Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):527-534

Identification of native isolation, FUM1, isolated from poultry farm of Mashhad countryside and improving its keratinolytic activity by optimizing of environmental conditions using one factor at a time methodology

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mehrban S.[1] *MSc,*
Sharifmoghadam M.R.*[1] *PhD,*
Bahreini M.[1] *PhD,*
Asoodeh A.[2] *PhD,*
Korozhdehi B.[3] *PhD*

How to cite this article
Mehrban S, Sharifmoghadam M.R, Bahreini M, Asoodeh A, Korozhdehi B. Identification of native isolation, FUM1, isolated from poultry farm of Mashhad countryside and improving its keratinolytic activity by optimizing of environmental conditions using one factor at a time methodology. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):527-534.

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Agricultural Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Agriculture & Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran

Correspondence
Address: Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Azadi Square, Mashhad, Iran. Postal Code: 9177948974
Phone: +98 (51) 38805524
Fax: +98 (51) 38805524
m.r.sharifmoghadam@gmail.com

Article History
Received: November 20, 2018
Accepted: May 15, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

Aims Significant amounts of waste, including feathers, bones, blood, etc. are yearly produced by the poultry industry. Feathers are composed of 90% keratin protein, and the rest is composed of lipids and water. Keratinases are one of the most diverse and usable enzymes, which can be produced by bacterial and fungal microorganisms. These enzymes show a wide range of application in various fields.

Materials and Methods In this study, the keratinolytic activity of the isolated strain from a poultry farm in Mashhad was evaluated and then the medium conditions for keratinase production were optimized. The strains were identified based on the morphological and biochemical methods. 16SrRNA gene of the strain was amplified by PCR and then sequenced. The strain proteolytic activity was examined and compared with its keratinolytic activity. Finally, strain growth ability tested in variety substrate.

Findings Using 16SrRNA gene sequencing, morphological and biochemical identification, the strain shared 99.9% similarity with Bacillus mojavensis. Optimization of various factors, including temperature, pH, incubation time, carbon and nitrogen sources, aeration and inoculum size showed that the isolated strain has the highest keratinolytic activity at 37°C, 48 hour incubation period, pH=9.5, sucrose 1%, 3% substrate, aeration 75% and 6% (v/v) inoculum amount. None of the nitrogen sources had a positive effect.

Conclusion The FUM-1 keratinolytic activity was increased approximately 3.38 fold by condition optimization of the medium, indicating the importance of environmental conditions. In the study, the strain with high keratinolytic activity was suggesting its potential use in biotechnological.

Keywords Feather; Keratinase; Optimization; Bacillus

CITATION LINKS

[1] Screening and characterization of keratinase enzyme obtained from keratin degrading microorganism isolated ... [2] Biotechnological applications and prospective market of ... [3] Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into ... [4] Production of enzymes and degradation of feathers by ... [5] High-temperature thermal destruction of poultry derived wastes for energy recovery ... [6] Characterisation, kinetics and modelling of gasification of poultry manure and litter ... [7] Detection of keratinolytic Actinobacteria and evaluation of bioprocess for production ... [8] Intracellular keratinase of Trichophyton ... [9] Microbial keratinases: Characteristics, biotechnological applications ... [10] Optimization of growth conditions for a recombinant ... [11] Chromosomal integration of KerA gene in Bacillus ... [12] A current assessment on the production of bacterial ... [13] Optimization of keratinase production by Actinomyces ... [14] Production of keratinase by Bacillus ... [15] Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of ... [16] Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated ... [17] Optimization of medium composition for keratinase production ... [18] Production and purification of protease from a Bacillus ... [19] The production of alkaline protease by Bacillus ... [20] Physical and morphological structure of chicken feathers (keratin biofiber) ... [21] Bacillus mojavensis sp. nov, distinguishable from Bacillus ... [22] Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic ... [23] Optimization of cultural condition for keratinase production using Bacillus ... [24] Keratinolytic protease production and characterization from Bacillus sp. isolated ... [25] Improved keratinase production for feather degradation by Bacillus licheniformis ... [26] Study on the fermentation conditions and the application in feather degradation of ... [27] Production of keratinase by free and immobilized cells of Bacillus ... [28] Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی جدایه بومی FUM1، جداشده از مرغداری‌های اطراف مشهد و بهبود فعالیت آنزیمی آن با استفاده از بهینه‌سازی شرایط محیطی به روش تک‌متغیره

سحر مهربان MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
محمدرضا شریف‌مقدم* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
معصومه بحرینی PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
احمد آسوده PhD
گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
بهناز کروژدهی PhD
گروه کشاورزی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

اهداف: سالانه مقادیر زیادی پسماند از مرغداری‌ها تولید می‌شود که شامل پر، استخوان، خون و غیره است. ۹۰% پَر از پروتئین کراتین و مابقی آن از لیپید و آب تشکیل شده است. آنزیم کراتیناز یکی از متنوع‌ترین و پرکاربردترین آنزیم‌ها است که توسط میکروارگانیزم‌ها تولید می‌شود. کراتیناز برای مقاصد مختلف کاربرد دارند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش فعالیت کراتینولیتیک جدایه FUM-1 بررسی و بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید آنزیم کراتیناز صورت گرفت. جدایه براساس خواص ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از ژن *16S rRNA* شناسایی شد. سپس فعالیت پروتئازی جدایه بررسی و با فعالیت کراتینازی آن مورد مقایسه قرار گرفت. میزان فعالیت کراتینازی جدایه در شرایط مختلف بررسی شد. در انتها توانایی رشد جدایه در بستر انواع کراتین (آلفا و بتا) نیز بررسی و نوع آنزیم کراتیناز مشخص شد.

یافته‌ها: نتایج تعیین توالی و شناسایی بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی نشان داد که جدایه FUM-1 قرابت ۹۹/۹% با باکتری *باسیلوس موجاوِنسیس* (*Bacillus mojavensis*) دارد. بهینه‌سازی فاکتورهای دما، دوره گرماگذاری، pH، منابع کربن و نیتروژن، هوادهی و مقدار تلقیح باکتری نشان داد که جدایه در شرایط ۴۸ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷°C با pH=۹/۵، منبع کربن ساکارز ۱%، ۳% سوبسترا، هوادهی ۷۵% از ارلن نسبت به کل حجم آن با دور ۱۵۰rpm و مقدار تلقیح ۶-۴% (حجمی/حجمی) بهترین فعالیت کراتینولیتیک را داشت. هیچکدام از منابع نیتروژن اثر مثبت نداشت. همچنین آنزیم کراتیناز از نوع β بود.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی شرایط کشت جدایه FUM-1 موجب افزایش ۳/۳۸ برابری فعالیت کراتینولیتیک شد که نشان‌دهنده اهمیت بهینه‌سازی است. در این پژوهش جدایه با فعالیت مناسب توانایی به‌کارگیری در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی را دارد.

کلیدواژه‌ها: پر، کراتیناز، بهینه‌سازی، باسیلوس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۵
*نویسنده مسئول: m.r.sharifmoghadam@gmail.com

مقدمه

سالانه مقادیر قابل توجهی پسماند از صنایع مرغداری و طیور تولید می‌شود که بیشتر شامل پر، استخوان و خون هستند. طبق تخمین‌ها هر ساله بیش از ۸/۵میلیون‌تن از این پسماندها در جهان تولید می‌شود و پر بیشترین سهم را دارند[1-3]. این ضایعات عمدتاً به پودر تبدیل شده و دفع می‌شوند که این امر موجب ایجاد اثرات نامطلوبی در محیط زیست شده است و علاوه بر این موجب انتشار بیماری‌های مختلفی مانند کلروزیس، مایکوپلاسموزیس و همچنین وبای مرغی می‌شوند و این موجب نگرانی‌های زیادی شده است [4-6]. بنابراین نیاز است که رویکردهای جدیدی برای کاهش این آلودگی‌ها در نظر گرفته شود. ۹۰% پَر، از کراتین تشکیل شده است. کراتین پروتئین فیبری نامحلول غنی از مارپیچ‌های بتا است که به‌طور گسترده‌ای از اتصالات عرضی دی‌سولفیدی، هیدروژنی و باندهای هیدروفوبیک تشکیل شده‌اند، بنابراین به تجزیه توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک (تریپسین، پاپائین، پپسین) بسیار مقاوم هستند[7, 8]. در طبیعت پسماندهای حاوی کراتین توسط طیف وسیعی از میکروارگانیزم‌ها تخریب شده و موجب کاهش آلودگی محیط زیست می‌شوند[9]. قابلیت استفاده از کراتین در هر دو گروه از میکروارگانیزم‌های پروکاریوت و یوکاریوت دیده می‌شود و در تمام نقاط جهان اعم از قطب جنوب و چشمه‌های آبگرم چه هوازی و چه بی‌هوازی موجودات کراتینولیتیک جداسازی شده‌اند[10]. کراتینازها یکی از متنوع‌ترین و پرکاربردترین آنزیم‌ها هستند. این آنزیم‌ها عمدتاً خارج سلولی و القایی بوده و در محیط کشت حاوی کراتین ترشح می‌شوند[8]. به‌طور کلی این آنزیم‌ها، یک محدوده حرارتی پایدار بین ۴۵-۶۰°C دارند که می‌توانند در این محدوده بهترین فعالیت را داشته باشند[9]. آنزیم کراتیناز، جزء پروتئازها است که عمدتاً به پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار کراتین حمله می‌کند[11]. کراتینازهای میکروبی برای مقاصد مختلف از جمله مصارف دارویی، موزدایی در صنایع چرم‌سازی، صنعت نساجی، کود کشاورزی، مواد شوینده و پزشکی کاربردهای زیادی دارند[2, 12]. در حال حاضر افزایش آگاهی درباره کاربردهای مهم کراتیناز منجر به تقاضای بیشتر آنها شده، این در حالی است که دستیابی به آن بسیار محدود است. برای غلبه بر این مشکلات، پیشرفت در پژوهش‌های کراتیناز باید در جهت بهبود ویژگی‌ها و تولید بیشتر کراتیناز و همچنین جست‌وجو برای پیداکردن کراتینازهای جدید با اختصاصیت سوبسترای گسترده‌تر باشد[2]. میکروارگانیزم‌ها یکی از عوامل بسیار ارزشمند در تولید تجاری این آنزیم هستند و برای رشد و تولید آنزیم، به‌شدت تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، در نتیجه بهینه‌سازی عوامل محیطی و پارامترهای کشت، نیاز اولیه و ضروری در تولید موفق آنزیم طی فرآیندهای زیستی است[13, 14].

هدف از این پژوهش بررسی فعالیت کراتینولیتیکی جدایه FUM-1 جداسازی‌شده از مرغداری‌های اطراف مشهد و بهینه‌سازی شرایط کشت برای تولید آنزیم کراتیناز بود. پس از شناسایی بیوشیمیایی

www.SID.ir

Archive of SID

و مولکولی جدایه، فعالیت پروتئازی آن بررسی و میزان فعالیت کراتینازی جدایه در شرایط مختلف بهینه شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر از جدایه FUM-1 موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد که از مرغداری‌های اطراف مشهد جداسازی شده بود، استفاده شد. برای اطمینان از خلوص در محیط نوترینت‌آگار به‌صورت خطی کشت داده و به انکوباتور ۳۷°C منتقل شد. پس از اطمینان از خلوص باکتری، در پژوهش حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی بیوشیمیایی جدایه FUM-1: شناسایی اولیه با استفاده از واکنش گرم و رنگ‌آمیزی اسپور و همچنین آزمون کاتالاز انجام شد. سپس آزمون‌های بیوشیمیایی مصرف نشاسته، دکستروز، لاکتوز، ساکارز، ژلاتین، اوره، تحمل نمک ۵% و ۱۰%، لیتموس‌میلک، لیزین- آهن آگاردار، MRVP، تولید ایندول و حرکت بررسی شدند.

شناسایی مولکولی جدایه: DNA باکتری با روش جوشاندن استخراج و به‌منظور بررسی کیفیت الکتروفورز شد[15]. برای شناسایی مولکولی جدایه و انجام واکنش PCR از پرایمر عمومی 27f و 1492R استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از کیت مسترمیکس آمپلیکون (آمپلیکون؛ دانمارک) حاوی کلریدمنیزیم ۱/۵میلی‌مولار؛ کلریدپتاسیم ۳۰میلی‌مولار؛ تریس-HCL ۱۰میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۹؛ دئوکسی نوکلئوتیدتری‌فسفات ۲۵۰میکرومولار؛ DNA تک‌پلیمراز یک‌واحد) در حجم نهایی ۲۵میکرولیتر انجام شد که شامل ۲میکرولیتر DNA، ۰/۶۵میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰پیکومول)، ۱۰/۵۸میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰/۵۸میکرولیتر از بافر مسترمیکس بود. واکنش در دستگاه ترمال‌سایکلر (بیورد؛ ایالات متحده آمریکا) با شرایط زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C، ۱۲۰ثانیه؛ ۳۰ سیکل واسرشت‌سازی ۹۵°C، ۳۰ثانیه؛ اتصال آغازگر ۵۴°C، ۳۰ثانیه؛ سنتز قطعه مورد نظر ۷۲°C، ۹۰ثانیه و سپس گسترش نهایی ۷۲°C، ۴۲۰ثانیه؛ سپس محصول PCR روی ژل آگاروز ۱% الکتروفورز و بررسی شد.

تعیین توالی: به‌منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. قرابت فیلوژنتیکی جدایه با سویه‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و هم‌راستاسازی توالی‌ها با نرم‌افزار MUSCLE انجام شد. همچنین با استفاده از الگوی Neighbour-joining دسته‌بندی توالی‌ها صورت گرفت و درخت فیلوژنی آن رسم شد.

تهیه پودر پر: در این آزمایش از پَر صنعتی به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. برای حذف لیپید موجود در پَر صنعتی، ۵ساعت تحت تیمار با شوینده قرار داده شد و سپس طی چند مرحله برای حذف شوینده با آب مقطر شست‌وشو داده شد. پس از شست‌وشو در آون ۳۷°C به‌مدت یک روز خشک شده و با دستگاه mixer meal (Retsch؛ آلمان) پودر شدند.

تعیین فعالیت اولیه پروتئولیتیک و کراتینولیتیک جدایه: برای اطمینان از فعالیت پروتئازی، در ابتدا آزمون پروتئاز در محیط کشت اسکیم‌میلک‌آگار (مرک؛ آلمان) انجام شد[16] و پس از اطمینان از فعالیت پروتئازی، به‌منظور تایید و تعیین فعالیت کراتینازی در محیط کشت اختصاصی مایع حاوی پر به حجم ۵۰سی‌سی و با pH=۷/۵ کشت شد[10, 17]. محیط کشت اختصاصی مایع حاوی پر (FMB) برای بررسی فعالیت کراتینولیتیکی جدایه به کار رفت که به روش زیر تهیه شد:

مقادیر به‌ازای گرم بر لیتر استفاده شدند: سدیم‌کلرید (۰/۵)، منیزیم‌کلرید ۶آبه (۰/۱)، پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات (۰/۴)، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات (۰/۳) و ۱% پَر در یک لیتر آب مقطر حل و pH آن در ۷/۵ تنظیم و استریل شد[8]. برای تهیه محیط جامد به محیط فوق ۱/۵% آگار[17] اضافه شد. از کشت شبانه جدایه FUM-1 با کدورت نیم‌مک‌فارلند به میزان ۲% (حجمی/حجمی) تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۷°C قرار داده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کراتیناز: میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه با استفاده از پودر پَر براساس روش *بیو* و همکاران در سال ۱۹۶۸ با کمی تغییر صورت گرفت، به این صورت که ۲۰میلی‌گرم از پودر پَر با ۸۰۰میکرولیتر بافر تریس- HCl با pH=۸ مخلوط و ۱۰۰میکرولیتر سوپرناتانت آنزیم اضافه و به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. محیط کشت بدون باکتری نیز به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد[16]. برای سنجش فعالیت آنزیم کراتیناز علاوه بر آزوکراتین، کراتین‌آزوره و کازئین از خود پر پودر شده نیز به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. در این پژوهش نیز از پودر پر به‌منظور سنجش فعالیت استفاده شد.

یک واحد از فعالیت آنزیم کراتیناز به افزایش خوانش از مقدار ۰/۰۱ در ۲۸۰نانومتر نسبت به نمونه کنترل منفی در یک‌میلی‌لیتر محلول عصاره خام آنزیمی و مدت‌زمان یک‌ساعت گرماگذاری تعریف شده است.

بهینه‌سازی شرایط محیط کشت: به‌منظور بهبود فعالیت کراتینولیتیکی جدایه، بهینه‌سازی شرایط کشت به روش یک متغیر در یک زمان صورت گرفت. به این صورت که ابتدا یکی از شرایط بهینه شده و سپس شرایط آزمایش بعدی براساس مرحله قبل طراحی شد.

در این مرحله فاکتورهای دما (۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰°C)، دوره گرماگذاری (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ساعت)، منابع مختلف کربن (لاکتوز، فروکتوز، گلوکز، دکستران، ساکارز و نشاسته)، منابع مختلف نیتروژن (پپتون، عصاره مخمر، نیترات‌سدیم، نیترات‌آمونیوم و آمونیوم‌کلراید؛ ۱%)، درصد سوبسترا (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴%)، هوادهی (۲۵، ۵۰ و ۷۵%) در ارلن انجام شده است، به این صورت که مقدار محیط کشت نسبت به حجم ارلن‌ها تغییر داده شد و میزان تلقیح باکتری (۱x، ۲x، ۳x، ۴x، ۵x و ۶x) مورد بررسی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت. بدین‌صورت که محیط اختصاصی مایع حاوی پَر، استریل و سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نیم‌مک‌فارلند تلقیح شد. هر یک از فاکتورهای محیطی مرحله به مرحله با دو تکرار بررسی شدند و میانگین اعداد به‌دست‌آمده در نمودار قرار گرفت. در انتها به‌منظور بررسی معنی‌داربودن تاثیر هر یک از فاکتورها، آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 به روش ANOVA صورت گرفت.

اندازه‌گیری کمی فعالیت پروتئازی جدایه: برای اندازه‌گیری کمی فعالیت پروتئازی جدایه، ابتدا در محیط اختصاصی مایع پَر با pH=۹/۵ کشت داده و در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد؛ سپس طی ۴۸ با فواصل ۲۴ساعته با استفاده از کازئین فعالیت آن اندازه‌گیری شد. به این صورت که ۰/۵% (وزنی/حجمی) کازئین را در بافر تریس با غلظت ۵۰میلی‌مولار، روی هم‌زن مغناطیسی حل نموده و سپس pH آن در ۷/۵ تنظیم شد. ۱۰۰میکرولیتر از محلول آنزیمی حاصل از کشت سانتریفیوژشده را با ۱۰۰میکرولیتر محلول کازئین در میکروتیوپ ۱/۵میلی‌لیتر ریخته و پس از ۱۰دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، ۳۰۰میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% (TCA) برای غیرفعال‌سازی آنزیم اضافه شد و ۱۵دقیقه در دمای ۴°C قرار گرفت. میکروتیوپ‌ها سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰نانومتر اندازه‌گیری شد[18].

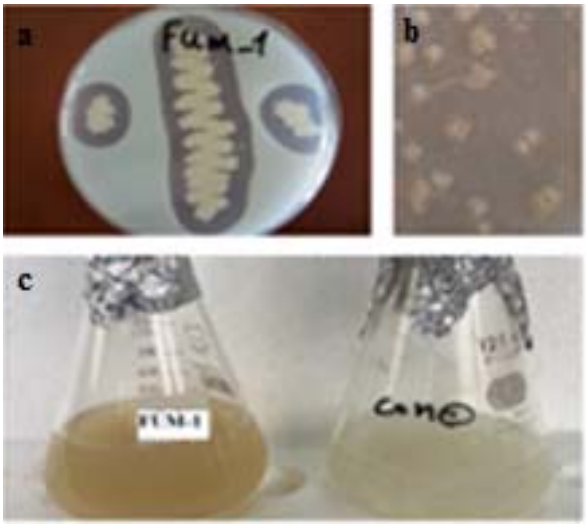
بررسی سوبستراهای مختلف کراتینی: به‌منظور بررسی رشد و فعالیت باکتری در سوبستراهای کراتینی α و β (موی انسان و پر شترمرغ)، محیط کشت اختصاصی مایع با pH بهینه و ۱% سوبسترا (موی انسان و پر شترمرغ) به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن تهیه و پس از تلقیح باکتری با کدورت نیم‌مک‌فارلند به مقدار ۲% (حجمی/حجمی)، در دمای بهینه و دور ۱۵۰rpm گرماگذاری شدند. سنجش فعالیت آنزیم در روز دوم و پس از ۴۸ساعت انکوبه، اندازه‌گیری و مقدار آن نسبت به فعالیت باکتری در سوبسترای پَر مرغ مقایسه شد.

یافته‌ها

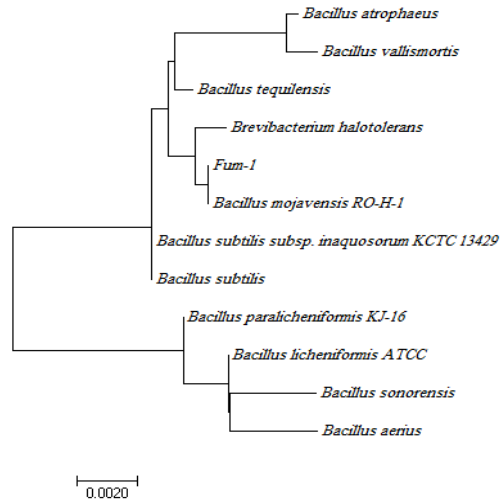
در بررسی‌های اولیه مشخص شد که جدایه FUM-1 کازئیناز مثبت بوده و قادر به ایجاد هاله شفاف در محیط اسکیم‌میلک‌آگار است. به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت کراتینازی، به محیط کشت مایع اختصاصی حاوی پَر منتقل و مشخص شد که جدایه FUM-1 دارای فعالیت کراتینولیتیکی ۵۶۰/۷واحد بر میلی‌لیتر) طی ۴۸ساعت گرماگذاری است (شکل ۱).

نتایج رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و آزمون کاتالاز نشان داد که جدایه از جنس باسیلوس است. براساس نتایج توالی‌یابی در پایگاه داده Ez-taxon مشخص شد جدایه FUM-1 با ۹۹/۹% با *باسیلوس موجاونسیس* (*Bacillus mojavensis*) تشابه دارد و درخت فیلوژنی آن ترسیم شد (شکل ۲). همچنین نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی (جدول ۱)، نتایج تعیین توالی را تایید کرد.

بررسی مقدار فعالیت کراتینولیتیک در دماهای مختلف نشان داد که جدایه FUM-1 در دمای ۳۷°C بیشترین فعالیت را دارد (نمودار ۱- الف). مقدار فعالیت کراتینولیتیک جدایه در دمای بهینه برای چهار روز، با فواصل ۲۴ساعت سنجیده شد و اندازه‌گیری‌ها گویای آن بود که جدایه در ۴۸ساعت بیشترین تولید را دارد و بعد از آن تولید کاهش می‌یابد (نمودار ۱- ب).



شکل ۱) تصاویر مربوط به فعالیت جدایه در محیط اسکیم‌میلک‌آگار (a)، محیط کشت جامد اختصاصی حاوی پَر (b) و محیط کشت مایع (c)



شکل ۲) ترسیم درخت فیلوژنی جدایه FUM-1

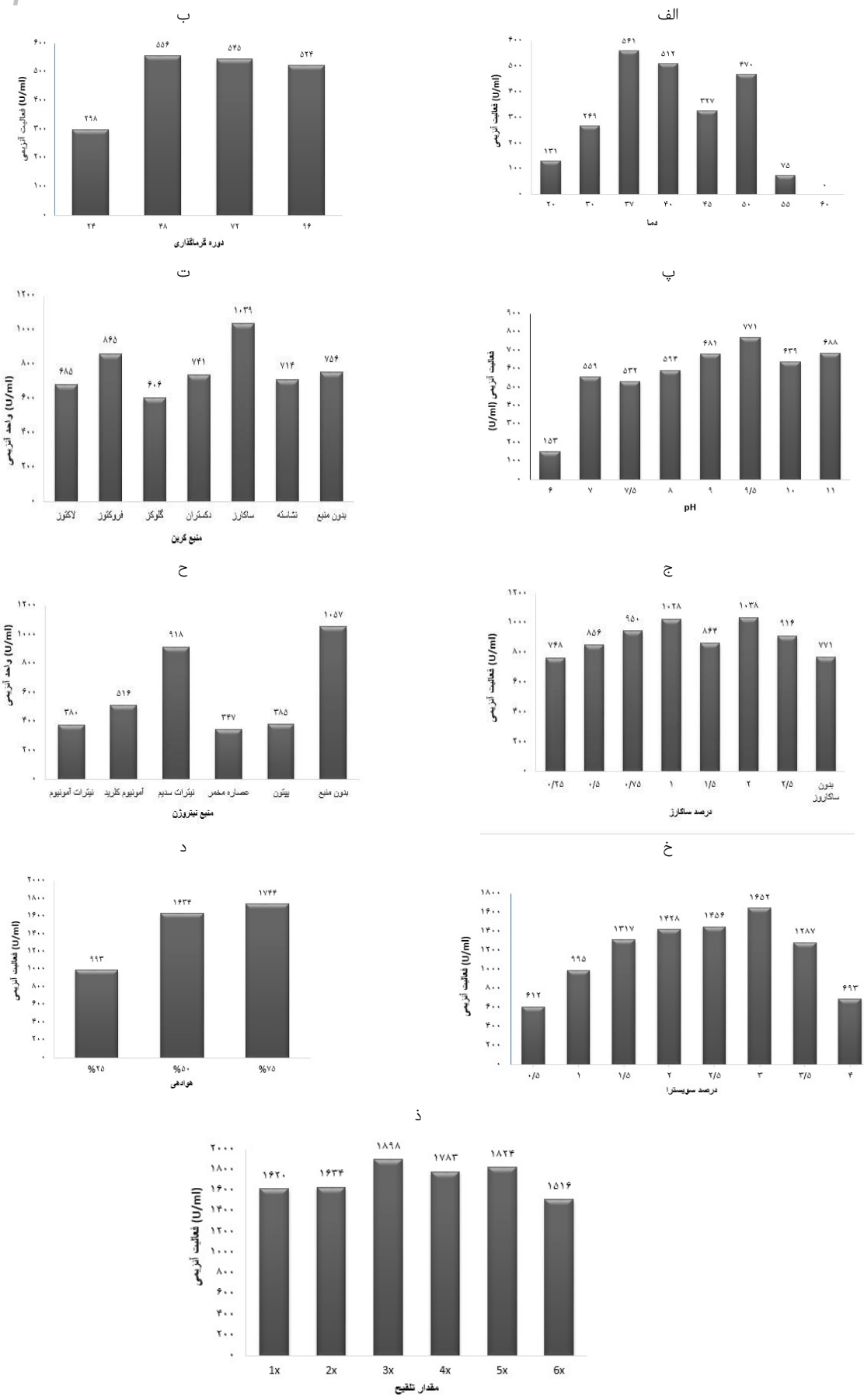
جدول ۱) نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه FUM-1

آزمون افتراقی	کاتالاز	ژلاتیناز	اوره‌آز	هیدرولیز نشاسته	تولید ایندول	لیتموس‌میلک	لیزین‌آیرون‌آگار	
FUM-1	+	+	-	+	-	Alk/P	دآمیناسیون/دکربوکسیله	
آزمون افتراقی	دکستروز	لاکتوز	ساکارز	MR	VP	حرکت	نمک ۱۰%	نمک ۵%
FUM-1	+	-	+	+	-	-	+	+

*علامت (+) نشان‌دهنده توانایی جدایه و تولید آنزیم مورد نیاز و علامت (-) به معنای عدم توانایی جدایه است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱) نتایج بهینه‌سازی فاکتورهای دما (الف)، دوره گرمادهی (ب)، فاکتور pH (پ)، منبع کربن (ت)، مقدار درصد منبع کربن (ج)، منبع نیتروژن (ح)، درصد سوبسترا (خ)، بهینه‌سازی مقدار هوادهی (د)، مقدار تلقیح (ذ)

www.SID.ir

Archive of SID

میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه در مقادیر مختلف pH (۱۱-۶) مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که جدایه در pH=۹/۵ بیشترین عملکرد را در تولید کراتیناز دارد و تولید آنزیم کراتیناز توسط باکتری ۳۷/۶% افزایش یافت (نمودار ۱- پ).

بررسی اثر منابع مختلف کربنی (لاکتوز، فروکتوز، گلوکز، دکستران، ساکارز و نشاسته) بر تولید آنزیم نشان داد که با افزودن قند ساکارز و فروکتوز به محیط کشت میزان فعالیت کراتینولیتیکی جدایه FUM-1 افزایش می‌یابد، اما قند ساکارز اثر بهتری داشت و باعث افزایش ۳۷/۴% فعالیت کراتینولیتیکی شد (نمودار ۱- ت). بنابراین در مراحل بعدی کار، درصدهای مختلفی از ساکارز (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵% وزنی/حجمی) بررسی شد و نتایج نشان داد که افزودن ۱ و ۲% ساکارز به محیط کشت موجب افزایش یکسان فعالیت آنزیم می‌شود و بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد، در نتیجه برای ادامه کار ۱% ساکارز به محیط کشت اضافه شد (نمودار ۱- ج). بررسی اثر منابع نیتروژنی (پپتون، عصاره مخمر، نیترات‌سدیم، نیترات‌آمونیوم و آمونیوم‌کلراید) برای جدایه FUM-1 مشخص کرد که افزودن منابع نیتروژنی نه‌تنها موجب افزایش تولید کراتیناز نمی‌شوند بلکه موجب کاهش فعالیت جدایه شده و بیانگر این است که جدایه از پَر تنها می‌تواند نیاز نیتروژن خود را تامین کند (نمودار ۱- ح). از آنجایی که آنزیم کراتیناز یک آنزیم القایی است افزایش درصد مقدار پَر می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم شود ولی از یک غلظتی به بالا به‌دلیل اختلال در هوادهی و افزایش ویسکوزیته محیط اثر معکوس دارد بدین‌منظور درصدهای مختلفی از سوبسترا آزمایش شد و نتایج نشان داد که جدایه FUM-1 در مقدار سوبسترای ۳% بیشترین عملکرد را دارد و با افزایش سوبسترا فعالیت کراتینولیتیکی باکتری به مقدار ۵۸/۹% افزایش یافت (نمودار ۱- خ).

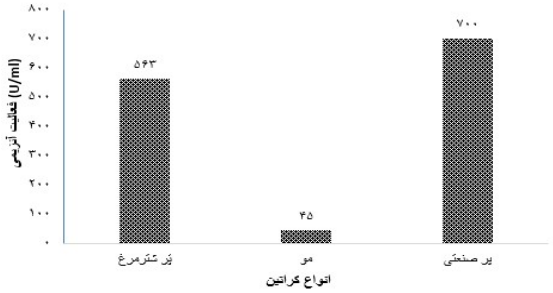
میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه در مقادیر ۷۵%، ۵۰% و ۲۵% هوادهی در ارلن با گرماگذاری در شیکر انکوباتور ۱۵۰rpm بررسی شد و هوادهی ۷۵% با افزایش ۶/۷% فعالیت ، بهترین هوادهی را برای جدایه FUM-1 فراهم کرد (نمودار ۱- د).

اثر مقادیر مختلف تلقیح بر میزان رشد و فعالیت کراتینولیتیک جدایه FUM-1 در نمودار ۲- ذ نشان داده شده است. میزان فعالیت جدایه FUM-1 در میزان تلقیح ۳x (۶% حجمی/حجمی)، ۱۸۹۸ واحد بر میلی‌لیتر بوده و با افزایش ۸/۸% فعالیت همراه بود (نمودار ۱- ذ).

فعالیت پروتئازی و نوع سوبسترا جدایه FUM-1: میزان فعالیت پروتئازی جدایه FUM-1 اندازه‌گیری شد تا با مقدار فعالیت کراتینازی مقایسه شود. نتایج که در جدول ۲ نشان داده شده مشخص می‌کند که ۷۸% فعالیت آنزیم مربوط به کراتیناز است. همچنین فعالیت جدایه FUM-1 در محیط کشت اختصاصی حاوی سوبسترای α-کراتین (مو) و β-کراتین (پَر شترمرغ) بررسی و مشخص شد که جدایه FUM-1 قابلیت خیلی کمتری در تجزیه α-کراتین دارد و آنزیم تولیدشده از نوع β-کراتیناز است (نمودار ۲).

جدول ۲) بررسی فعالیت پروتئازی و مقایسه با فعالیت کراتینازی جدایه FUM-1

زمان	۲۴ساعت		۴۸ساعت	
مقدار فعالیت جدایه (واحد بر میلی‌لیتر)	کراتیناز	پروتئاز	کراتیناز	پروتئاز
FUM-1	۳۴۶	۵۴۴	۷۸۰	۹۹۳



نمودار ۲) بررسی فعالیت جدایه FUM-1 روی انواع سوبسترا؛ مو (آلفا- کراتین) و پَر شترمرغ (بتا- کراتین)

بحث

از میان باکتری‌ها، گونه‌های باسیلوس از نظر تولید پروتئازهای قلیایی خارج سلولی اهمیت ویژه‌ای دارند[19] که از مهم‌ترین آنها می‌توان کراتینازها را نام برد که می‌تواند مواد زائد کراتینی را به منابع ارزشمند اسیدهای آمینه تبدیل کند[20]. در این پژوهش فعالیت کراتینولیتیکی جدایه FUM-1 که از زائدات مرغداری‌های مشهد جداسازی شده بود با استفاده از پودر پر بررسی و مشخص شد که جدایه FUM-1 (۵۶۰/۷واحد بر میلی‌لیتر) قادر به تجزیه پَر است. در بررسی بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که جدایه FUM-1 از جنس باسیلوس است و ۹۹/۹% با *باسیلوس موجاونسیس* شباهت دارد. در پژوهش‌های مشابه *گووارتانان* و همکاران طی غربالگری کیفی با استفاده از محیط کشت اسکیم‌میلک جدایه‌ای از جنس باسیلوس جداسازی کردند و در اندازه‌گیری کمی با استفاده از پودر پَر، مقدار فعالیت آن را ۷۸۰واحد بر میلی‌لیتر اعلام کردند[16]. باکتری *باسیلوس موجاونسیس* RO-H-1 برای اولین‌بار توسط *روبرتس* و همکاران از صحرای موجاوه در ایالات متحده جداسازی و شناسایی شد. این باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل، اسپوردار، هوازی، متحرک، قادر به تجزیه کازئین است، ولی اوره و تریپتوفان را نمی‌تواند هیدرولیز کند و متفاوت با گونه‌های باسیلوس آمیلو لیکویی فاشینز (*B. amyloliquefaciens*)، *باسیلوس آتروفائوس* (*B. atrophaeus*) و *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) است[21].

به‌منظور افزایش فعالیت کراتینولیتیکی جدایه شرایط کشت باکتری بررسی و بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد بهترین دما و pH برای تولید آنزیم ۳۷°C و pH=۹/۵ به‌ترتیب است. در نتیجه بهینه‌سازی شرایط فوق میزان تولید آنزیم ۳۸/۶% افزایش یافت. همچنین نتایج مشخص کرد کراتیناز تولیدی در گروه قلیایی بوده و می‌تواند یک نامزد بالقوه برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی در آینده باشد. در مطالعه‌ای مشخص شد که باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* (*B.*

www.SID.ir

Archive of SID

(*licheniformis*) جداسازی‌شده از فاضلاب کارخانه فرآوری طیور بعد از ۴۸ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷°C به حداکثر فعالیت کراتینولیتیک خود می‌رسد[22]. همچنین در کاری مشابه *گوارتانان* و همکاران با بهینه‌سازی شرایط کشت گونه باسیلوس نشان دادند که باکتری در pH=۹ بهترین عملکرد را در تجزیه پَر دارد[16].

نتایج تحقیقات نشان داده است که در بعضی موارد با افزودن یک منبع کربوهیدراتی و نیتروژنی به محیط رشد باکتری می‌توان میزان فعالیت کراتینولیتیکی باکتری را افزایش داد[23]. به این منظور در این پژوهش از منابع مختلفی کربوهیدراتی (لاکتوز، فروکتوز، گلوکز، دکستران، ساکارز و نشاسته) استفاده و تاثیر آن روی تولید آنزیم بررسی و مشخص شد با افزودن ۱% ساکارز به محیط کشت فعالیت آنزیم ۳۷/۴% افزایش می‌یابد. همچنین فروکتوز نیز با اثر کمتری باعث افزایش فعالیت کراتینولیتیکی جدایه شد. در کاری مشابه *کارازاز* و همکاران با بهینه‌سازی منبع کربن برای *Bacillus* sp. اعلام کردند که افزودن ۱% مانیتول موجب افزایش تولید آنزیم کراتیناز شده است[24]، اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر اثر مثبت ساکارز به‌عنوان منبع کربن بر تولید آنزیم کراتیناز اعلام نشده است. بررسی اثر منبع نیتروژنی روی جدایه نشان داد که هیچکدام از منابع به‌کاررفته بر تولید آنزیم اثر افزایشی ندارد و می‌توان استناد کرد که جدایه از پَر، به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌کند. با بهینه‌سازی درصد سوبسترا برای جدایه FUM-1 فعالیت آن ۵۸% افزایش یافت که نشان از القایی‌بودن تولید آنزیم در جدایه است اما غلظت‌های بالاتر به‌دلیل ایجاد اختلال در هوادهی اثر منفی داشت. مقایسه نتایج بهینه‌سازی منبع کربن، درصد سوبسترا و مقدار تلقیح باکتری در جدایه FUM-1 با نتایج منابع مشابه نشان داد که جدایه یک باکتری توانمند با شرایطی متفاوت و توانایی بالا در تجزیه پَر است. در بیشتر منابع نشان داده شده است که در درصدهای بالای ۲% سوبسترا، باکتری‌ها قادر به تجزیه و فعالیت مناسب نیستند[25, 26]؛ در حالی که جدایه FUM-1 در غلظت‌های بالاتر دارای فعالیت مناسب بوده و بهترین عملکرد را در مقدار ۳% سوبسترا داشت.

بررسی فعالیت پروتئازی جدایه و مقایسه با مقدار فعالیت کراتینولیتیک آن، نشان داد که تقریباً ۷۸/۵% فعالیت پروتئازی باکتری مربوط به فعالیت کراتینولیتیک آن است. مقایسه درصد افزایش تولید کراتیناز در هر مرحله از بهینه‌سازی نشان از اهمیت زیاد بهینه‌سازی سوبسترا در تولید آنزیم کراتیناز است. بررسی اثر آنزیم روی سوبستراهای مختلف نشان داد که این تفاوت در تخریب بسترهای مختلف بستگی به خصوصیات آنزیم کراتیناز در جدایه‌ها دارد[27, 28].

از محدودیت‌های این مطالعه کمبود بودجه پژوهشی و امکانات لازم برای انجام مطالعات مولکولی به‌منظور بررسی، تولید و بهینه‌سازی آنزیم بود. با توجه به کاربردهای وسیع آنزیم کراتیناز در حوزه‌های مختلف صنعتی، پزشکی و محیط زیست پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در جهت جداسازی و شناسایی میکروارگانیزم‌های کراتینولیتیک بومی و همچنین بهینه‌سازی تولید آنزیم انجام شود.

نتیجه‌گیری

جدایه FUM-1 جداشده از زائدات مرغداری‌ها بالاترین تشابه (۹۹/۹%) را با *باسیلوس موجاونسیس* داشت. در بررسی اثر فاکتورهای مختلف محیط کشت روی فعالیت کراتینولیتیکی جدایه FUM-1 مشخص شد که فاکتور درصد سوبسترا بیشترین تاثیر را روی تولید آنزیم دارد و با بهینه‌سازی این عامل میزان تولید آنزیم کراتیناز ۵۸% افزایش یافت. سایر فاکتورها مانند pH و منبع کربن توانستند بیش از ۳۷% فعالیت کراتینولیتکی جدایه را افزایش دهند. همچنین مشخص شد این جدایه دارای ویژگی‌های قابل توجهی همچون فعالیت در pH قلیایی و قابلیت تجزیه ۳% سوبسترا را دارد. فعالیت در pH قلیایی آنزیم کراتیناز جدایه FUM-1 نشان می‌دهد که این جدایه پتانسیل مناسبی را برای به‌کارگیری در صنایع مختلف مانند صنعت مواد شوینده و صنعت چرم دارد. با بررسی تاثیر آنزیم روی سوبستراهای مختلف مشخص شد آنزیم کراتیناز این جدایه قادر به تجزیه کراتین نوع بتا است و یک بتاکراتیناز است. این جدایه برای رشد به منبع نیتروژن نیازی ندارد و با افزودن ساکارز می‌توان تولید آنزیم را افزایش داد. فعالیت کراتینولیتیک جدایه پس از بهینه‌سازی به روش تک‌متغیره، از ۵۶۹/۷ به ۱۸۸۹/۳ افزایش یافت که تقریباً به میزان ۳/۳۸ برابر، تولید آنزیم افزایش یافته است.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تامین امکانات این تحقیق (گرنت شماره ۴۱۰۸۴/۳) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه‌اخلاقی: با توجه به این که نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از محیط زیست بودند بنابراین نیاز به کد اخلاق زیستی ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سحر مهربان (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ محمدرضا شریف‌مقدم (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰%)؛ معصومه بحرینی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۵%) احمد آسوده (نویسنده چهارم) روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰%)؛ بهناز کروژدهی (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵%)

منابع مالی: مطالعه حاضرتحت حمایت مالی گرنت دانشگاه فردوسی مشهد با شماره ۴۱۰۸۴/۳ به انجام رسیده است.

منابع

1- Agrawal BH, Dalal MI. Screening and characterization of keratinase enzyme obtained from keratin degrading microorganism isolated from Sanjan poultry waste dumping soil. Eur Acad Res. 2015;2(11):13986-94.
2- Gupta R, Rajput R, Sharma R, Gupta N. Biotechnological applications and prospective market of microbial

www.SID.ir

Archive of SID

Int J Pharma Bio Sci. 2011;2(3):259-65.
17- Ramnani P, Gupta R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by Bacillus licheniformis RG1 using statistical methods involving response surface methodology. Biotechnol Appl Biochem. 2004;40(2):191-6.
18- Yang JK, Shih IL, Tzeng YM, Wang SL. Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme Microb Technol. 2000;26(5-6):406-13.
19- Badoei-dalfard A, Amiri P, Ramezanipour N, Karami Z, Ghanbari B. The production of alkaline protease by Bacillus tequilensis FJSH2 isolated from Jiroft's slaughterhouse wastes. J Microb World. 2015;8(1):54-63. [Persian]
20- Belarmino DD, Ladchumananandasivam R, Belarmino LD, Pimentel JR, Da Rocha BG, Galvão AO, et al. Physical and morphological structure of chicken feathers (keratin biofiber) in natural, chemically and thermally modified forms. Mater Sci Appl. 2012;3(12):887-93.
21- Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. Bacillus mojavensis sp. nov., distinguishable from Bacillus subtilis by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. Int J Syst Evol Microbiol. 1994;44(2):256-64.
22- Matikevičienė V, Masiliūnienė D, Grigiškis S. Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity. Environment. Technology. Resources. Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference, 2015, Rēzekne, Latvia. Yekaterinburg: Ural State Agrarian University; 2015. pp. 284-9.
23- Sivakumar T, Shankar T, Thangapand V, Ramasubram V. Optimization of cultural condition for keratinase production using Bacillus cereus TS1. Insight Microbiol. 2013;3(1):1-8.
24- Kazzaz AE, Hosseinpour Feizi Z, Guvenmez HK. Keratinolytic protease production and characterization from Bacillus sp. isolated from poultry wastes. Int J Appl Biol Pharm Technol. 2015;6(4):63-73.
25- Ni H, Chen QH, Chen F, Fu ML, Dong YC, Cai HN. Improved keratinase production for feather degradation by Bacillus licheniformis ZJUEL31410 in submerged cultivation. Afr J Biotechnol. 2011;10(37):7236-44.
26- Li Y, Fan Sh, Chen Sh, Er H, Du J, Lu F. Study on the fermentation conditions and the application in feather degradation of keratinase produced by Bacillus licheniformis. Proceedings of the International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012), October 18-19, 2012, Tianjin, China. Heidelberg: Springer; 2014. pp. 89-98.
27- Prakash P, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K. Production of keratinase by free and immobilized cells of Bacillus halodurans strain PPKS-2: Partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. Appl Biochem Biotechnol. 2010;160(7):1909-20.
28- Brandelli A. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of Chryseobacterium sp. Ann Microbiol. 2005;55(1):47-50.
keratinases. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(23):9931-40.
3- Brandelli A, Sala L, Kalil SJ. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. Food Res Int. 2015;73:3-12.
4- Agrahari S. Production of enzymes and degradation of feathers by soil microbes [Internet]. Noida: Jaypee Institute of Information Technology; 2011 [cited 2016 Feb 20]. Available from: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.723.65&rep=rep1&type=pdf.
5- Florin NH, Maddocks AR, Wood S, Harris AT. High-temperature thermal destruction of poultry derived wastes for energy recovery in Australia. Waste Manag. 2009;29(4):1399-408.
6- Font-Palma C. Characterisation, kinetics and modelling of gasification of poultry manure and litter: An overview. Energy Convers Manag. 2012;53(1):92-8.
7- Allure N, Madhusudhan DN, Agsar D. Detection of keratinolytic Actinobacteria and evaluation of bioprocess for production of alkaline keratinase. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2015;4(7):907-18.
8- Wawrzkiewicz K, Łobarzewski J, Wolski T. Intracellular keratinase of Trichophyton gallinae. J Med Vet Mycol. 1987;25(4):261-8.
9- Purchase D. Microbial keratinases: Characteristics, biotechnological applications and potential. In: Gupta VK, Sharma GD, Tuohy MG, Gaur R, editors. The handbook of microbial bioresources. Wallingford: CAB International Publishing; 2016. pp. 634-74.
10- Laurila K. Optimization of growth conditions for a recombinant keratinase producing bacterial strain [Dissertation]. Borås: University of Borås; 2013.
11- Jalendran E, Dadvar Baygi SJ. Chromosomal integration of KerA gene in Bacillus megaterium for stable keratinase production [Dissertation]. Borås: University of Borås; 2011.
12- Daroit DJ, Brandelli A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. Crit Rev Biotechnol. 2014;34(4):372-84.
13- Matikevičienė V, Grigiškis S, Levišauskas D, Sirvydytė K, Dižavičienė O, Masiliūnienė D, et al. Optimization of keratinase production by Actinomyces fradiae 119 and its application in degradation of keratin containing wastes. Environment. Technology. Resources. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference, 2015, Ural State. Yekaterinburg: Ural State Agrarian University; 2016. pp. 294-300.
14- E Silva LA, Macedo AJ, Termignoni C. Production of keratinase by Bacillus subtilis S14. Ann Microbiol. 2014;64(4):1725-33.
15- Queipo-Ortuño MI, De Dios Colmenero J, Macias M, Bravo MJ, Morata P. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(2):293-6.
16- Govarthanan M, Selvankumar T, Arunprakash S. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather degrading Bacillus sp. from chick feather waste.

www.SID.ir