



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.

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³Agricultural 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

شناسایی جدایه بومی FUM1، جداسازی 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٪ پر از پروتئین کراتین و مابقی آن از لیپید و آب تشکیل شده است. آنزیم کراتیناز یکی از متنوع‌ترین و پرکاربردترین آنزیم‌ها است که توسط میکروارگانیسم‌ها 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 پروتئیناز جدایه بررسی و با فعالیت کراتیناز آن مورد مقایسه قرار گرفت. میزان فعالیت کراتیناز 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 موجاونسیس (Bacillus mojavensis)* دارد. بهینه‌سازی فاکتورهای دما، دوره گرماگذاری، pH، منابع کربن و نیتروژن، هوادهی و مقدار تلقیح باکتری نشان داد که جدایه در شرایط ۴۸ ساعت 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 ۴-۶٪ (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.sharifmoghdam@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 ۸/۵ میلیون تن 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٪ پر، 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 میکروارگانیسم‌ها تخریب شده و موجب کاهش آلودگی محیط زیست می‌شوند [9]. قابلیت استفاده از کراتین در هر دو گروه از میکروارگانیسم‌های 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 پروتئینازها 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 پیدا کردن کراتینازهای جدید با اختصاصیت سوبسترای گسترده‌تر باشد [2]. میکروارگانیسم‌ها 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

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 مرغدرای‌های اطراف مشهد جداسازی شده بود، استفاده شد. برای اطمینان از خلوص در محیط نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده و به انکوباتور 37°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 رنگ آمیزی اسپور و همچنین آزمون کاتالاز انجام شد. سپس آزمون‌های بیوشیمیایی مصرف نشاسته، دکستروز، لاکتوز، ساکارز، ژلاتین، اوره، تحمل نمک ۵٪ و ۱۰٪، لیتموس میلک، لیزین-آهن آگاردار، MRVP، تولید ایندول و حرکت بررسی شدند.

شناسایی مولکولی جدایه: DNA باکتری با روش جوشاندن استخراج و به منظور 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 ۱/۵ میلی‌مولار؛ کلریدپتاسیم ۳۰ میلی‌مولار؛ تریس-HCL ۱۰ میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۹؛ دئوکسی نوکلئوتیدتری فسفات ۲۵۰ میکرومولار؛ DNA تک‌پلیمرز یک‌واحد) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۰/۶۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ اپیکومول)، ۱۰/۵۸ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰/۵۸ میکرولیتر از بافر مسترمیکس بود. واکنش در دستگاه ترمال سایکلر (بیورد؛ ایالات متحده آمریکا) با شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه در دمای 95°C ، ۱۲۰ ثانیه؛ ۳۰ سیکل واسرشت سازی 95°C ، ۳۰ ثانیه؛ اتصال آغازگر 54°C ، ۳۰ ثانیه؛ سنتز قطعه مورد نظر 72°C ، ۹۰ ثانیه و سپس گسترش نهایی 72°C ، ۴۲۰ ثانیه؛ سپس محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز و بررسی شد.

تعیین توالی: به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. قربایت فیلوژنتیکی جدایه با سوییچ‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار MEGA 7 و همراستاسازی توالی‌ها با نرم افزار 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 پر صنعتی به عنوان سوپسترا استفاده شد. برای حذف لیپید موجود در پر صنعتی، ۵ ساعت تحت تیمار با شوینده قرار داده شد و سپس طی چند مرحله برای حذف شوینده با آب مقطر شست و شو داده شد. پس از شست و شو در آون 37°C به مدت یک روز خشک شده و با دستگاه (Retsch) mixer meal؛

آلمان) پودر شدند.

تعیین فعالیت اولیه پروتئولیتیک و کراتینولیتیک جدایه: برای اطمینان از فعالیت پروتئازی، در ابتدا آزمون پروتئاز در محیط کشت اسکیم میلک آگار (مرک؛ آلمان) انجام شد [16] و پس از اطمینان از فعالیت پروتئازی، به منظور تایید و تعیین فعالیت کراتینازی در محیط کشت اختصاصی مایع حاوی پر به حجم ۵۰ سی‌سی 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 به ازای گرم بر لیتر استفاده شدند: سدیم کلرید (۰/۵)، منیزیم کلرید ۶ آب (۰/۱)، پتاسیم هیدروژن فسفات (۰/۴)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۰/۳) و ۱٪ پر در یک لیتر آب مقطر حل و pH آن در ۷/۵ تنظیم و استریل شد [8]. برای تهیه محیط جامد و pH آن در ۷/۵ آگار [17] اضافه شد. از کشت شبانه جدایه FUM-1 با کدورت نیمه‌فارلند به میزان ۲٪ (حجمی/حجمی) تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و دمای 37°C قرار داده شد.

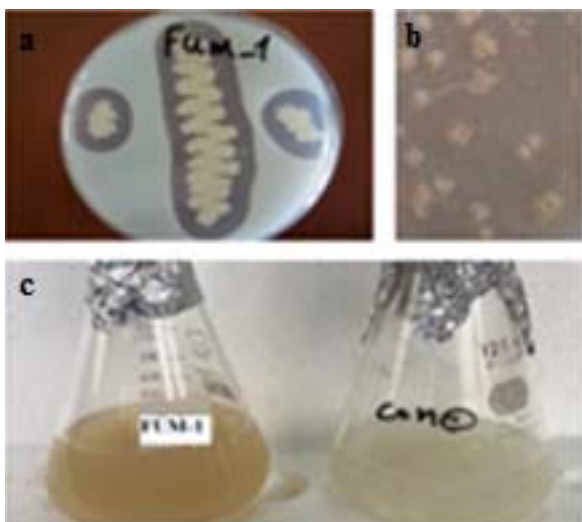
سنجش فعالیت آنزیم کراتیناز: میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه با استفاده از پودر پر براساس روش یو و همکاران در سال ۱۹۶۸ با کمی تغییر صورت گرفت، به این صورت که ۲۰ میلی گرم از پودر پر با ۸۰۰ میکرولیتر بافر تریس-HCL با pH=۸ مخلوط و ۱۰۰ میکرولیتر سوپرناتانت آنزیم اضافه و به مدت یک ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند. محیط کشت بدون باکتری نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد [16]. برای سنجش فعالیت آنزیم کراتیناز علاوه بر آزوکراتین، کراتین آوره و کارژین از خود پر پودر شده نیز به عنوان سوپسترا استفاده می‌شود. در این پژوهش نیز از پودر پر به منظور سنجش فعالیت استفاده شد.

یک واحد از فعالیت آنزیم کراتیناز به افزایش خوانش از مقدار ۰/۱ در ۲۸۰ نانومتر نسبت به نمونه کنترل منفی در یک میلی لیتر محلول عصاره خام آنزیمی و مدت زمان یک ساعت گرماگذاری تعریف شده است.

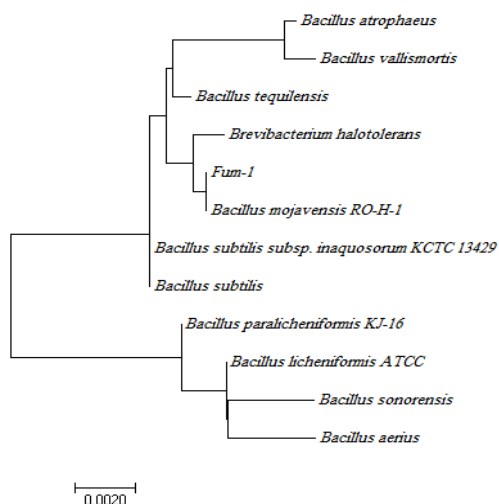
بهینه سازی شرایط محیط کشت: به منظور بهبود فعالیت کراتینولیتیکی جدایه، بهینه سازی شرایط کشت به روش یک متغیر در یک زمان صورت گرفت. به این صورت که ابتدا یکی از شرایط بهینه شده و سپس شرایط آزمایش بعدی براساس مرحله قبل طراحی شد.

در این مرحله فاکتورهای دما (۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و 60°C)، دوره گرماگذاری (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت)، منابع مختلف کربن (لاکتوز، فروکتوز، گلوکز، دکستران، ساکارز و نشاسته)، منابع مختلف نیتروژن (پپتون، عصاره مخمر، نیترات سدیم، نیترات آمونیوم و آمونیوم کلراید؛ ٪)، درصد سوپسترا (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

taxon مشخص شد جدایه FUM-1 ۹۹/۹٪ با *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 ۲۴ ساعت سنجیده شد و اندازه‌گیری‌ها گویای آن بود که جدایه در ۴۸ ساعت بیشترین تولید را دارد و بعد از آن تولید کاهش می‌یابد (نمودار ۱-ب).



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



شکل ۲) ترسیم درخت فیلوژنی جدایه FUM-1

گرفت. بدین‌صورت که محیط اختصاصی مایع حاوی پُر، 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 معنی‌دار بودن 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 پُر با pH=۹/۵ کشت داده و در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد؛ سپس طی ۴۸ با فواصل ۲۴ ساعته با استفاده از کازئین فعالیت آن اندازه‌گیری شد. به این صورت که ۵/۰٪ (وزنی/حجمی) کازئین را در بافر تریس با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، روی هم‌زن مغناطیسی حل نموده و سپس pH آن در ۷/۵ تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی حاصل از کشت سانتریفیوژ شده را با ۱۰۰ میکرولیتر محلول کازئین در میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و پس از ۱۰ دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، ۳۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ (TCA) برای غیرفعال‌سازی آنزیم اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C قرار گرفت. میکروتیوپ‌ها سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر 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 ۱۵۰ rpm گرماگذاری شدند. سنجش فعالیت آنزیم در روز دوم و پس از ۴۸ ساعت انکوبه، اندازه‌گیری و مقدار آن نسبت به فعالیت باکتری در سوبسترای پُر مرغ مقایسه شد.

یافته‌ها

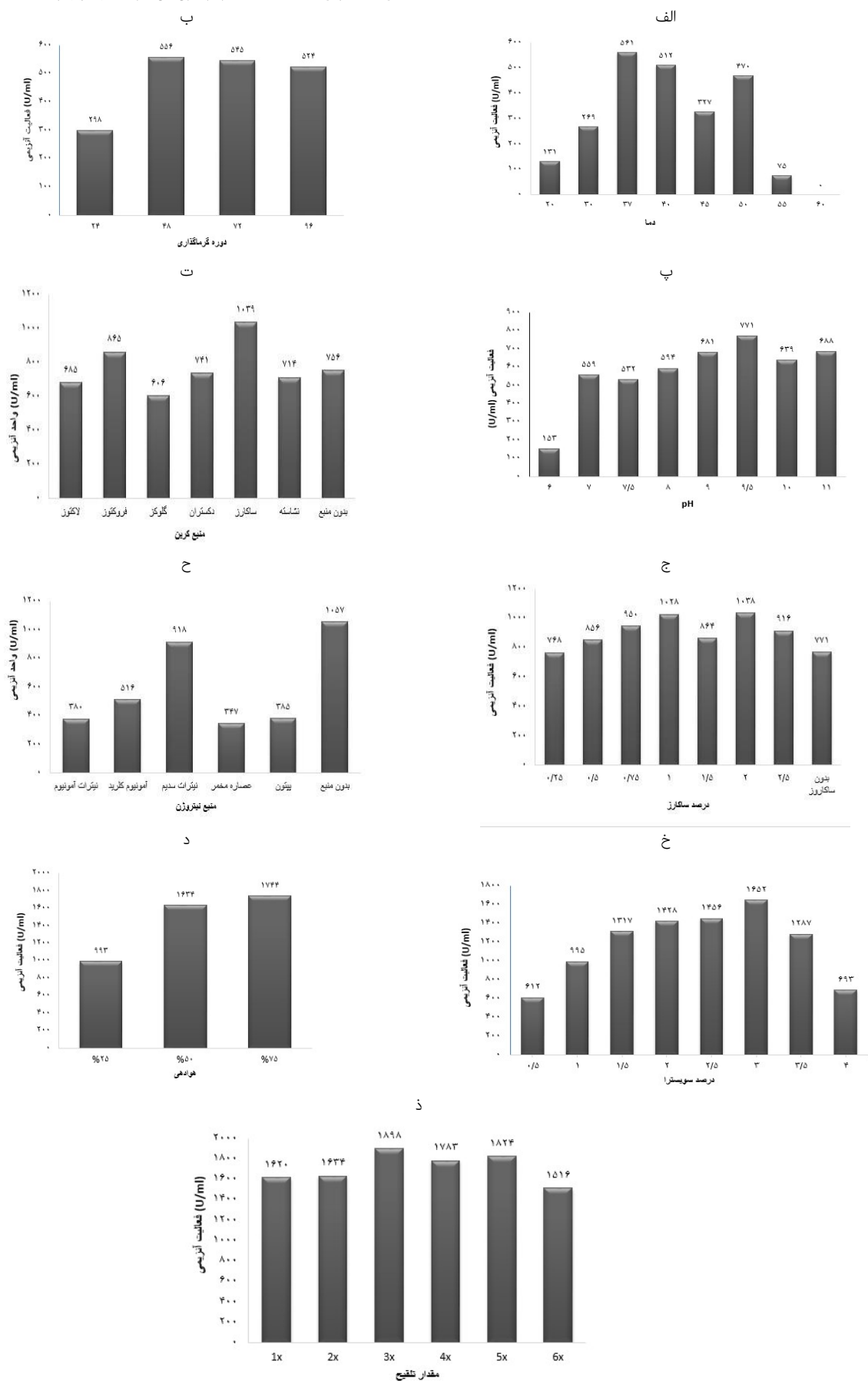
در بررسی‌های اولیه مشخص شد که جدایه FUM-1 کازئیناز مثبت بوده و قادر به ایجاد هاله شفاف در محیط اسکیم‌میلک آگار است. به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت کراتینازی، به محیط کشت مایع اختصاصی حاوی پُر منتقل و مشخص شد که جدایه FUM-1 دارای فعالیت کراتینولیتیکی ۵۶۰/۷ واحد بر میلی‌لیتر طی ۴۸ ساعت گرماگذاری است (شکل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

نتایج رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و آزمون کاتالاز نشان داد که جدایه از جنس باسیلوس است. براساس نتایج توالی‌یابی در پایگاه داده Ez

جدول ۱) نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه FUM-1

آزمون افتراقی	کاتالاز	ژلاتیناز	اوره‌آز	هیدرولیز نشاسته	تولید ایندول	لیتموس‌میلک	لیزین‌آیرون آگار
FUM-1	+	+	-	+	-	Alk/P	دامیناسیون/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.



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)

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

زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
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 پیر 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 زائده‌های مرغاری‌های مشهد جداسازی شده بود با استفاده از پودر پر بررسی و مشخص شد که جدایه FUM-1 (۵۶۰/۷ واحد بر میلی‌لیتر) قادر به تجزیه پیر است. در بررسی بیوشیمیایی و مولکولی مشخص شد که جدایه FUM-1 از جنس باسیلوس است و ۹۹/۹٪ با باسیلوس *موجانسیس* شباهت دارد. در پژوهش‌های مشابه *گوزانان* و همکاران طی غربالگری کیفی با استفاده از محیط کشت اسکیم‌میک جدایه‌ای از جنس باسیلوس جداسازی کردند و در اندازه‌گیری کمی با استفاده از پودر پیر، مقدار فعالیت آن را ۷۸۰ واحد بر میلی‌لیتر اعلام کردند^[16]. باکتری *باسیلوس موجانسیس* RO-H-1 برای اولین بار توسط روبرتس و همکاران از صحرای مواجوه 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 *امیلو لیکویی فاشینز* (*B. amyloliquefaciens*), *باسیلوس آتروفاهوس* (*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.*

میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه در مقادیر مختلف pH (۶-۱۱) 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، دکستروز، ساکارز و نشاسته) بر تولید آنزیم نشان داد که با افزودن قند ساکارز و فروکتوز به محیط کشت میزان فعالیت کراتینولیتیکی جدایه ۱-FUM 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 (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، ۰/۵، 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، نیترات سدیم، نیترات آمونیوم و آمونیوم کلراید) برای جدایه FUM-1 مشخص کرد که افزودن منابع نیتروژنی نه تنها موجب افزایش تولید کراتیناز نمی‌شوند بلکه موجب کاهش فعالیت جدایه شده و بیانگر این است که جدایه از پیر تنها می‌تواند نیاز نیتروژن خود را تامین کند (نمودار ۱-ح). از آنجایی که آنزیم کراتیناز یک آنزیم القایی است افزایش درصد مقدار پیر می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم شود ولی از یک غلظتی به بالا به دلیل 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 (پیر 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).

نتیجه‌گیری

جدایه FUM-1 جداسازی شده از زائده‌های مرغداری‌ها بالاترین تشابه (۹۹/۹٪) را با *باسیلوس موجاونسسیس* 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 کراتینولیتیکی 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 (گرت شماره ۴۱۰۸۴/۳) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: با توجه به این که نمونه‌های جمع‌آوری شده از محیط زیست بودند بنابراین نیاز به کد اخلاق زیستی ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچگونه تعارض منافی 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 حاضر تحت حمایت مالی گرت 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

licheniformis جداسازی شده از فاضلاب کارخانه فرآوری طیور بعد از ۴۸ ساعت 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 پر 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 *کاناز* 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 پر، به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌کند. با بهینه‌سازی درصد سوبسترا برای جدایه FUM-1 فعالیت آن ۵۸٪ افزایش یافت که نشان از القایی بودن تولید آنزیم در جدایه است اما غلظت‌های بالاتر به دلیل 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 پر است. در بیشتر منابع نشان داده شده است که در درصدهای بالای ۲٪ سوبسترا، باکتری‌ها قادر به تجزیه و فعالیت مناسب نیستند [25]؛ 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 میکروارگانیسم‌های کراتینولیتیک بومی و همچنین بهینه‌سازی تولید آنزیم انجام شود.

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, Grigis Š. 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- Wawrzekiewicz 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, Grigis Š, 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.