلوکز، مقدار بهینه‌ی این پارامترها را 20% نشان داد که منجر به تولید کیتینی با 86% حذف مواد پروتئینی و 76% حذف مواد معدنی گشت.

### 3-2- آنالیز FT-IR

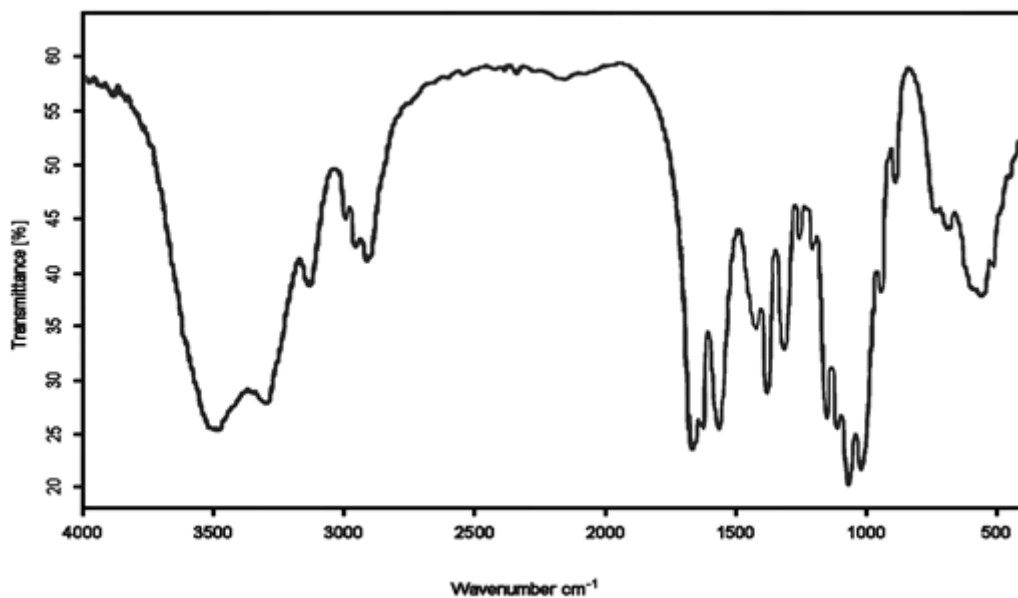
در طیف‌سنجی FT-IR بر روی نمونه‌ی کیتین (شکل 5)، وجود باندهای جذبی در محدوده‌ی  $3400\text{ cm}^{-1}$ ،  $2800\text{ cm}^{-1}$ ،  $1660\text{ cm}^{-1}$ ،  $1550\text{ cm}^{-1}$ ،  $1320\text{ cm}^{-1}$  و  $1090\text{ cm}^{-1}$  بیانگر گروه‌های آمینو استیل و OH-CH موجود در ساختمان کیتین می‌باشد.

همان‌طور که در شکل 2 ملاحظه می‌گردد، در غلظت 10% و 15% مایع تلقیح، میزان معدنی‌زدایی با افزایش غلظت گلوکز تا 15% روندی افزایشی نشان می‌دهد در حالیکه در 20% گلوکز این میزان کاهش می‌یابد. نتایج همچنین نشان داد که با افزایش غلظت گلوکز تا 20%، میزان پروتئین‌زدایی در محیط شامل 20-10% مایع تلقیح، افزایش می‌یابد (شکل 3). در حالت کلی آنالیز آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری بین میزان معدنی‌زدایی و پروتئین‌زدایی در نمونه‌های حاصل از تخمیر در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح نشان داد ( $P < 0.05$ ).

در شکل 4، بازدهی تولید کیتین در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح آورده شده است. همان‌طور که در نمودار مشخص است، بازدهی تولید کیتین در محدوده‌ی 51-74% متفاوت بود. طبق نتایج به‌دست آمده، محیط شامل 0% گلوکز - 20% مایع تلقیح و محیط شامل 20%



شکل 4 بازدهی تولید کیتین در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح. حروف یکسان، عدم اختلاف معنی‌دار و حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های هر ستون را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.



شکل 5 آنالیز FTIR کیتین

3450 و باندهای کششی C-H برای گروه‌های  $\text{CH}_2$  و  $\text{CH}_3$  در محدوده‌ی فرکانسی  $2840\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$  دارای

در کیتین، باندهای کششی N-H در محدوده‌ی  $3400\text{--}3420\text{ cm}^{-1}$  و O-H در محدوده‌ی  $3480\text{ cm}^{-1}$

ضایعات، از طریق آنالیز مقدار خاکستر محاسبه گردید، به طوریکه تیمارهایی با درصد خاکستر کم‌تر، دارای بالاترین میزان خروج کلسیم بودند. در مطالعه‌ی حاضر کم‌ترین میزان خاکستر با 20% گلوکز و 20% مایع تلقیح به دست آمد (جدول 1). مطالعه‌ی Prameela و همکاران (2010)، نشان داد که افزایش مقدار گلوکز، منجر به تولید بیش‌تر لاکتیک اسید شده و در نتیجه‌ی خروج بیش‌تر کلسیم، میزان خاکستر کاهش می‌یابد [20]. در مطالعه‌ی حاضر، در محیط شامل 10% و 15% مایع تلقیح، با افزایش غلظت گلوکز از 15- 0% کاهش در میزان خاکستر مشاهده گردید، اما غلظت 20% گلوکز اثر مهاری بر میزان تولید لاکتیک اسید داشت که با افزایش مقدار مایع تلقیح، این اثر مهاری خنثی گردید (جدول 1).

Rao و همکاران (2000) بیان داشتند که در طول تخمیر ضایعات میگو، پروتئین‌زدایی به وسیله‌ی فعالیت پروتئازای و معدنی‌زدایی به وسیله‌ی اسید تولید شده توسط میکروارگانیزم‌ها اتفاق می‌افتد [21]. استفاده از اسیدهای معدنی مانند هیدروکلریک اسید جهت معدنی‌زدایی کیتین، منجر به اثرات زیان‌آور روی وزن مولکولی و درجه‌ی استیلایسیون می‌شود و به طور منفی خصوصیات طبیعی کیتین خالص شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، استفاده از اسیدهای آلی چون لاکتیک اسید برای فرایند معدنی‌زدایی، یک ایده‌ی نوید بخش می‌باشد؛ چون اسیدهای آلی (لاکتیک اسید) می‌توانند با هزینه‌ی پایین به وسیله‌ی باکتری‌ها تولید شوند، اثرات زیان‌آور کم‌تری بر محیط می‌گذارند و باعث حفظ خصوصیات کیتین خالص شده می‌گردند. بعلاوه، نمک‌های معدنی حاصل از فرایند معدنی‌زدایی، می‌توانند به عنوان عوامل ضدیخ و یا نگهدارنده‌ی سازگار با محیط زیست، استفاده شوند [22]. در مطالعه‌ی پیش رو، معدنی‌زدایی اندک در محیط‌های فاقد گلوکز مشاهده گردید (شکل 2)؛ که به نظر می‌رسد به این دلیل باشد که در محیطی که تنها شامل ضایعات

فرکانس‌های جذبی هستند. همچنین، باند آمیدی دارای دو ناحیه‌ی جذبی در  $1660\text{ cm}^{-1}$  و  $1625\text{ cm}^{-1}$  می‌باشد که مربوط به  $\text{C}=\text{O}$  (گروه کربونیل) است. به طور مشخص، باند  $1660\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوندهای بین مولکولی گروه N-H با گروه کربونیل ( $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ ) و باند  $1625\text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی گروه‌های  $\text{CH}_2\text{OH}$  با گروه کربونیل است ( $\text{C}=\text{O}\cdots\text{HO}-\text{CH}_2$ ) [17].

#### 4- بحث و نتیجه‌گیری

فرایند تخمیر و در نتیجه بازدهی پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی با استفاده از میکروارگانیزم‌ها، تحت تأثیر فاکتورهایی چون مقدار تلقیح، غلظت گلوکز، درجه حرارت، زمان تخمیر، pH اولیه و pH در طول تخمیر می‌باشد [18].

ضایعات سخت‌پوستان منبع ضعیفی از کربن قابل تخمیر می‌باشند؛ لذا به منظور انجام فرایند تخمیر در محیط حاوی این ضایعات، اضافه کردن یک منبع انرژی دیگر به محیط، جهت رشد سلول لازم و ضروری است [11]. تاکنون، منابع کربوهیدراتی بسیاری جهت انجام فرایند تخمیر، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. Cira و همکاران (2002)، نشان دادند که گلوکز، لاکتوز، جو و پودر شیر اضافه شده به محیط شامل ضایعات میگو، باعث افزایش رشد میکروبی و در نتیجه تولید اسید می‌گردند [19]. بدین منظور، در مطالعه‌ی حاضر، از گلوکز، قندی که به سهولت قابل تخمیر می‌باشد، به عنوان منبع کربن استفاده گردید. غلظت گلوکز مورد استفاده از 0 تا 20% متغیر بود. پروتئین‌زدایی و معدنی‌زدایی دو مرحله‌ی کلیدی در استخراج کیتین می‌باشند، بنابراین محاسبه‌ی این دو پارامتر جهت تعیین کیفیت کیتین استخراجی حائز اهمیت است. کلسیم، فراوان‌ترین ماده‌ی معدنی موجود در ضایعات سخت‌پوستان می‌باشد. میزان کلسیم خارج شده از



هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا و غیره، فرایند پروتئین‌زدایی آنزیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این فرایند نمی‌تواند به طور کامل صورت گیرد؛ که این حقیقت می‌تواند به وسیله‌ی عدم دسترسی آنزیم‌ها به برخی پروتئین‌های حفاظت شده به وسیله‌ی کیتین، توضیح داده شود. در حقیقت پروتئین‌ها در لایه‌ی داخلی پوسته‌های میگو به وسیله‌ی لایه کیتینی بیرونی از تأثیر پروتئازها محافظت می‌شوند. به علاوه، به نظر می‌رسد برخی بخش‌های پپتیدی به وسیله‌ی پیوندهای کووالانسی، به تعداد کمی از گروه‌های آمین کرین شماره دو کیتین متصل‌اند؛ بنابراین هیدرولیز پروتئینی بیش‌تری نمی‌تواند اتفاق بیفتد [26].

در مطالعه‌ی حاضر، بازدهی تولید کیتین در محدوده‌ی 51-74% متغیر بود (شکل 4)؛ که نتایج مطالعه‌ی Jung و همکاران (2007) را بهبود بخشید که به ماکزیم مقدار 33% کیتین در تخمیر دو مرحله‌ای ضایعات با باکتری‌های *Serratia* و *Lactobacillus paracasei* KCTC- 3074 *marcescens* FS-3 دست یافتند [6]. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Sini و همکاران در سال 2007 بر روی ضایعات میگو انجام شد، بازدهی تولید کیتین به 93% رسید [27].

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، تخمیر به عنوان یک ابزار جهت تولید زیستی کیتین، می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی متداول با استفاده از اسیدها و بازهای قوی باشد.

## 5- منابع

- [1] Jung, B. O., Roseman, S., and Park, J. K. (2008) The central concept for chitin catabolic cascade in marine bacterium, *Vibrio*. *Macromol. Res.* **16**, 1- 15.
- [2] تقی‌زاده س.م، تک روستا م، داوری گ، یوسفی م، (1383) تهیه کیتوسان با درجه استیل‌زدایی متفاوت و مقایسه روش‌های مختلف شناسایی آن. مجله علوم و

میگوست، هیچ اسیدی به وسیله‌ی باکتری‌ها تولید نمی‌شود که این نتایج، با نتایج مطالعه‌ی Ghorbel-Bellaaj و همکاران (2012)، همخوانی دارد. نتایج آن‌ها نشان داد که اضافه کردن گلوکز به محیطی که شامل ضایعات میگوست اثر قابل توجهی بر میزان پروتئین‌زدایی ندارد، اما تأثیر مهمی بر میزان معدنی‌زدایی دارد [9].

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، بهترین بازده برای معدنی‌زدایی (76%)، در محیط حاوی 20% گلوکز و 20% مایع تلقیح به دست آمد (شکل 2). در پژوهشی که توسط Aytakin و Elibol (2010) انجام شد، حدود 78% خروج مواد معدنی با باکتری *Lactococcus lactis* در محیط حاوی 15% گلوکز، مشاهده گردید که مشابه با نتایج مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد [23]. رشد باکتری، تبدیل گلوکز به لاکتیک اسید و تغییرات pH محیط کشت از جمله عواملی هستند که مقدار خاکستر و در نتیجه معدنی‌زدایی پوسته‌های میگو را تحت تأثیر قرار می‌دهند [24].

بازدهی پروتئین‌زدایی در محدوده‌ی 34-86% در غلظت‌های مختلف گلوکز و مایع تلقیح متفاوت بود (شکل 3). در این مطالعه، پروتئین‌زدایی نیز مانند معدنی‌زدایی به وسیله‌ی غلظت‌های مختلف گلوکز تحت تأثیر قرار گرفت. به طوریکه حداقل میزان مشاهده شده در محیط فاقد گلوکز و بالاترین مقدار در غلظت 20% گلوکز مشاهده گردید (شکل 3). این نتیجه متفاوت از گزارش ارائه شده توسط Aytakin و Elibol (2010) می‌باشد که هیچ ارتباطی بین غلظت گلوکز و میزان پروتئین‌زدایی مشاهده نکردند [23]. مطالعه‌ی حاضر همچنین، نتایج حاصل از مطالعه Wang و Chio (1998) را بهبود بخشید؛ که با استفاده از *P. aeruginosa* K-187 به حداکثر میزان 48% پروتئین‌زدایی بعد از 5 روز تخمیر ضایعات میگو دست یافتند [25].

به طورکلی فاکتورهایی چون درجه حرارت، زمان

- N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **71**, 497- 508.
- [13] A.A.O.C. (1990) Official methods of analysis: Association of official analytical chemists, 13<sup>th</sup> ed, Washington, DC, p **1094**.
- [14] Setoguchi, T., Kato, T., Yamamoto, K., and Kadokawa, J.-i. (2012) Facile production of chitin from crab shells using ionic liquid and citric acid. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 861- 64.
- [15] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248- 54.
- [16] Pacheco, N., Garnica-Gonzalez, M., Ramirez-Hernandez, J.Y., Flores- Albino, B., Gimeno, M., Barzana, E., and Shirai, K. (2009) Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* **100**, 2849- 2854.
- [17] Mohammed, M.H., Williams, P.A., and Tverezovskaya, O. (2013) Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids.* **31**, 166- 171.
- [18] Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, S., Younes, I., Chaabouni, M., Nasri, M., and Jellouli, K. (2013) Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A<sub>1</sub> using response surface methodology. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 243-250.
- [19] Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M., and Shirai, K. (2002) Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem.* **37**, 1359- 1366.
- [20] Prameela, K., Mohan, C.M., and Hemalatha, K.P.J. (2010) Extraction of pharmaceutically important chitin and carotenoid from shrimp biowaste by microbial fermentation method. *J. Pharm. Res.* **3**, 2393- 2395.
- [21] Rao, M.S., Munoz, J., and Stevens, W.F. (2000) Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp bio waste. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 808- 813.
- [22] Khanafari, A., Marandi, R., and Sanatei, Sh. (2008) Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian J Environ Health Sci Eng.* **5**, 297- 291.
- تکنولوژی پلیمر. سال هفدهم، شماره 5، 297 - 291.
- [3] Du, Y., Zhao, Y., Dai, Sh., and Yang, B. (2009) Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innov. Food Sci. Emerg.* **10**, 103- 107.
- [4] Cheba, B.A. (2011) Chitin and Chitosan: Marine Biopolymers with Unique Properties and Versatile Applications. *Biotechnol. Biochem.* **6**, 149- 153.
- [5] Anitha, A., Divya Rani, V.V., Krishna, R., Sreeja, V., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R. (2009) Synthesis, characterization, cytotoxicity, and antibacterial studies of chitosan, O- carboxymethyl and N, O- carboxymethyl and chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **78**, 627- 677.
- [6] Jung, W.J., Jo, G.H., Kuk, J.H., Kim, Y.J., Oh, K.T., and Park, R.D. (2007) Production of chitin from red crab shell waste by successive fermentation with *Lactobacillus paracasei* KCTC-3074 and *Serratia marcescens* FS-3. *Carbohydr. Polym.* **68**, 746- 50.
- [7] Salah, R., Michaud, P., Mati, F., Harrat, Z., Lounici, H., Abdi, N., Drouichi, N., Mameri, N. (2013) Anticancer activity of chemically prepared shrimp low molecular weight chitin evaluation with the human monocyte leukaemia cell line, THP-1. *Int. J. Biol. Macromol.* **52**, 333- 339.
- [8] Kim, W.J., Lee, W.G., Theodore, K., and Chang, H.N., (2001) Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, *Absidia coerulea*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **1**, 6- 10.
- [9] Ghorbel- Bellaaj, O., Younes, I., Maalej, H., Hajji, S., and Nasri, M., (2012) Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 1196- 1201.
- [10] Zhang, H., Jin, Y., Deng, Y., Wang, D., and Zhao, Y. (2012) Production of chitin from shrimp shell powders using *Serratia marcescens* B742 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 successive two-step fermentation. *Carbohydr. Res.* **362**, 13- 20.
- [11] Oh, K.T., Kim, Y.J., Nguyen, V.N., Jung, W.J., and Park, R.D. (2007) Demineralization of crab shell waste by *Pseudomonas aeruginosa* F722. *Process Biochem.* **42**, 1069- 74.
- [12] Kasaai, M.R. (2008) A review of several reported procedures to determine the degree of

- the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 406- 413.
- [26] Ghorbel- Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Manni, L., Salem, M.O., and Nasri, M. (2011) A solvent- stable Metalloprotease produced by *Pseudomonas aeruginosa* A2 grown on shrimp shell waste and its application in chitin extraction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 410- 425.
- [27] Sini, T.K., Santhosh, S., and Mathew, P.T. (2007) Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydr. Res.* **342**, 2423- 2429.
- 19- 24.
- [23] Aytakin, O., and Elibo, I. M. (2010). Cocultivation of *Lactococcus lactis* and *Teredinobacter turnirate* for biological chitin extraction from Prawn waste. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 393- 399.
- [24] Junianto Wahyuntari, B., and Setyahadi, S. (2013) Selection of methods for microbiological extraction of chitin from shrimp shells. *Microbiology.* **7**, 75- 83.
- [25] Wang, S.L., and Chio, S.H. (1998) Deproteinization of shrimp and crab shell with