جایگزینی دِپروتئینه نمودن استخراج کیتین پوسته سخت پوستان با فناوری زیستی

یوسفعلی اسدپور اوصالو

ارومیه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات آرتمیای کشور

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۱

چکیده

کیتین بیوپلیمری با بیش از ۵۰۰۰ مونومر N- استیل گلوکز آمین می‌باشد. استخراج آن براساس روشهای رایج شیمیایی و به طور کلی طی چهار مرحله حذف مواد پروتئینی با استفاده از ترکیبات قلیایی، حذف مواد چربی، حذف مواد معدنی وحذف ماده رنگی صورت می‌پذیرد. استفاده از مواد قلیایی در مرحله حذف مواد پروتئینی سبب ایجاد پدیده‌های تغییر در ساختمان فضایی، دپلیمریزاسیون، افت کیفیت و تخلیه حجم وسیعی از مواد شیمیایی و آلودگیهای زیست محیطی می‌گردد. این مطالعه با هدف جایگزین نمودن آنزیم پروتئولیتیک باکتری *Bacillus subtilis* به جای هیدروکسیدسدیم که یک ماده مخرب محیط زیست می‌باشد، صورت گرفت. نتایج نشان داد که میزان هضم ترکیبات پروتئینی به وسیله آنزیم پروتئولیتیک باکتری *ناکور*۵±۹۰ درصد می‌باشند. کیفیت کیتین به دست آمده با آنالیزهای تجزیه عنصری توسط دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز، پرتونگاری با اشعه ایکس، تعیین لزاجت، وزن مولکولی، درصد بلورینگی، رنگ و ساختار مولکولی مشخص گردید. کیتین به دست آمده دارای مشخصات شناسه‌ای شامل ۴۹/۶ درصد کربن، ۸/۲ درصد نیتروژن، ۷/۵ درصد هیدروژن و ۳۴/۵ درصد اکسیژن بود. از اهم مختصات فیزیکی این فرآورده، متوسط وزن مولکولی $۴/۹\times۱۰^{۶}$ دالتون، درصد بلورینگی ۷۴/۵، لزاجت۳۲ سانتی پوآز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و رنگ سفید بود. ساختار شیمیایی هر واحد کیتین به صورت $C_7H_{12}NO_4$ به دست آمد. نتایج این پژوهش نشان داد که با جایگزینی روشهای بیولوژیکی به جای شیمیایی، دست یابی به این فرآورده با شرایط مناسب و کیفیت بهتری امکان پذیر بوده و درضمن امکان حذف هیدروکسید سدیم غلیظ که یک ماده شیمیایی مخرب محیط زیست می‌باشد فراهم می‌آید.

واژه‌های کلیدی: پوسته میگو، کیتین، روش زیستی، *Bacillus subtilis*، پروتئولیتیک.

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۵۷۳۰۴۷، پست الکترونیکی: dr.asadpour@outlouk.com

مقدمه

کیتین با فرمول شیمیایی $(C_8H_{13}NO_5)_n$ و با نام علمی پلی [بتا، (۴←۱)-۲-استامید و -۲- د اکسی، D گلوکوپیرانز]، یک پروتئوگلیکان است. ساخت کیتین غیر از سنتز در طبیعت، مشکل بوده و بعضاً ناممکن است. این مواد در طبیعت همراه با سایر ترکیباتی نظیر مواد پروتئینی، لیپیدی، معدنی و مواد رنگی تولید می‌شوند (۱۰). به عبارت دیگر کیتین پلیمری خطی متشکل از واحدهای N-acetylglucosamine است که با پیوندهای۱/۴ -β به یکدیگر متصل شده اند . آنزیمهای کیتیناز به دلیل توانایی در تجزیه ترکیبات کیتینی، در تبدیل زیستی به بخشهای تک جزیی یا مونومرها استفاده می شوند (۴).

کیتین برای اولین بار از یک نوع قارچ جدا شد. بعدها ادیر در سال ۱۸۲۸، آن را از پوسته نوعی حشره جدا نمود (۱۱) و در نهایت نام کیتین به مفهوم پوشش یا زره برای آن انتخاب گردید (۱۹). برخی از ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی کیتین شامل خاصیت انبساط و کشیدگی شدید، دارا بودن قدرت پالایش بیولوژیکی در طبیعت، غیرسمی و غیر حساسیت‌زا بودن، خاصیت ضد ویروسی و ضد باکتریایی داشتن، امکان تشکیل ترکیبات پیچیده با یونهای فلزی و هیدروکربورهای آروماتیک، دارای خاصیت ژله‌ای شدن، قدرت بالای جذب مواد رنگی، ابر جاذب بودن وقابلیت فوق العاده برای تبدیل به مواد و مشتقات متعدد در شرایط مختلف می‌باشد. کیتین در بیشتر حلالهای آلی و

Archive of SID

www.SID.ir

معدنی نامحلول بوده و حلال اصلی آن دی متیل استامید با ۵ درصد کلرید لیتیم (DMAC-5%CILi) است (۸). طبق گزارش تهامی و تهامی(۱۳۷۴)، این خصوصیات باعث شده که بیشتر از ۳۰۰ مورد کاربرد و استفاده از کیتین در صنایع داروسازی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، آرایشی، غذایی، تولیدات گیاهی، پالایش آب، پزشکی، کاغذسازی، پالایش فلزات سنگین، تغذیه حیوانات، شیمیایی، نساجی، فیبر و پرتوزدایی به ثبت برسد (۳). عوامل اصلی محدودیت در استخراج این بیوپلیمر عدم دست‌یابی به ماده اولیه به صورت دایمی و فراوان و مشکلات ناشی از افت کیفیت در استخراج با روشهای شیمیایی است (۹).

هر ساله درخصوص بهینه‌سازی روشهای عمل‌آوری و بررسی امکان دست‌یابی به روشهای تازه در استخراج کیتین تحقیقات فراوانی صورت می‌پذیرد (۱۵).

این تحقیق به منظور دست‌یابی به فناوری نوین زیستی استخراج کیتین با استفاده از آنزیمهای باکتریایی که بتواند امکان جایگزین شدن به جای روش شیمیایی را داشته باشد و مشکلات ناشی از افت کیفیت کیتین را برطرف نماید و همچنین رفع مشکل آلودگیهای زیست محیطی ناشی از تخلیه پساب ماده شیمیایی هیدروکسید سدیم غلیظ، صورت پذیرفت.

مواد و روشها

بررسی تحقیقات انجام شده پیشین، مشخص نمود که استخراج کیتین، مطابق روشهای متعددی صورت پذیرفته و به طور کلی استخراج آن براساس چهار مرحله حذف مواد پروتئینی همراه کیتین از مادهٔ خام با استفاده از ترکیبات قلیایی گرم و غلیظ، حذف مواد چربی با اتانول، حذف مواد معدنی با استفاده از ترکیبات اسیدی با غلظتهای متفاوت و حذف ماده رنگی با مواد رنگبر انجام می‌شود. (۱۶).

برای حذف مواد پروتئینی مراحل ذیل صورت می‌پذیرد:

الف- تهیه باکتری: باکتری *Bacillus subtilis* با کد PTCC 1595 از سازمان پژوهشهای علمی- صنعتی کشور به صورت لیوفیلیزه تهیه شد (۱۴).

ب-کشت اولیه باکتری: آمپولهای لیوفیلیزه شده در زیر هود لامینار استریل باز شده به هر کدام ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژیکی استریل اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصله روی محیطهای کشت میکروبی نوترینت آگار و بلاد آگار کشت داده شد. دمای گرماگذاری ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت آن تا ۱۲۰ ساعت در شرایط pH ۷/۲ بود (۲۰).

ج- بررسی نمودار رشد: پس از تعیین تراکم با روش مک‌فارلین. برای تعیین نمودار رشد باکتریایی، طی زمانهای صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از آنها نمونه‌برداری و در لوله‌های سترون حاوی PBS رقیق‌سازی شده و در ادامه با روش شمارش زنده، نمودار رشد باکتری تعیین گردید (۹).

اندازه‌گیری آزمایش الکتروفورز برای تعیین فعالیت آنزیمی به روش زیموگرام: الف- سنجش قدرت فعالیت آنزیمی: از سرعت تغییر رنگ برای تعیین فعالیت آنزیم بر روی سوبسترای رنگی، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تنظیم شده روی طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. بافر این آزمایش شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس به همراه ۱۰ میلی‌مولار کلریدکلسیم و ۰/۲ درصد سرم آلبومین گاوی بود (۱۰).

سپس ۲ نمونه ۵۰ گرمی از پوسته میگو توزین و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد نمونه‌های سترون شده به ارلن سترون ۲/۵ لیتری حاوی۱۰ گرم پودر دی پتاسیم هیدروژن فسفات و یک لیتر آب مقطر، اضافه گردید. پس از تعیین تراکم نمونه‌ها توسط لوله‌های مک فارلین، به هرکدام مقدار ۳

Archive of SID

www.SID.ir

میلی لیتر از کشت ۳ روزه باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* تلقیح شد. pH نمونه ها به کمک اسید پیروفسفریک، بر روی ۷/۲ ثابت گردید. تمامی نمونه‌ها به شیکر- انکوباتور ۱۸۰ دور در دقیقه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ، به مدت ۵ روز منتقل شده و در روز سوم برای کنترل رشد باکتریایی، نمونه برداری صورت گرفت. پس از روز پنجم، کشت متوقف و پس از سترون نمودن در اتوکلاو، در قیف بوخنر با کاغذ صافی جمع آوری شده و سپس شستشو داده شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد خشک گردید. میزان حذف مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتریایی پروتئولیتیک، در این مرحله آزمایش شد.

ب- روش حذف مواد معدنی: برای حذف مواد معدنی موجود در پوسته، محصول به دست آمده از مرحله حذف مواد پروتئینی را در یک بشر ۱ لیتری ریخته و بتدریج مقدار ۳۰۰ CC هیدروکلریک اسید ۰/۵ نرمال (pH=۲)، در سه مرحله ۱۰۰ میلی لیتری و در فواصل ۵ دقیقه یکبار به آن اضافه گردید. ترکیب مذکور به مدت دو ساعت کاملاً بر روی اجاق الکتریکی مگنت‌دار با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به هم زده شده و مخلوط گردید. بعد از طی مدت زمان مذکور نمونه به دست آمده صاف شده و مجدداً مقدار ۵۰۰ CC از همان اسید بر روی نمونه روی کاغذ صافی ریخته شد و درنهایت طی چندین مرتبه تا حذف کامل اسید با آب مقطر شستشو داده شد. محصول باقیمانده در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت سه ساعت در آون خشک شد. در پایان این مرحله میزان حذف مواد معدنی آزمایش گردید.

ج- روش حذف مواد لیپیدی: حذف چربی خام موجود درمحصول به دست آمده، با افزودن ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول پترولیوم بنزن ۹۸ درصد به مدت ۴ ساعت در زیر هود لامینار انجام شد (۷). در پایان این مرحله میزان حذف مواد چرب تعیین گردید.

د- روش حذف مواد رنگی: برای حذف مواد رنگی محصول نهایی ۲۰۰ میلی لیتر از محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۳ درصد به مدت نیم ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد آزمایشگاه استفاده شد.

هـ- روش خالص‌سازی محصول: برای خالص‌سازی محصول استخراج شده از برخی ترکیبات باقیمانده همراه، مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد (وزنی- وزنی) سدیم کلراید، روی محصول حاصله از مرحله پیشین در بشر اضافه گردیده و به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد گرمادهی شد. سپس با آب مقطر سرد کاملاً شستشو داده شد. مرحله بعدی تخلیص، با مقدار ۶۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱۰ درصد (حجمی-حجمی) اسید استیک گلاسیال به مدت یک ساعت دیگر و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد صورت پذیرفت. محصول نهایی با آب مقطر سرد کاملاً شسته شده و پس از ردشدن از قیف بوخنر حاوی کاغذ صافی و منتهی به ارلن خلأ، درنهایت در یک آون با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت خشک گردید .

روش آزمایشهای کیفیت کیتین: الف- روش آزمایش تجزیه عنصری (CHNO-analyser): نمونه‌ها با دستگاه تجزیه عنصری مدل ABB-Bomem مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفتند. بدین منظور یک گرم از نمونه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک و هموژنیزه گردید. سپس نمونه آماده شده در ظرف مخصوص دستگاه از جنس قلع، قرار داده شده و درصد عناصر آن به کمک دستگاه تعیین گردید.

ب- روش طیف‌سنجی مادون قرمز: طیف‌سنجی مادون قرمز با دستگاه ABB-Bomem انجام شد. برای انجام این آنالیز ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از نمونه با پودر برمید پتاسیم مخلوط و در هاون چینی دستی ساییده شد، تا هموژنیزه گردد. سپس با کمک دستگاه پرس مخصوص به صورت صفحات شفاف به ضخامت ۰/۲۵ میلی متری آماده سازی

Archive of SID

www.SID.ir

شد. درادامه نمونه ها در دستگاه طیف سنج قرار گرفته و پس از تنظیمات اولیه، مورد آنالیز طیف‌سنجی واقع شدند.

ج- **روش پرتو نگاری با اشعه ایکس:** بعد از آماده‌سازی نمونه به صورت قرصهای ۴ میلی‌متری، طیف‌سنجی با پراش پرتوهای ایکس انجام شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا مقدار ۳ گرم از کیتین به دست آمده در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت کاملاً خشک گردید. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه آسیاب، تا اندازه ۲۵ میکرومتر پودر شدند. پودر به دست آمده با نیم گرم پودر اسید بوریک بعنوان نگهدارنده و یک گرم ماده هم بند موم سی به خوبی مخلوط گردید. مخلوط حاصله به وسیله دستگاه پرس و قالب‌گیر مخصوص به صورت قرصهای ۴ میلی‌متری آماده شده و به دستگاه طیف‌سنج XRD منتقل گردید و مورد تجزیه و طیف‌گیری قرار گرفت.

د- روش لزاجت‌سنجی (ویسکومتری): پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تنظیم دستگاه ویسکومتر، لزاجت کیتین استخراج شده تعیین شد. حلال مورد استفاده در این روش، محلول دی متیل استامید به همراه ۵ درصد لیتیم کلراید (LiClDMAC-5%) بود.

هـ- روش تعیین وزن مولکولی: وزن مولکولی کیتین براساس معادله مارک- هوینگ $[\eta] = KM_V^{\alpha}$ تعیین شد. در این معادله $[\eta]$ ویسکوزیتی است و K و α ضرایب هستند. حلال مورد استفاده برای کیتین سیست در این روش، محلول دی متیل استامید با ۵ درصد لیتیم کلراید بود که میزان $K = 1.4\times10^{-2}$ و $\alpha = 0.8$ می‌باشد. در این حلال، K ضریب ثابت تفکیک یونی و آلفا ضریب ثابت مارک هوینگ می‌باشد که از جدول مارک- هوینگ به دست می آید.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان راندمان حذف شدگی مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتریایی پروتئولیتیک، ۵±۹۰ درصد است و نتیجه استخراج کیتین از ۵۰ گرم پوسته میگو، معادل ۱۵ گرم کیتین است. نتایج آنالیزهای تعیین کمیت و کیفیت درمورد نمونه تولید شده به شرح جداول و نمودارهای ۱ و ۲ به دست آمد.

در این خصوص فرمول شیمیایی هر واحد تشکیل دهنده کیتین ($C_{7.6}H_{12}N\ O_{4.2}$) به دست آمد .طیف FTIR نمونه کیتین به شرح شکل ۱ به دست آمد.

در طیف سنجی FTIR بر روی کیتین وجود باندهای جذبی ۳۴۸۷/۹ cm^{-1}، ۲۸۹۲/۸cm^{-1}، ۱۵۶۰/۳ cm^{-1}، ۱۶۶۵/۶cm^{-1}، ۱۳۱۹ cm^{-1}، ۱۰۱۹/۱ cm^{-1} وجود گروههای آمینواستیل، C-H-OH در پلیمر کیتین را نشان می دهد.

براساس نتایج پراش اشعه ایکس، پیک شاخص در زاویه ۱۹/۵ تتا تشکیل شده است که مختص شاخص بلوری پلیمر کیتین است. براساس نتایج جدول آنالیز پراش اشعه ایکس درصد بلورینگی در پیک ۱۹/۵ به دست آمده است، که معادل ۳۶/۴ درصد می‌باشد.

نتایج آنالیزهای کمی و کیفی محصولات حاصله نشان می دهد که می توان با روش زیستی کیتین تولید نمود.

جدول ۱- نتایج آنالیز تجزیه عنصری کیتین حاصله از روش زیستی

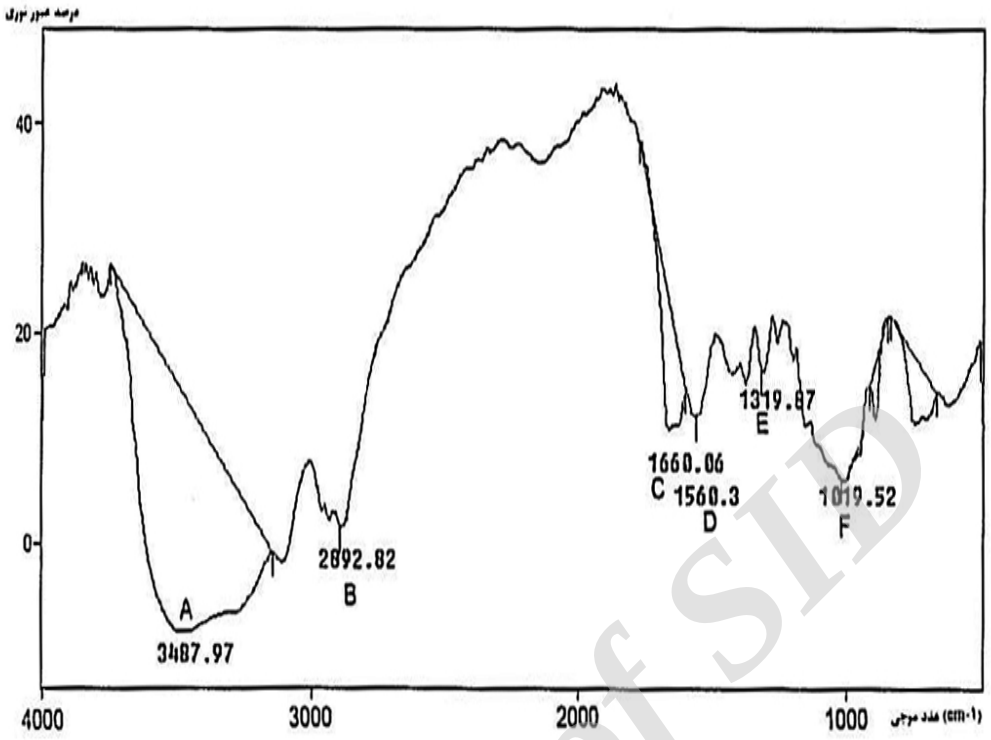
نوع عنصر	کربن	نیتروژن	ئیدروژن	اکسیژن
درصد عنصر	۴۹/۶	۸/۲	۷/۵	۳۴/۵

جدول ۲- نتایج وزن مولکولی، ویسکوزیتی، رنگ استیل زدایی درصد بلورینگی کیتوزان به دست آمده به روش زیستی

متوسط وزن مولکولی	ویسکوزیتی cps	رنگ	درصد بلورینگی
$۴/۹\times۱۰^{۶}$	۳۱	سفید کم رنگ	۷۴/۵

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- طیف FTIR نمونه کیتین حاصله از روش زیستی

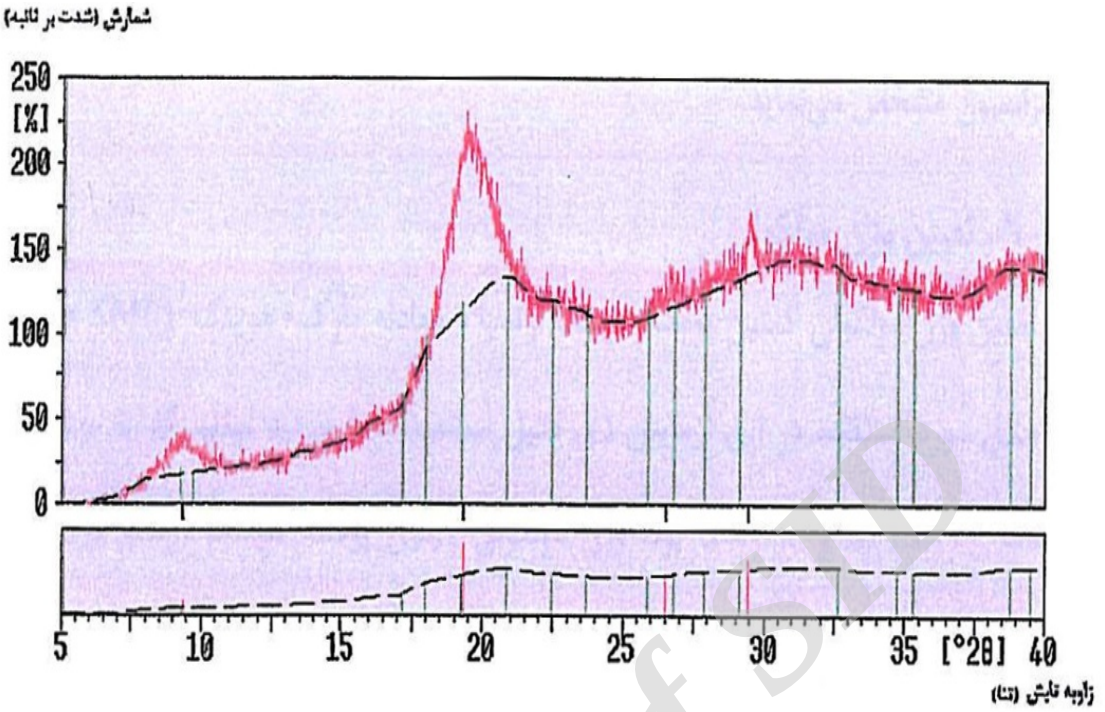
بحث

باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در صنایع دباغی، شوینده‌ها، زیست فناوری و غیره استفاده می‌شود. در روش زیستی به جای استفاده از هیدروکسید سدیم در مرحله پروتئین زدایی کیتین، از آنزیمهای پروتئولیتیک این باکتری استفاده شد. کیتینازها یکی از آنزیمهای صنعتی مهم محسوب می‌شوند که از اهمیت به سزایی در خصوص تجزیه مواد کیتینی، پاکسازی محیط زیست و کنترل قارچهای پاتوژن گیاهی و آفات دارند که با شکستن اتصالات گلیکوزیدی β-1,4 سبب تجزیه کیتین می‌شوند (۱). در یکی از مطالعات اخیر از محیط حاوی سوبسترای کیتین به منظور بررسی تولید آنزیم کیتیناز استفاده شد. پلیتها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد و پس ازاین مدت مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم کیتیناز بود (۲).

باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* مولد آنزیمهای پروتئولیتیک و فاقد آنزیم کیتیناز بوده و بنابراین بر روی کیتین بی‌تأثیر می‌باشد. میزان حذف کنندگی مواد پروتئینی به وسیله آنزیم باکتریایی پروتئولیتیک ۵±۹۰ درصد است. در نتیجه از ۵۰ گرم پوسته میگو در این تحقیق، معادل ۱۵ گرم کیتین به دست آمد که این راندمان با بازدهی حاصله از روش شیمیایی پژوهش Shahidi و Arachchi (۲۰۱۰)، همخوانی داشته و احتمالاً می‌تواند نشان دهنده قابلیت جایگزینی روش بیولوژیکی به جای روش شیمیایی باشد (۱۷).

مقایسه درصد عناصر به دست آمده از تجزیه عنصری کیتین پوسته میگو در این روش، با مقادیر کیتین منتج از روش استاندارد آلدریج و سیگما، بیانگر مشابهت نتایج این دو روش بود. در نتایج مطالعات Araki و Ito (۲۰۰۷) در مورد استخراج این بیوپلیمر از پوسته گریل نیز به تشابه نتایج تجزیه عنصری و روش آلدریج و سیگما آورده شده است (۵) که در مجموع می‌تواند کارآیی روش بیولوژیکی در جایگزینی روش شیمیایی را بنمایاند.

Archive of SID
www.SID.ir



D I F F R A C T I O N L I N E S :

Angle [°2θ]	d-value α1 [Å]	d-value α2 [Å]	T.width [°2θ]	Height [counts]	Backgr. [counts]	Rel.int. [%]	Signific
6.225	14.18638	14.22178	0.200	3	3	0.3	0.80
8.620	10.24979	10.27500	0.640	15	27	1.5	1.26
12.490	7.08126	7.09868	0.480	30	76	2.9	1.09
14.035	6.30502	6.32053	0.160	151	96	14.5	0.99
16.820	5.26680	5.27976	0.200	210	132	20.2	1.87
18.605	4.76533	4.77705	0.480	262	156	25.2	2.05
19.740	4.49382	4.50487	0.320	380	172	36.4	1.24
20.890	4.24896	4.25941	0.080	488	185	46.8	0.75
21.500	4.12976	4.13992	0.200	511	193	49.0	1.07
21.970	4.04247	4.05241	0.240	380	199	36.4	0.79
23.855	3.72713	3.73630	0.560	222	225	21.3	2.89
25.290	3.51880	3.52746	0.400	130	243	12.5	0.89

شکل ۲- طیف XRD حاصله از کیتین

طیف سنجی FTIR بر روی کیتین حاصله، بیانگر وجود باندهای جذبی cm^{-1} ۳۴۸۷/۹، cm^{-1} ۲۸۹۲/۸، cm^{-1} ۱۵۶۰/۳، cm^{-1} ۱۶۶۵/۶، cm^{-1} ۱۳۱۹ و cm^{-1} ۱۰۱۹/۱ گروه‌های آمینواستیل، C-H-OH در پلیمر کیتین بود. نتایج پژوهش حاضر مطابق پیشرفته‌ترین روشهای طیف سنجی برای تعیین ساختار گروههای عامل مجهول، نوع پیوند بین

Archive of SID
www.SID.ir

مولکولها و ترکیبات شیمیایی آلی پلیمر به دست آمد. از این رو نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج طیف‌سنجی کیتین روش استاندارد سیگما آلدریچ مطابقت داشت (۱۳).

بررسیهای انجام شده به منظور استخراج کیتین با روشهای رایج شیمیایی، بیانگر افت کیفیت محصول کیتین درپی انجام این روشها بود (۱۲ و ۲۰)، که موجب ایجاد محدودیتهایی در به کارگیری این بیوپلیمر می‌شود. این معضل اساساً ناشی از استفاده از هیدروکسید سدیم در مرحله حذف مواد پروتئینی در فرآیند عمل‌آوری کیتین است، زیرا موجب ایجاد پدیده‌های تغییر ساختمان فضایی و دپلیمریزاسیون (شکسته شدن زنجیر) کیتین می‌گردد. Claus (۲۰۰۰) نیز در تحقیقات خود در مورد کیتین و کیتوزان مستخرج از پوسته میگوها، وجود چنین مشکلاتی را گزارش نموده است (۸).

کیتین از به هم پیوستن واحدهای N-استیل گلوکز آمین تشکیل شده است (۴). وجود مونومرهای آزاد گلوکز آمین در کیتین به دست آمده در این روش نشان دهنده شکسته شدن زنجیره گلوکزآمین است که این حالت به پدیده دیپلیمریزاسیون معروف است. در روشهای شیمیایی استخراج کیتین، پدیده دپلیمریزاسیون رخ می دهد که ناشی از تأثیر هیدروکسید سدیم می‌باشد. و وقوع این پدیده در تحقیقات انجام گرفته توسط Arcidiacono و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش گردیده است (۶) که تأکیدی بر این نظریه است که ایجاد پدیده دپلیمریزاسیون و شکسته شدن زنجیره پلیمر، سبب کاهش وزن مولکولی می‌شود. بدین ترتیب بالا بودن وزن مولکولی کیتین استخراج شده در این تحقیق در مقایسه با نوع استاندارد به دست آمده از روش شیمیایی از شرکت سیگما توجیه می‌شود. علاوه براین نتایج مطالعه Hein و همکاران (۲۰۰۱) نیز بر امکان صحت این نظریه تأکید می‌نماید (۱۰). براساس گزارش Peberdy (۲۰۱۰)، استفاده از هیدروکسید سدیم موجب تغییر ساختمان فضایی پلیمر کیتین و کاهش درصد بلورینگی این پلیمر نیز می‌گردد که خود نوعی پدیده دپلیمریزاسیون است (۱۵). براساس نتایج گزارش Susana و همکاران (۲۰۰۰)، در روش شیمیایی استخراج کیتین بعلت استفاده از هیدروکسید سدیم در حذف ترکیبات پروتئینه به طور ناخواسته تا حدود ۵ درصد پدیده استیل زدایی ضمنی ایجاد می شود (۱۸)، ولی در روش زیستی بکار رفته در این تحقیق، این پدیده حذف می شود. لذا می‌توان بیان داشت که استحصال کیتین خالص در طبیعت با روش شیمیایی امکان ندارد، و این موضوع اهمیت این روش را نشان می دهد.

مشکل اساسی روشهای رایج شیمیایی در استخراج کیتین، به کارگیری هیدروکسیدسدیم مخرب محیط زیست است که براساس دستآوردهای این پژوهش می توان با استفاده از آنزیمهای پروتئولیتیک باکتری *Bacillus subtilis* به جای مواد و روشهای شیمیایی در مرحله دپروتئینه کردن، این مشکل را برطرف نمود.

نتیجه گیری

جایگزینی روش زیستی به جای روشهای رایج شیمیایی در استخراج کیتین باعث حذف آلودگیهای زیست محیطی شده و بدین وسیله از تخلیه حجم وسیع پساب ماده شیمیایی هیدورکسید سدیم، به اکوسیستم ممانعت به عمل می‌آید. همچنین تولید زیستی این مواد باتوجه به کاربرد گسترده کیتین و کیتوزان به صور مختلف در صنایع داروسازی، آرایشی، زیست فناوری پزشکی و غیره، می تواند جایگزین مناسب محصولات مشابه وارداتی گردد.

وجود برخی اختلافهای جزیی موجود در برخی خصوصیات کیتین استخراج شده از پوسته میگو با این روش، احتمال می‌تواند ایجاد مشتقات جدید با کاربردهای تازه را به دنبال داشته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

ساختار شیمیایی هر مونومر کیتین حاصله ($C_7H_{12}NO_4$) تعیین شد که با ساختار مندرج در منابع استاندارد آلدریج و سیگما ایالات متحده همخوانی دارد و بیانگر موفقیت در تولید این محصول با آنزیمهای پروتئولیتیک به جای هیدروکسیدسدیم است.

قدردانی

این پژوهش براساس طرح مصوب سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی به شماره مصوب ۲-۷۹-۱۲-۹۲۱۴۹ و به شماره ثبت ۴۷۶۶۸ مورخه۹۴/۶/۱۲ به انجام رسید. بدین وسیله از همکاری مراکز آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس، پژوهشکده شرکت نفت، پژوهشگاه پلیمر، مؤسسه علوم تحقیقاتی شیلات ایران و مرکز تحقیقات آرتمیای کشور نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱ – امروزی، ز.، امین زاده، س.، کارخانه ای، ع.ا. و علی‌خواجه، ج.، ۱۳۹۴. بررسی نقش آمینواسیدهای اطراف توالی جایگاه فعال در فعالیت آنزیم کیتیناز باکتری *Serratia Marcescens* B۴A. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۸(۲): ۲۵۶-۲۷۰.

۲ – امینی، ل.، صعودی، م.ر. و نصر، ش. ۱۳۹۴. جداسازی مخمرها از شالیزارهای برنج و بررسی کیفی آنزیمهای کاتابولیک برون زیز در دو مخمر از جنس *Pseudozyma*. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. ۲۸(۱): ۲۳-۳۴.

۳ – تهامی، م و تهامی، م. ۱۳۷۴: استخراج کیتین از پوسته خرچنگ، میگو و لابستر، مرکز تحقیقات شیلات بندرعباس، گزارش نهایی، ۸۶ صفحه.

۴ – مطرودی، س.، زمانی، م.ر. و مطلبی، م. ۱۳۹۴. بهینه سازی شرایط بیان آنزیم کیتیناز۴۲ کایمری در میزبان پروکاریوتی و مقایسه فعالیت آن با آنزیم کیتیناز۴۲ . مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی . ۲۸(۲): ۲۷۹-۲۸۹.

5- Araki, Y. and Ito, E.A.2007. Pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*enzymatic de-acetylation of chitin. Biochemical and Biophysical Resourcesb56: 669-45.

6 - Arcidiacono, S., Lombardi, S.J. and Kaplan, D.K.2010. Fermentation, Processing and enzyme characterization for chitosan biosynthesis by *Mucor rouxii* in chitin and chitosan, (eds Skjak-Brake, G.,Anthonsen, T. and Sanford, A.). Elsevier. Applied science, New York 319P.

7 - Borel, A. G. and Abbott, F. S. 1993. Metabolic profiling of clobazam, a 1, 5-benzodiazepine, in rats. Drug metabolism and disposition 21(3): 415-427.

8 - Claus, J.W., Biobased packaging materials for the food industry" in Dairy and Food Science, Biopolymers, Denmark 13-40.

9 - Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. and Trevino, EA. 1990. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. (Eds E.J. Baron, L.R. Peterson and S.M. Finegold), Mosby Co: StLouis, Missouri, pp 171-194.

10 - Hein, S., Chuen, N., Chandrkrachang, S. and Stevens, F. A. 2001.Systematic approach to quality assessment system of chitin", in *Asian Institute of Technology* Internet pdf.

11 - King, G.A. 2014. Insect tales: Stable isotope evidence of Romano-British socioeconomic activities in northern England. Quaternary International 341: p.110-118.

12 - Laidter, K. J.1973. The Chemical kinetics of NaOH action." 2nd, ed, Oxford, New York.

13 - Muzzarelli, R.A., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., Chitin in nature and technology". Plenum press, New York. 295 p.

14 - Noudeh, G.D., Moshafi, M.H., Kazaeli, P. andAkef, F. 2010. Studies on bioemulsifier production by *Bacillus licheniformis* PTCC 1595. African Journal of Biotechnology 9(3): p.1-7.

15 - Peberdy, J.F. 2010. "Biotechnological approaches to the total utilization ofcrustacean shellfish waste". In Euro. Commission. Supported. STD.-3 projects (1992- 1995), Internet, pdf.«http://user. Chollian. net/~Chitin/» 5 P.

16 - Rinaudo, F., Chiabrando, F., Lingua, A. M. and Spanò, A. T. 2012. Archaeological site monitoring: UAV photogrammetry can be an answer. International Archives of the

Archive of SID
www.SID.ir

Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences 39(B5): p.583-588.

17 - Shahidi, F. and Arachechi, J.K.2010. Food applications of chitin, Elsevier Journal of Food Sciences and Technologies 10: p.37-51

18 - Susana, L., Ronan, D., Shamlou, P.A. and Dunill, P. 2000. Biochemical engineering approaches to the challenges of Producing Pure Plasmid DNA. Internet. Pdf. «http://Wilv. Co. Uk/ zemned J' clinical.

19 - Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. and Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Trends in biotechnology 18(7): p.305-312.

20 - Ymele-Leki, P. and Ross, J. M.2007. Erosion from *Staphylococcus aureus* biofilms grown under physiologically relevant fluid shear forces yields bacterial cells with reduced avidity to collagen. Applied and environmental microbiology 73(6): p.1834-1841.

Replacement of protein extraction from chitin of the crustacean's carapace by biotechnology

Asadpour-Ousalou Y.A.

National Artemia Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran

Abstract

Chitin is a Biopolymer with more than 5000 N- acetyl glucosamine monomer. Its extraction occurs by conventional chemical methods and overall four steps; removal of proteins using alkaline compounds, removal of fat, minerals eliminating and dye remove. Using alkaline materials in the removal of protein, cause changes in the structure of space, De-polymerization, quality decrease and a large number of chemical materials and environmental pollution. This study was done to replace proteolytic enzyme of *Bacillus subtilis* bacterium instead of sodium hydroxide, a substance that is damaging for the nature. The results showed that the mentioned bacterium is able to digest 90±5 % of protein compounds by photolytic enzymes. Quality of the gained chitin was investigated by using of an infrared spectrometer to analysis the element structure. Also by x-rays radiography and via determination the viscosity, molecular weight, crystallinity percent, color, and molecular structure. The gained chitin has had a profile introduction containing of 49.6 % carbon, 8.2 % nitrogen, 7.5 % hydrogen and 34.5 % oxygen. Their physical characteristics were showed as 4.9×10^6 Dalton average molecular weight, 74.5 % crystallinity, 32 °poise viscosity oriented at 20 °C, and white color. The chemical structure of each unit of chitin was obtained as $C_7H_{12}NO_4$. The results show that replacement of a biological method rather than chemical methods to achieve this production with the right conditions could help to achieve the better quality products and may cause eliminating the use of environmentally harmful chemical environmental pollution such as heavy sodium hydroxide.

Key words: Shrimp carapace, Chitin, Biomethod, *Bacillus subtilis*, proteolytic.

Archive of SID

www.SID.ir