DOI: 10.22092/vj.2017.110788.1319
شماره ۱۱۹ تابستان ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی تهیه آنزیم های لیزوزیم و ناتوکیناز در سوبسترای کیتینی پوسته *Portunus pelagicus* و *Litopenaeus vannamei*

• سارا هردانی
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی دریا، گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، خرمشهر، ایران
• بیتا ارچنگی (نویسنده مسئول)
استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
• حسین ذوالقرنین
دانشیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
• اسحاق زمانی
استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۳-۱۵ تاریخ ۱۳۹۶-۰۸-۳۰
Email: Bita.archangi@gmail.com

چکیده

در این تحقیق، تولید آنزیم‌های لیزوزیم و ناتوکیناز توسط باکتری‌های انتخابی در محیط کشت حاوی پودر پوسته‌های کیتینی میگوی *Litopenaeus vannamei* و خرچنگ *Portunus pelagicus* ارزیابی شد. نمونه‌های میگو از بازار ماهی فروشان در خرمشهر جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری خرچنگ نیز از نواحی بین جزر و مدی سواحل خوزستان در خلیج فارس انجام شد. جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم از روش‌های رنگ‌سنجی در سوبسترای اتیلن گلیکول کیتین و لیزوپلیت در سوبسترای *M. luteus* و جهت تایید تولید آنزیم ناتوکیناز از روش لیز شدن لخته خون استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان واحد آنزیمی لیزوزیم سویه *P. aeroginosa* در روش لیزوپلیت ۶/۴۷ U/ml، در روش رنگ سنجی معادل ۳۵/۲ U/ml و میزان NAG آزاد شده حاصل از فعالیت آن، ۰/۰۹۱ mg/ml و میانگین فعالیت آنزیم ناتوکیناز خام تولیدی سویه *B. subtilis*، ۳۷/۴ درصد بود. بنابراین، علاوه بر حذف موفقیت‌آمیز پسماندهای کیتینی از محیط زیست و استحصال کیتین خالص می‌توان با استفاده از باکتری‌های انتخابی، آنزیم‌های لیزوزیم و ناتوکیناز را تولید نمود. آنزیم‌های مذکور، پس از بهینه‌سازی صنعتی، در پزشکی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

کلمات کلیدی: سوبسترای پسماند کیتینی، لیزوزیم، ناتوکیناز، *Portunus pelagicus*. *Litopenaeus vannamei*

Veterinary Researches & Biological Products No 119 pp: 33-41

Investigation of the preparationof lysozyme and nattokinase enzymes in chitinous shells media of *Litopenaeus vannamei* and *Portunus pelagicus*

By: Hardani, *S., MSc. Marine Biotechnology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Archangi, B., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. Zolgharnein, H., Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. and Zamani, I., Assistant Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.*

Received: 2017-06-05 Accepted: 2017-11-21

Email: Bita.archangi@gmail.com

In this research, production of lysozyme and nattokinase enzymes by selected bacteria in chitinous shells culture media of *Litopenaeus vannamei* and *Portunus pelagicus* were evaluated. Shrimp specimens were collected from fish market centers in Khorramshahr. Crab sampling was undertaken from intertidal areas of Khuzestan coasts, Persian Gulf. For lysozyme enzyme activity, colorimetric assay with ethylene glycol chitin and lysoplate method with *M. luteus* as substrate were applied. To evaluate nattokinase production, human blood clot lyses method was used. Results showed that unit of lysozyme activity for *P. aeroginosa* with lysoplate method was 6.47µg/ml, colorimetric method was 35.2 U/ml and NAG released by enzyme activity was 0.091 mg/ml, respectively. Average unit of nattokinase activity for *B. subtilis* was also %37.4. Therefore, in addition to successful removal of chitinous wastes from environment and extraction of pure chitin, it is possible to manufacture lysozyme and nattokinase enzymes with selected bacteria. These enzymes can be used in medical and pharmaceutical applications after industrial optimization.

Key words: Chitinous waste substrate, Lysozyme, Nattokinase, *Litopenaeus vannamei, Portunus pelagicus*

مقدمه

در سال‌های اخیر، افزایش روزافزونی در بهره‌برداری از منابع آبزیان ثبت شده است به طوری که میزان تولیدات آبزیان دریایی (صید و آبزی پروری) تا سال ۲۰۱۴ به ۱۶۷/۲میلیون تن می‌رسید که این مقدار نسبت به سال‌های قبل روند صعودی داشته است (۱). به طور کلی ۲۵ درصد از صید، به عنوان ضایعات و مواد زائد در نظر گرفته می‌شود (۲) که۶۰-۲۰ درصد از مواد خام اولیه را تشکیل می‌دهند و شامل بخش‌های باقیمانده آبزیان است (۳). در میان منابع کیتینی طبیعی، پسماندهای شیلات (پوسته‌ی میگو و خرچنگ) دارای بالاترین محتوا هستند و ۸۰-۶۰ درصد از کل میگو و خرچنگ را تشکیل می‌دهند (۴). کیتین، پلیمری با وزن مولکولی بالا و با ساختار خطی(۵) است و به عنوان یک لایه ساختاری و محافظ در گیاهان و قارچ ها عمل می‌کند و به فرم کریستالی در طبیعت دیده می‌شود (۶). کیتین ترکیبی پلی ساکاریدی بوده که شامل گروه‌های استامید با فرمول شیمیایی $(C_6H_{11}O_4)_n$ و با نام علمی β (۱-۴)۲- استامیدو-۲-داکسی دی-گلوکو پیرانوز است. واحدهای مونومری کیتین، ان- استیل- دی- گلوکوزآمین(GLcNAc) بوده که مونومری از پیوند کووالانسی β(۱-۴) می‌باشد (۶).

میگوی *Litopenaeus vannamei* و خرچنگ *Portunus pelagicus* بدلیل داشتن گوشت بازار پسند، باارزش‌ترین و پرطرفدارترین سخت پوستان دریایی هستند. همه ساله مقادیر زیادی از پسماندهای ارگانیک میگو و خرچنگ از بازارهای فروش آبزیان، سواحل، مناطق عمل‌آوری غذاهای شیلاتی و همین طور مراکز بسته‌بندی و صادرات میگو و خرچنگ تولید شده که صرفنظر از بازیافت آن‌ها مقداری نیز به عنوان خوراک دام، طیور و آبزیان (۷) مصرف می‌شود. این پسماند طبیعی بخصوص در نواحی گرمسیری و استوایی باعث تجمع حشرات موذی و عوامل بیماری‌زا، تشدید رشد باکتریایی و ایجاد بوی ناخوشایند در اثر فساد زودرس می‌گردد. علاوه بر آن، تجمع این پسماندها مکانی بدنما و ناخوشایند برای توریست‌ها و جمعیت‌های محلی ایجاد می‌کند. بنابراین بنظر می‌رسد جهت بازیافت این پسماند طبیعی و تجدیدپذیر، تلفیق روش‌های تیمار آزمایشگاهی مؤثر و تکنولوژی ضروری باشد. فرایند دفع پوسته‌های خرچنگ و میگو عمدتا به سبب حل نشدن در آب و مقاومت در برابر تجزیه زیستی مشکلات تکنولوژیکی زیادی ایجاد می‌کند. آشکار است که از لحاظ زیست محیطی و اقتصادی باید تکنولوژی مناسبی برای جلوگیری از فساد یا تاخیرآن و تبدیل این مواد زیستی به محصولات با

ارزش بکار رود (۸). به طور کلی امروزه استفاده از پسماندهای سخت پوستان به سه دلیل مورد توجه پژوهشگران واقع شده است؛ این مواد زائد بسیار فاسد شدنی بوده و آلودگی‌های زیست محیطی ایجاد می‌کنند؛ از سوی دیگر، غنی از پروتئین، کیتین و رنگدانه بوده (۹) و به وفور در دسترس هستند و میکروب‌های مختلفی قادر به استفاده از چنین بسترهایی به عنوان منبع کربن و انرژی در فرایند تولید آنزیم‌هایی نظیر پروتئاز، لیپاز، کیتیناز، پراکسیداز، اکسیداز و غیره می‌باشند. از مزیت‌های تولید آنزیم با فرایندهای بیوتکنولوژی از پسماندهای کیتینی می‌توان به دلایلی از جمله میزان بهره‌وری بالاتر، ساده بودن، کاهش انرژی مورد نیاز اولیه و کاهش هزینه‌های تولید نام برد (۴). علی‌رغم اهمیت موضوع، متاسفانه سهم کشور از بازار فناوری زیستی دریا در حد صفر بوده و سرمایه‌گذاری در این حوزه بسیار ضروری می‌باشد (۷). تاکنون مطالعاتی در زمینه استفاده از سوبسترای کیتینی پوسته میگو در تولید آنزیم کیتیناز در کشور انجام شده است (۱۰، ۱۱، ۱۲) ولی در زمینه تولید آنزیم لیزوزیم و ناتوکیناز در این سوبسترا پژوهشی انجام نشده است.

آنزیم لیزوزیم (مورامیداز) یا ان- استیل- مورامیدگلیکانوهیدرولاز (۱۳) آنزیمی طبیعی است که بر باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر ضد میکروبی و بر باکتری‌های گرم منفی بی تاثیر می‌باشد. عدم تاثیر بر باکتری‌های گرم منفی، استفاده صنعتی آنزیم مذکور را محدود کرده است (۱۴). این آنزیم، یکی از مهم‌ترین ترکیبات نگهدارنده و ضدمیکروبی است که بطور فراوان در طبیعت یافت شده و به وسیله گیاهان، قارچ ها، باکتری‌ها، پرندگان و پستانداران تولید می‌شود (۱۵). پژوهش‌های انجام شده بر روی خالص‌سازی آنزیم کیتیناز تولید شده توسط سویه‌های *P. aeruginosa* K-187 (۱۶) و *Bacillus amyloliquefaciens* V65 (۱۷) در محیط کشت حاوی پودر پوسته کیتینی میگو و خرچنگ، دو عملکرد همزمان تولید آنزیم کیتیناز/ لیزوزیم خارج سلولی را نشان داده است.

ناتوکیناز، آنزیم ترومبولیتیکی قوی است و بر خلاف نامش آنزیم کینازی نیست؛ بلکه یک سرین پروتئاز از خانواده باکتری‌های Subtilisin است (۱۸). لخته‌های خون از فیبرینوژن که توسط ترومبین تشکیل شده، ساخته شده‌اند و توسط پلاسمین که با بافت فعال‌کننده پلاسمینوژن فعال می‌شود، لیز می‌شوند. عوامل ترومبولیتیک معمول، اوروکیناز و بافتی از نوع فعال‌کننده پلاسمینوژن (tissue-type Plasminogen Activator) هستند (۱۹) که منبع انسانی داشته و بنابراین ایمن بوده ولی در عین حال گران قیمت می‌باشند. به همین دلیل، آنزیم‌های فیبرینولیتیک میکروبی جهت استفاده در داروسازی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲۰). آنزیم‌های فیبرینولیتیک میکروبی بویژه آنزیم‌هایی که از سطوح میکروارگانیسم‌های مواد غذایی حاصل می‌آیند، اهمیت زیادی در افزودنی‌های مواد غذایی و داروها، درمان یا توقف بیماری‌های قلبی و عروقی و سایر بیماری‌های وابسته دارند (۲۱). تولید ناتوکیناز توسط سویه‌های *Pseudomonas sp.* TKU 015 (۲۰) و *B. subtilis* TKU 007 (۲۲) در سوبسترای پودر پوسته میگو توسط برخی محققان گزارش شده است. هدف از تحقیق حاضر، ضمن حذف پسماندهای کیتینی، تولید کیتین و ارزیابی تولید آنزیم‌های لیزوزیم و ناتوکیناز در این سوبسترا به عنوان منبع کربن- نیتروژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های پوسته میگوی گونه *Litopenaeus vannamei* از مراکز فرآوری و بسته‌بندی محصولات شیلاتی در خرمشهر تهیه گردید. نمونه‌برداری از خرچنگ گونه *Portunus pelagicus* از نواحی جزرو مدی سواحل خوزستان و در زمان جزر کامل انجام شد. پوسته‌های میگو و خرچنگ پس از انتقال به آزمایشگاه، از ضایعات گوشت و محتوای پروتئینی آن بصورت دستی جداسازی شده و سپس با آب مقطر شست و شو داده شد. پوسته‌ها سپس بمنظور آبگیری و خشک شدن در محیط با تهویه مناسب قرار داده شدند. نمونه‌ها توسط آسیاب Sayona model MKII ۱۷۶-SY پودر شده و درون شیشه در بسته‌ی تاریک در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند.

در این تحقیق پودر لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، L-تیروزین، NAG (N-acetyl-D-glucosamine) و DNS (dinitrosalicylic acid-۳,۵) از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیایی و محیط‌های کشت از شرکت مرک آلمان و با بالاترین کیفیت تهیه گردید. برای آنالیزهای آماری و همچنین ترسیم منحنی‌های استاندارد از Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

تهیه سوبسترا و کشت میکروبی

در تهیه کیتین از روش اصلاح شده پورمراد و همکاران (۲۳) استفاده شد. سوبسترایی که برای سنجش فعالیت لیزوزیم مورد استفاده قرار گرفت، اتیلن گلیکول کیتین بوده که با روش اصلاح شده‌ی یامادا و ایموتو (۲۴) تهیه گردید. برای ارزیابی تولید آنزیم لیزوزیم دو سویه باکتریایی *Pseudomonas aeroginosa* PTCC۱۷۰۷ و *Micrococcus luteus* PTCC۱۴۰۸ و برای آنزیم ناتوکیناز، سویه باکتریایی *Bacillus subtilis sub sp. subtilis* PTCC۱۷۲۰ بصورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های ایران تهیه شد و مراحل لازم برای تبدیل آنها به کشت فعال صورت گرفت. رشد باکتری *P. aeroginisa* PTCC۱۷۰۷ در محیط کشت براث حاوی مواد کیتینی بر اساس روش وانگ و چانگ (۱۶) با کمی تغییرات انجام شد.. باکتری‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ rpm)، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت براث شامل (W/V): ۳ درصد پودر پوسته‌ی خرچنگ و میگو، ۰/۱ K_2HPO_4 درصد، $MgSO_4$,7 H_2O ۰/۱ درصد، $(NH_4)2SO_4$ ۰/۱ درصد، $ZnSO_4.7H_2O$1/0 درصد، (pH =۹) کشت شدند. سپس جهت سنجش میزان لیزوزیم خام تولیدی در مایع رویی، محیط کشت در ۱۰۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رشد باکتری *B.subtilis* PTCC۱۷۲۰ در محیط کشت براث حاوی مواد کیتینی بر اساس روش وانگ و همکاران (۲۰۰۹) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ rpm)، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت براث شامل (W/V): ۱ درصد پودر پوسته ی خرچنگ و میگو، ۰/۱ K_2HPO_4 درصد، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۰۵ درصد (pH=۷) انجام شد. سپس جهت سنجش فعالیت آنزیم خام، مایع رویی محیط کشت در ۱۰۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۲۰).

سنجش واحد آنزیمی

تولید لیزوزیم توسط باکتری مورد نظر به دو روش کدورت سنجی با اتیلن گلیکول کیتین به عنوان سوبسترا بر اساس روش ایموتو و یاجیشیتا (۲۵) و ترسیم منحنی استاندارد لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ و ان- استیل گلوکز آمین(NAG) در طول موج ۴۲۰ nm و روش لیزوپلیت (۲۶) در محیط کشت مولر هینتون آگار و با کشت چمنی *M. luteus* PTCC۱۴۰۸ (مطابق استاندارد نیم مک فارلند) به عنوان باکتری حساس به لیزوزیم مورد بررسی قرار گرفت. در روش کدورت سنجی و زمانی که از اتیلن گلیکول کیتین به عنوان سوبسترا استفاده می شود، یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقداری از آنزیم که ۱ molμ قند احیا را در هر دقیقه آزاد کند، تعریف می شود (۱۶). برای سنجش میزان فعالیت فیبرینولیتیکی ناتوکیناز از روش لیز شدن لخته های خون وریدی توسط آنزیم خام استفاده شد (۲۷). برای کنترل منفی نمک عادی تشکیل شده از ۰/۲۵درصد $CaCl_2$ و برای کنترل مثبت از هپارین طبی استفاده گردید.

نتایج

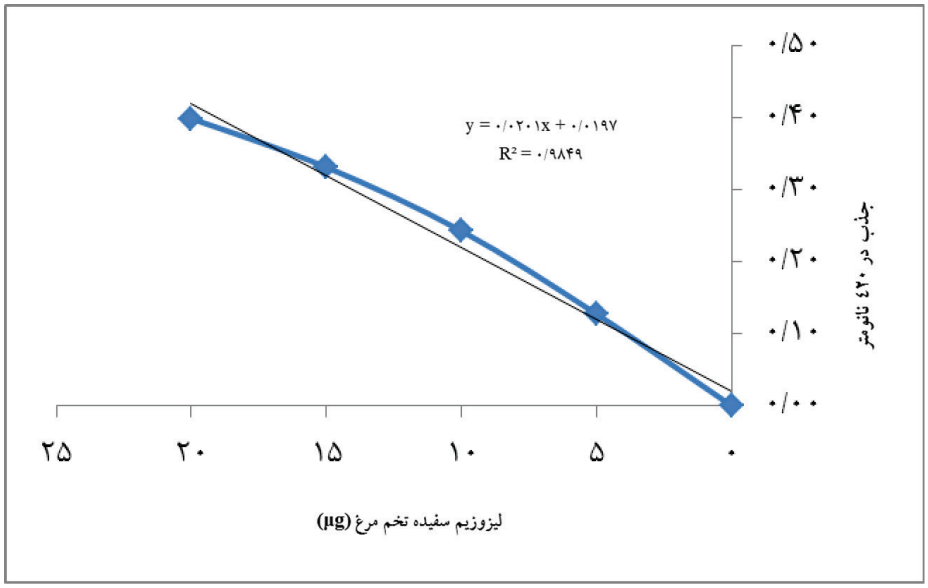
میزان واحد فعالیت آنزیمی لیزوزیم تولید شده از سویه *P.aeroginosa* طی ۷۲ ساعت رشد در محیط کشت حاوی پودر پوسته میگو و خرچنگ، براساس منحنی استاندارد (شکل ۱) معادل ۳۵/۲ U/ml و میزان NAG آزاد شده حاصل از فعالیت آن و بر اساس منحنی استاندارد (شکل ۲)، ۰/۰۹۱ mg/ml محاسبه گردید.

حداکثر فعالیت لیزوزیم در روش لیزوپلیت، بر اساس منحنی استاندارد قطر هاله شفاف عدم رشد در غلظت‌های مختلف لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (شکل ۳)، ۶/۴۷ U/ml محاسبه شد.

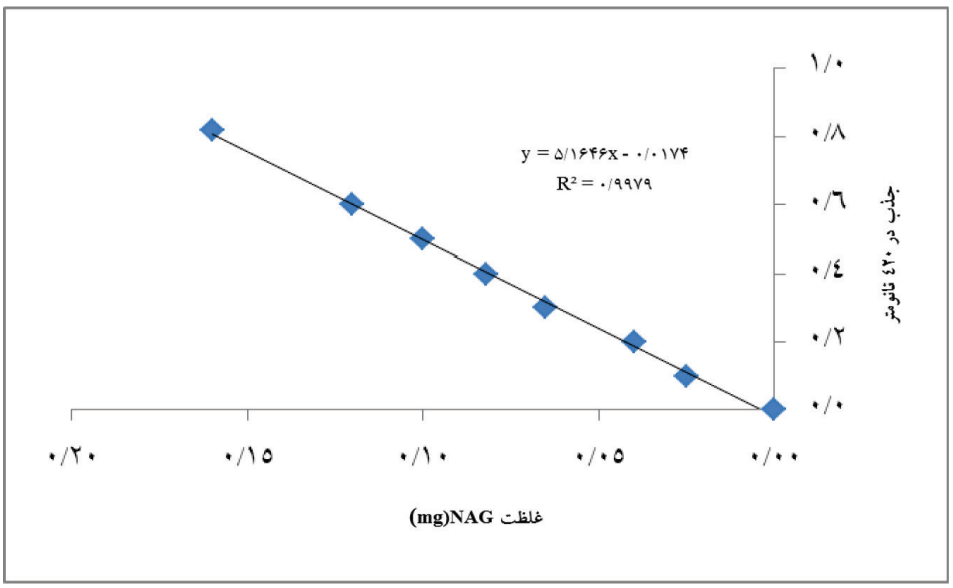
فعالیت فیبرینولیتیکی آنزیم ناتوکیناز خام تولیدی از سویه‌ی *B. subtilis*، به طور میانگین ۳۷/۴ درصد اندازه‌گیری شد (شکل ۴). فعالیت ۷۰ درصدی لیز شدن لخته مربوط به آنزیم خالص هپارین می‌باشد. جهت ارزیابی خاصیت کازئینولیتیکی ناتوکیناز تولید شده، منحنی استاندارد L- تیروزین ترسیم گردید (شکل ۵). یک واحد آنزیمی فعالیت کازئینولیتیکی، مقداری از آنزیم است که در طی یک دقیقه، یک میکرومولار تیروزین آزاد کند (۲۸). حداکثر واحد فعالیت کازئینولیتیکی ناتوکیناز، ۰/۱۵ U/ml محاسبه گردید.

بحث

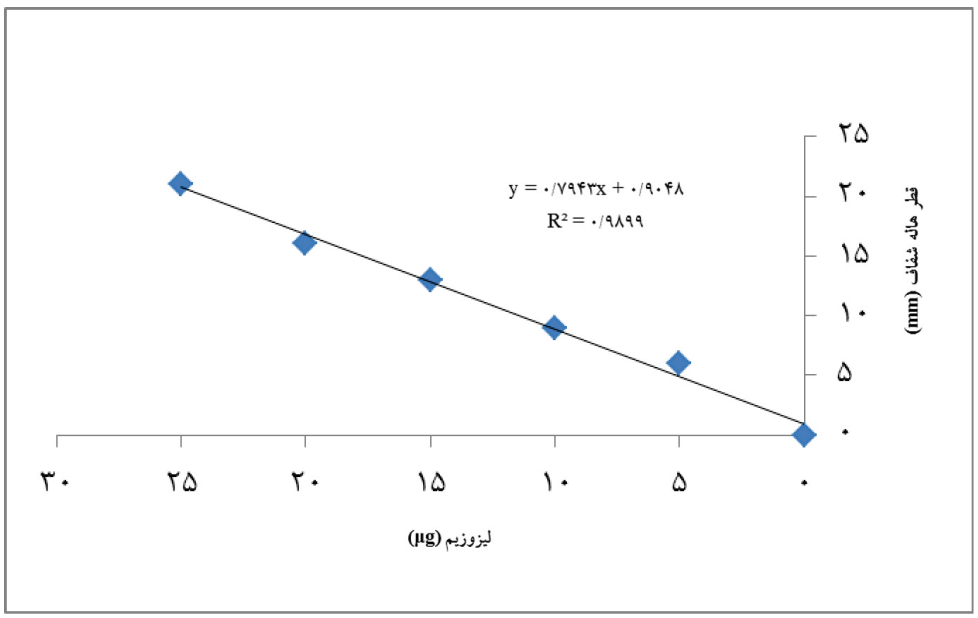
تاکنون پژوهش‌های محدودی در مورد تولید آنزیم‌های لیزوزیم و ناتوکیناز توسط باکتری‌های انتخابی در محیط کشت پودر پوسته میگو و خرچنگ به ثبت رسیده است. در سنجش وانگ و چانگ (۱۹۹۷) میزان فعالیت لیزوزیمی باکتری *P. aeruginosa* K-187 رشد یافته در محیط کشت حاوی پودر پوسته میگو و خرچنگ، معادل ۳۹/۲ U/ml محاسبه شد که از مقداری که در این پژوهش اندازه‌گیری شده، کمی بیشتر است. البته این باکتری دو نوع کیتیناز هم تولید می‌کند که خاصیت لیزوزیمی دارند و بر مجموعه فعالیت لیزوزیمی کل، اثر گذارند. معمولا دو روش برای محاسبه واحد فعالیت آنزیمی وجود دارد: در روش اول واحد فعالیت آنزیمی به طور قراردادی به تغییرات جذب در واحد زمان اطلاق می‌شود. به طور مثال یک واحد فعالیت آنزیمی ممکن است مقداری از آنزیم باشد که تغییرات جذب را در سنجش خاصی از ۰/۰۱ تغییر جذب در هر دقیقه نشان می‌دهد. در این نوع سنجش هیچ تلاشی برای نشان دادن تصویری از مقدار سوبسترای تبدیل شده به محصول انجام



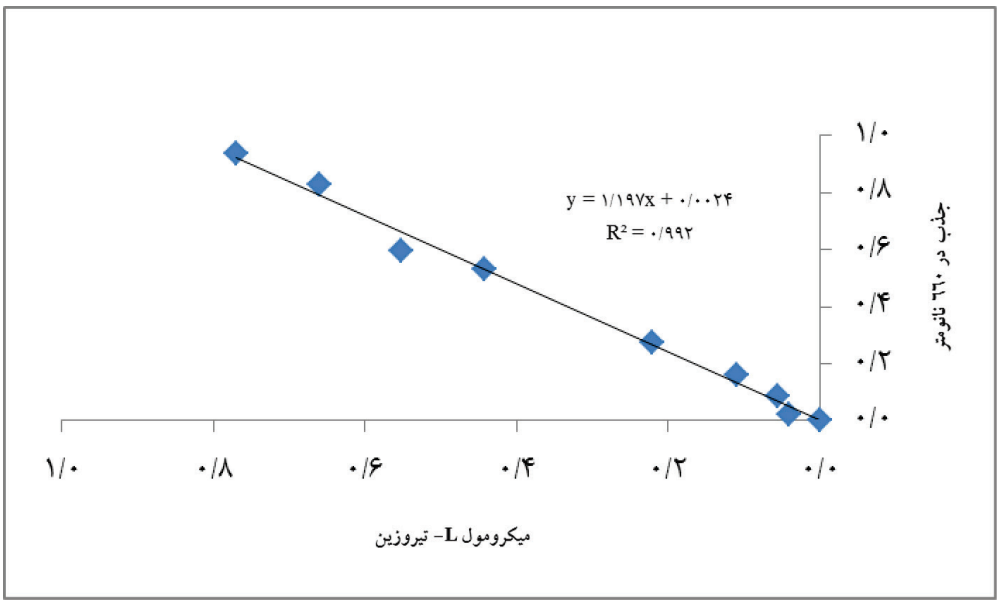
شکل ۱- منحنی استاندارد فعالیت لیزوزیم سفیده تخم مرغ در بافر استات۰/۱ مولار(pH= ۴/۵)



شکل ۲- منحنی استاندارد ان- استیل گلوکز آمین برای بررسی فعالیت لیزوزیم

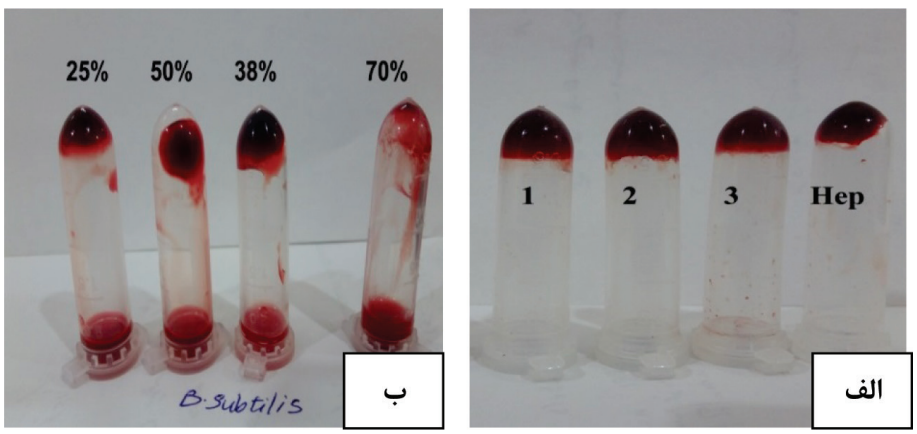


شکل ۳- منحنی استاندارد قطر هاله شفاف، در غلظت های مشخصی از لیزوزیم سفیده تخم مرغ



شکل۵- منحنی استاندارد L- تیروزین جهت بررسی خاصیت کازئینولیتیکی ناتوکیناز

نمی‌شود که این روش در اکثر مقالات دیده می‌شود. روش دوم که سنجش لیزوزیم انجام شده در این تحقیق بر مبنای آن است، مقدار محصول تولید شده در واحد زمان (µmol/min) را نشان می دهد. مزیت این روش محاسبه نرخ تبدیل کاتالیکی آنزیمی (Catalytic Turnover Rate of Enzyme) می‌باشد. این روش جذب را بر اساس مقدار محصول تولید شده یا هم ارز آن و در واقع مقدار مصرف سوبسترا اندازه‌گیری می‌کند. این روش هم می‌تواند با رسم منحنی استاندارد باشد و هم با استفاده از ضریب جذب (Extinction Coefficient) انجام شود. با این روش میزان واحد فعالیت آنزیمی لیزوزیم تولید شده از سویه *P. aeroginosa* طی ۷۲ ساعت رشد در محیط کشت حاوی پوسته میگو و خرچنگ، ۱۱۶ U/ml محاسبه گردید. میزان فعالیت آنزیمی لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ سیگما، تحت شرایط خاص (۲۷۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH =۲/۶) در حدود ۱۲۵۳۰ units/mg گزارش شده است (۲۹). استفاده از اتیلن گلیکول کیتین در سنجش فعالیت لیزوزیم در این پژوهش چندین مزیت دارد. به این ترتیب که این روش مقادیر بسیار کم لیزوزیم را هم اندازه‌گیری می‌کند. محلول گلیکول کیتین به خودی خود باعث کاهش



شکل ۴- لیزشدن خون وریدی انسان توسط آنزیم ناتوکیناز خام تولیدی از سویه ***B. subtilis***:
لخته های خونی قبل از افزودن آنزیم خام به آنها (الف) و بعد از افزودن آنزیم خام (ب)

رنگ نمی‌شود؛ این به این معناست که ماده استفاده شده درجه بالایی از پلیمریزاسیون با مجموعه کمی از گروه‌های احیا دارد که هیدرولیزهای نامشخص گلیکول کیتین تحت این شرایط سنجش، به کار گرفته نمی‌شوند (۲۵).

Bacillus subtilis IAM 12118 که در کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران به نام *Bacillus subtilis sub sp. subtilis* PTCC۱۷۲۰ شناخته شده است، باکتری گرم مثبت تولید کننده ناتوکیناز در محیط کشت حاوی پودر پوسته میگو و خرچنگ است (۳۰).

طبق گزارش آرادهای و همکاران، میزان انحلال خون وریدی در پروتئاز دارای خاصیت فیبرینولیتیکی باکتری *M. luteus* ۵ درصد است (۳۱) که از مقدار اندازه‌گیری شده در این پژوهش کمتر است. تولید ناتوکیناز به چندین پارامتر بستگی دارد که برای هر سویه میکروبی، متفاوت است. از جمله این پارامترها می‌توان به منبع نیتروژن-کربن، pH، دما و اندازه ذرات محیط کشت اشاره کرد (۲۷). جهت بررسی‌های بیشتر در خصوص مقدار واحد فیبرینولیتیکی و اطلاعاتی در مورد نحوه و شرایط تولید پروتئاز دارای خاصیت فیبرینولیتیکی لازم است آزمایشاتی نظیر سنجش میزان تجزیه فیبرین (فیبرین پلیت) انجام گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به افزایش روزافزون فعالیت‌های صنعت شیلات و آبزی‌پروری در حوزه فرآوری محصولات شیلاتی، امروزه حجم عظیمی از پوسته‌های سخت پوستانی نظیر میگو و خرچنگ در کشور تولید می‌شود. این پسماندهای کیتینی با ارزش، یا سوزانده شده یا به کود و غذای دام تبدیل می‌شوند و یا در بسیاری موارد در محیط زیست به حال خود رها می‌شوند که این امر معضلات زیست محیطی فراوانی را به دنبال دارد. استخراج کیتین و کیتوزان از پسماندهای کیتینی به وفور انجام شده ولیکن تبدیل این پسماندهای حاوی کیتین به اتیلن گلیکول جهت سنجش فعالیت لیزوزیم و همینطور سوبسترای ارزان قیمت در تولید آنزیم‌های میکروبی به ندرت گزارش شده است. در این پژوهش برای اولین بار از این ماده در سنجش فعالیت لیزوزیم (حتی مقادیر کم در نمونه) استفاده گردید. هدف در این پژوهش، ارزیابی تولید آنزیم‌های مورد نظر در محیط کشت حاوی مواد کیتینی بوده است بهمین دلیل امکان تولید آنزیم مورد بررسی قرارگرفته است. بمنظور تولید انبوه و در مقیاس صنعتی، آنزیم‌های باارزش افزوده بالا، غنی‌سازی محیط کشت‌های میکروبی و خالص‌سازی آنزیم‌ها امری ضروری و لازم‌الاجرا می‌باشد. روش‌های به کار گرفته شده در این پژوهش، علاوه بر سادگی، تا حد بسیار زیادی به حذف معضل پسماندهای محیطی، کمک نموده و علاوه بر آن تکنولوژی بکار رفته همگی بر پایه روش‌های همسو با محیط زیست بوده است. نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌تواند به عنوان اطلاعات بنیادی در زمینه بهینه‌سازی و امکان سنجی تولید آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. انجام تحقیقات مشابه در حوزه فناوری‌زیستی دریا می‌توانند گام موثری در جهت پیشبرد اهداف اقتصاد مبتنی بر دانش در کشور باشند.

منابع مورد استفاده

1- FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture Contributing to food security and nutrition for all. Rome. Available online at: http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf.

2- FAO. 2007. La situation mondiale des peˆches et de l'aquaculture 2006. De´partement des peˆches et de l'aquaculture; Rome. Available online at: http://www.fao.org/3/a-a0699f.pdf

3- Gaiker and C. Tecnológico. 2004. Handbook for the prevention and minimization of waste and valorization of by-products in European agro-food industries. Agro-food waste minimization and reduction network (AWARENET) 1–7.

4- Ben-Rebah, F. and Miled, N. 2013. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review.3 *Biotechnology* 3(4): 255–265.

5- Dufresne, A. 2010. Natural rubber green nanocomposites, In: Thomas, S.; Stephen, R. (ed.), Rubber Nanocomposites: Preparation, Properties and Applications. Wiley, Singapore (Asia) 113–146 pp.

6- Khor, E. 2014. Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise. 1st Edition. Burlington, Elsevier Science 154 pp.

7- Ghavampour, A. 2009. By-product in fish processing, applications and economic value. Department of Fisheries Khuzestan Province No 32. 1pp. (In Farsi).

8- Jayakumar, R., M. Prabaharan, S. V. Nair. and H. Tamura. 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advance* 28: 142–150.

9- Archer, M., R. Watson and J. W. 2001. Fish waste production in the United Kingdom -The quantities produced and opportunities for better utilization. The sea fish industry authority sea fish technology. 1-57.

10- Zarei, M. 2008. Production of chitinase as biological products from microorganisms in 116 wastewater shrimp farms. PhD thesis, Khorramshahr University of Marine Science and Technology. Khorramshahr, Iran. (In Farsi).

11- Salahi nezhad, T., Z. Heshmatipour and M. Hashemi caruei. 2014. Isolation, characterization and assessment the antifungal potential of chitin-degrading bacteria isolation from rhizosphere soil. *Microbials world Journal of Islamic Azad University of Jahrom* 7(1): 66-74. (In Farsi).

12- Mousavi, S. M. A., A. Dehnad, Sh. Kamali and M. Pour soultan. 2011. Evaluation of antifungal effect and activity of chitinase19 from one strain of Iranian native *Streptomyces griseus*. *Microbial biotechnology of Islamic Azad University Journal* 3 (10): 1-6. (In Farsi).

13- Naidu, A.S. 2000. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC

Press, Culinary and Hospitality Industry Publications Services, Washington, 1– 4 pp.

14- Lari, M. A., R. Ramazani and S. Amiri. 2013. Chemical modification of lysozyme with dextran by using Maillard reaction and evaluating the antimicrobial properties of the modified enzyme. *Journal of food science and nutrition* 11(1): 5-15. (In Farsi).

15- Gill, A.O and R.A. Holley. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24C. *International Journal of Food Microbiology* 80: 251-259.

16- Wang, S. L. and W. T. Chang. 1997. Purification and characteriazation of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 380–386.

17- Wang, S.L., I. L. Shih, T.W. Liang. and C. H. Wang. 2002. Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2241–2248.

18- Rasagnya, P. S. and M. Vangalapati. 2013. Studies on optimization of Process Parameters for nattokinase production by *Bacillus subtillis* NCIM 2724 and purification by liquid-liquid extraction. *International Journal of Innovatine Research in Science, Engineering and Technology* 2(9): 4516-4521.

19- Jeong, Y. K., J. U. Park, H. Baek, S. H. Park, I. S. Kong, D.W Kim and W. H. Joo. 2001. Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 89–92.

20- Wang, S. L., S. J. Chen, T.W. Liang. and Y. D. Lin. 2009. Anovel nattokinase produced by Pseudomonas sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry* 44: 70–76.

21- Agrebi, R., A. Haddar, N. Hmidet, K. Jellouli, L. Manni and M. Nasri. 2009. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochem* 44(11): 1252-1259.

22- Wang, S. L. and P. Y. Yeh. 2008. Purification and characterization of a chitosanase from a nattokinase producing strain *Bacillus subtilis* TKU007 using shrimp shell powder as a medium. *Process Biochemistry* 43: 132–138.

23- Pourmorad, F., P. Ebrahimi, M.A. Ebrahimzadeh, S. Honari and M. Orangian. 2005. Degree of deacetylation of chitosan produced from shrimp shells. *Journal of Mazandaran university of medical sciences* 15(50): 27-34. (In Farsi).

24- Yamada, H. and T. Imoto. 1981. A convenient synthesis of glycolchitin, a substrate of lysozyme. *Carbohydrure Research* 92: 160-162.

25- Imoto, T. and K. Yagishita. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry* 35(7): 1154–1156.

26- Osserman, E. F. and D. P. Lawlor. 1966. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *The journal of experimental medicine* 1.124(5): 921-52.

27- Chandrasekaran, S. D., M. Vaithilingam, R. Shanker, S. Kumar, S. Thiyur, V. Babu, J. N. Selvakumal and S. Prakash. 2015. Exploring the in vitro thrombolytic activity of nattokinase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS. *Jondishapur Journal of Microbiology* 8(10): e 23567.

28- Dubey, R., J. Kumar, D. Agrawala, T. Char and P. Pusp. 2011. Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (nattokinase, streptokinase and urokinase) from bacterial sources. *Africa Journal Biotechnology* 10: 1408-20.

29- Helal, R and M. F. Melzig. 2008. Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay. *Pharmazi* 63:415–419.

30- Sumi, H., S. Ikeda and T. Ohsugi. 2009. Increasing the Production of Nattokinase and Vitamin K2 in Natto with Dipicolinic Acid. *The Open Food Science Journal* 3: 10-14.

31- Aradhye, P .K. and M.D. Chavan. 2015. Production, characterization and In-vitro study of fibrinolytic enzyme from locally isolated *Micrococcus luteus* B-07. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences* 4(8): 775-783.