شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 به عنوان یک سویه جدید تولید کننده آنزیم کراتیناز

سمیه رحیم‌نهال[۱]، امیر میمندی‌پور[۲*]، جمال فیاضی[۱]، مهدی شمس‌آرا[۲]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۱] و علی‌اصغر کارخانه‌ای[۲]

[۱] **خوزستان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان**

[۲] **تهران، پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری**

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۵

چکیده

پر از محصولات فرعی صنعت طیور می‌باشد که به میزان زیادی تولید می‌شود و ۹۰ درصد ساختار آن از پروتئین غیر محلول کراتین تشکیل شده است. هدف از این مطالعه آنالیز و تعیین خصوصیت باکتریهای تولید کننده کراتیناز حاصل از بستر جوجه‌های گوشتی می‌باشد. مقدار ۱۰ گرم بستر مرغداری بر روی محیط کشت اسکیم میلک آگار کشت داده شد. به منظور جداسازی کلنیهای کراتینولیتیک، کلنیهای جداسازی شده، بر روی محیط کشت جامد حاوی آزوکراتین و کراتین به عنوان تنها منبع کراتین کشت داده شدند. کلنیهای با قابلیت هیدرولیز پر انتخاب شده و با استفاده از روشهای میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. در نتایج حاصل از این مطالعه تعداد ۱۰ سویه باکتریایی با فعالیت پروتئولیتیکی به دست آمد که از این تعداد تنها ۴ باکتری توانایی تجزیه کراتین را دارا بودند. طبق نتایج مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه با بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی، زیر گروه *کوکوس (استافیلوکوکوس)* طبقه‌بندی شد. بر اساس تکثیر ژن 16S rRNA و آنالیز فیلوژنی، این سویه *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 شناسایی شد که با توجه به قطر هاله ایجاد شده بر روی محیط جامد حاوی کراتین، *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 در بین سایر سویه‌ها، بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی را دارا بود. *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 به عنوان یک سویه جدید کراتینولیتیک با قابلیت بالای کازئیناز می‌باشد که توانایی تولید آمیلاز، لسیتیناز، سلولاز و ژلاتیناز را ندارد. نتیجه گیری کلی از این تحقیق نشان می‌دهد که باکتری *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 یک باکتری تولید کننده کراتیناز با قابلیت کراتینولیتیکی بالا می‌باشد که قابلیت استفاده در صنعت بیوتکنولوژی را دارد.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس لنتوس*، باکتری، کراتیناز، غربالگری.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۵۴۵۵۰۰۲، پست الکترونیکی: meimandi@nigeb.ac.ir

مقدمه

هیدرولیز یک واکنش می‌باشد که همراه با آب باعث شکستن مولکولهای پلیمر به مونومر می‌شود. پر مرغ (کراتین) یک مولکول پلیمریک بلند است که می‌تواند به اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک شکسته شود (۲۲). پر فرآوری نشده توسط حیوانات غیر نشخوارکننده قابل هضم و استفاده نیست چرا که حاوی مقدار بسیار زیادی از پروتئین کراتین (بیش از ۹۰ درصد) می‌باشد (۲۲). که دارای باندهای دی‌سولفیدی سیستئین هست. و از سوی دیگر پر فرآوری نشده در معرض خطر آلودگیهای پاتوژنیک می‌باشد (۲۰). پاتوژن حاصل از ضایعات طیور ممکن است در خوراک دام منتشر شود, اما اگر پر تحت پیش تیمار بیولوژیکی (استفاده از آنزیم کراتیناز جهت تجزیه پر) قرار گیرد مانع شیوع پاتوژن می‌شود (۲۰). در ابتدا برای تجزیه پر از هیدرولیز قلیایی و فشار بخار

استفاده می‌شد که این روش باعث تخریب اسیدهای آمینه ضروری مثل متیونین, لیزین و هیستیدین شده و همچنین روشی بسیار هزینه بر بود و نتیجه این هیدرولیز از لحاظ مواد مغذی دارای ارزش پایین بود (۳ و ۲۱). بنابراین در سالهای اخیر جهت غلبه بر این محدودیت استفاده از آنزیمهای میکروبی جهت بهبود ارزش غذایی پر رواج پیدا کرد. کراتین می‌تواند به وسیله کراتیناز ترشح شده توسط بعضی از میکروارگانیسمها که به طور طبیعی کراتین را به مولکولهای کوچکتر و قابل جذب و در نهایت قابل استفاده به عنوان یک منبع غذایی برای رشد باکتریها، تبدیل می‌کنند، تجزیه شود (۶). در سالهای اخیر، گزارشهای زیادی مبنی بر خالص سازی کراتیناز از میکروارگانیسمهای مختلف ارائه شده است (۲۴،۱۹و ۲۷). مطالعات زیادی باکتریهای تجزیه کننده پر را از منابع مختلف خاک، ضایعات طیور، باقیمانده مو، پوست و پشم حیوانات گزارش کرده‌اند که عمدتاً شامل گونه‌های مختلفی از باسیلوسها (۱۱، ۱۲ و ۲۵) ، قارچها (۱۰، ۱۳ و ۱۵) و اکتینومایستها (۱۶ و ۱۸) می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی میکروارگانیسمهای تولید کننده کراتیناز حاصل از بستر مرغداری می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و تهیه سوبسترا: جهت انجام این مطالعه، نمونه‌برداری از بستر مرغداریهای استان تهران صورت گرفت. در نمونه برداری مقدار ۱۰ گرم بستر مرغداری هر منطقه برداشته و در فالکونهای استریل ریخته و به آزمایشگاه زیست فناوری دام و آبزیان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک انتقال داده شد. برای شناسایی میکروارگانیسمهای کراتینولیتیک مورد نظر به محیط کشت اختصاصی احتیاج بود. سوبسترای اختصاصی برای شناسایی اولیه باکتریها شامل؛ پودر پر، آزوکراتین و کراتین می‌باشد. برای آماده‌سازی پر جهت تهیه سوبسترا (کراتین)، از روش تغییر یافته Duart و همکاران (۹) و برای تهیه پودر پر و آزوکراتین از روش Riffle و همکاران (۲۵) و برای تهیه کراتین از روش Wawrzkiewicz و همکاران (۳۰) استفاده شد. در این روش، ۵ گرم پر چربی‌زدایی شده را با ۲۵۰ میلی لیتر ترکیب دی متیل سولفوکساید در داخل یک ارلن ۲ لیتری ریخته و به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۵۰-۱۸۰ درجه سلسیوس در زیر هود شیمیایی جوشانده شد. محلول حاصل پس از خنک شدن در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی جدا شد. محلول رویی با ۵۰۰ میلی لیتر استون سرد مجاور گردید. سپس نمونه به مدت دو ساعت در یخچال نگهداری شد تا کراتین به خوبی رسوب کند. مخلوط فوق در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل (کراتین) چندین مرتبه به وسیله بافر فسفات ۰/۱ مولار شستشو داده شد. رسوب حاصل را با استفاده از فریز درایر کاملاً خشک کرده و در نهایت پودر کراتین به دست آمده جهت تهیه محیط کشت حاوی سوبسترا در دمای اتاق نگهداری شد.

جداسازی اولیه سویه‌ها: پس از آماده سازی نمونه‌های جمع آوری شده و مخلوط کردن آنها و تهیه سوبسترای لازم، مقدار ۱ گرم از هر کدام از نمونه‌ها را به صورت جداگانه در ۱۰ میلی لیتر بافر سالین نرمال (pH ۷/۵) حل کرده و پس از حل شدن اولیه، مقدار ده درصد از آن را برداشته و پس از رقیق سازی با رقتهای مختلف بر روی دو محیط کشت جامد حاوی پودر پر (۰/۰۴ درصد دی‌پتاسیم فسفات، ۰/۰۵ درصد آمونیوم کلرید و سدیم کلرید، ۰/۰۳ درصد مونوپتاسیم فسفات، ۰/۰۱ درصد کلرید منیزیم و عصاره مخمر، ۱ درصد پودر پر و ۱/۵ درصد آگار-آگار) (۲۰) و اسکیم‌میلک آگار(۰/۱ درصد گلوکز، ۰/۱ درصد دی‌پتاسیم فسفات، ۰/۲درصد پپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۰۲ درصد منیزیم سولفات ($MgSo_4.7H_2O$)، ۰/۵ درصد پودر اسکیم میلک و ۱/۵ درصد آگار-آگار) کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. برای تفکیک سویه‌های کراتینولیتیک از سایر سویه‌ها، از

محیط کشت جامد حاوی آزوکراتین و کراتین استفاده شد. در این مرحله کلنیهایی که در کشت اولیه بر روی محیط کشت اسکیم میلک در اطراف خود هاله ایجاد کرده بودند بر روی محیط کشت جامد سوبسترای رنگی آزوکراتین به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند (محیط کشت حاوی آزوکراتین مشابه محیط کشت حاوی کراتین می‌باشد با این تفاوت که در این محیط از سوبسترای رنگی آزوکراتین به جای کراتین استفاده می‌شود). در این مرحله باکتریهایی که فعالیت کراتینولیتیکی را دارا هستند با ایجاد هاله شفاف در اطراف خود، شناسایی و سپس بر روی محیط کشت حاوی کراتین (۰/۰۴ درصد دی‌پتاسیم فسفات، ۰/۰۵ درصد آمونیوم کلرید و سدیم کلرید، ۰/۰۳ درصد مونوپتاسیم فسفات، ۰/۰۱ درصد کلرید منیزیم و عصاره مخمر، ۱ درصد کراتین و ۱/۵ درصد آگار-آگار) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلنیها بر اساس قطر هاله و مدت زمان کمتر مورد نیاز برای ایجاد هاله، جداسازی و کدگذاری شدند.

شناسایی سویه‌ها: هر کدام از نمونه‌های خالص شده بر روی پلیت جداگانه کدگذاری و اقدام به شناسایی آنها شد. شناسایی به سه صورت مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی صورت گرفت. در شناسایی بیوشیمیایی تستهای؛ کاتالاز، کازئیناز، ژلاتیناز، لسیتیناز، همولیز، سلولاز، آمیلاز، اوره‌آز، سیترات‌لیاز، بیوفیلم، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، اکسیدوردوکتاز و TSI انجام شد.

استخراج DNA و انجام واکنش PCR: استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA (Peqlab) و مطابق دستورالعمل آن انجام پذیرفت. از آغازگرهای عمومی طراحی شده از ژن 16S rRNA ((27F5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و (1492R 5′- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)) برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. مستر میکس مورد استفاده در این آنالیز به صورت تیوپهای لیوفلیزه از شرکت Bioneer به کار گرفته شد که با اضافه کردن ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای فوروارد و ریورس با غلظت ۱۰ پیکومول و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده (با غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، با ۱۸ میکرولیتر آب تزریقی به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. به منظور تعیین توالی قطعه مورد نظر، محصول حاصل از PCR به همراه هر یک از آغازگرهای فوروارد و ریورس با غلظت ۱۰ پیکومول به شرکت ژن‌فناوران، تهران ارسال شد.

تولید آنزیم کراتیناز از سویه وحشی: جهت گرفتن تک کلنی از استوک باکتری جداسازی شده، بر روی محیط کشت LB جامد، کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. از تک کلنیهای رشد یافته حاصل از کشت، یک تک کلون را با استفاده از لوپ فلزی برداشته و درون ۱۰ میلی‌لیتر LB مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت شبانه کشت داده شد. از کشت مایع باکتری به مقدار ۱ میلی‌لیتر به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت FB حاوی ۲ درصد پر مرغ خرد شده (قطعات ۲-۱ سانتیمتر) کشت داده شد و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور با دور ۱۸۰rpm گرماگذاری شد. پس از طی مدت زمان انکوباسیون، محیط کشت ابتدا با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد و سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد. مایع رویی به عنوان آنزیم خام برای بررسی فعالیت کراتیناز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲۸).

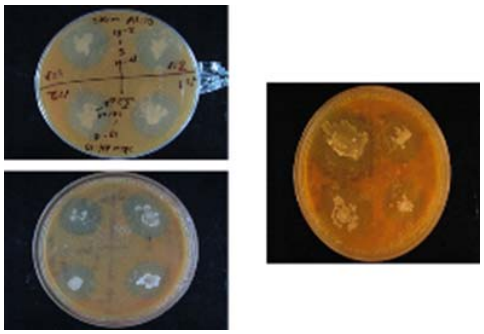
بررسی فعالیت کراتیناز سویه وحشی: برای بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز حاصل از سویه وحشی از روش تغییر یافته گوارتانان (Govarthanan) و همکاران (۱۴)، استفاده شد. در این روش مقدار ۱۰ میلی‌گرم کراتین(سوبسترا) در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس هیدروکلراید ۵۰ میلی‌مولار به حالت سوسپانسیون درآمد. به محلول

سوسپانسیون مقدار ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم خام اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد درون شیکرانکوباتور با دور ۱۸۰rpm قرار گرفت. پس از طی مدت زمان فوق مقدار ۱ میلی‌لیتر TCA ۱۵ درصد به محلول فوق اضافه شد و به مدت نیم ساعت درون یخ قرار گرفت. برای نمونه کنترل (بلانک) نیز همین شرایط برقرار شد با این تفاوت که TCA ۱۵ درصد از همان ابتدا همزمان با اضافه کردن آنزیم، اضافه شد. سپس هم نمونه اصلی و هم نمونه بلانک با دور ۱۰۰۰۰g و به مدت ده دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد.

آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیکی: توالی حاصل از توالی‌یابی ابتدا با استفاده از نرم افزار Chromas ویرایش شده و پس از تبدیل به فرمت FASTA با استفاده از ابزار BLAST موجود در پایگاه اطلاعات داده‌ای NCBI به منظور تعیین شباهت با سایر توالیهای ثبت شده در این پایگاه مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار MEGA5.1 همردیف شده و آنالیز فیلوژنی و رسم درخت فیلوژنتیک صورت گرفت (۱۷). در رسم درخت فیلوژنتیکی از روش Neighbor-joining phylogeny و به منظور بررسی قابل اطمینان وابستگی سویه ها، آنالیز Bootstrapping (با ۱۰۰۰ تکرار) به کار گرفته شد.

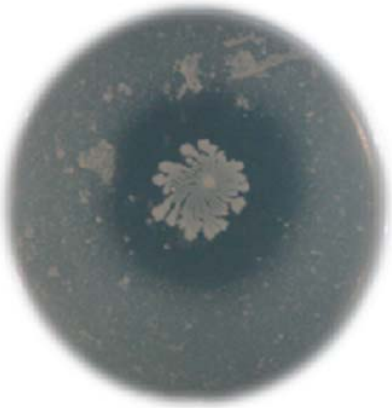
نتایج

پس از طی مدت زمان انکوباسیون، تعداد ۱۰ کلنی با ویژگیهای مورفولوژیکی متفاوت بر روی پلیتهای حاوی اسکیم میلک آگار و محیط کشت حاوی پودر پر در رقتهای سوم تا هشتم جداسازی شد. سپس هر کدام از این کلنیها برای خالص‌سازی بهتر به صورت جداگانه بر روی محیط کشت اسکیم میلک آگار مجدد کشت داده شد. در این مرحله کلنیها با ایجاد هاله در اطراف خود بر روی محیط اسکیم‌میلک نشان دادند که خاصیت کازئینازی را دارا می‌باشند. در نتیجه این کلنیها جداسازی شدند و برای تفکیک نهایی بر روی محیط اختصاصی آزوکراتین کشت داده شدند. در این مرحله ۴ کلنی (با اسامی Kr1، Kr2، Kr3 و Kr4) از ۱۰ کلنی شناسایی شده در اطراف خود هاله ایجاد کردند که نشان از فعالیت کراتینولیتیکی این سویه‌ها می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنیهای کشت داده شده بر روی محیط کشت حاوی آزوکراتین.

پس از تهیه سوبسترای کراتین و محیط کشت حاوی این سوبسترا، ۴ کلنی موجود، هرکدام برای تعیین فعالیت بیشتر بر روی این محیط کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در این مرحله کلنیها بر اساس قطر هاله از نظر فعالیت بیشتر مشخص شدند که کلنی Kr1 دارای بیشترین فعالیت پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بود و بیشترین قطر هاله را در بین سایر کلنیها دارا بود (شکل ۲).



شکل ۲- ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی کشت داده شده بر روی محیط کشت حاوی کراتین(تصویر مربوط به سویه Kr2 می‌باشد).

پس از شناسایی مورفولوژیکی سویه Kr1 به صورت کوکسی گرم مثبت دیده شد. نتایج بررسی بیوشیمیایی سویه Kr1 در جدول ۱ آورده شده است. در آنالیز TSI اگر هم عمق و هم سطح لوله، قرمز باشد، باکتری یک غیرتخمیر کننده می‌باشد در این بررسی، سویه Kr1 هم در عمق و هم در سطح (کل محیط کشت داخل لوله) قرمز بود.

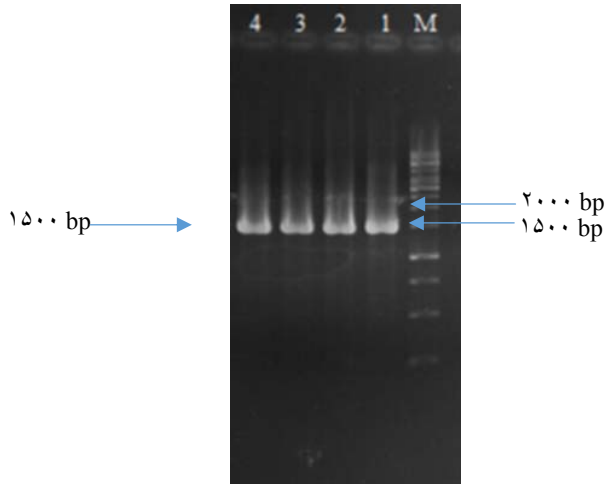
جدول ۱- آنالیز مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه *Staphylococcus lentus* SLKr1

Biochemical test	Resullts
Gram staining	+
Catalase test	+
Amylase test	-
Cellulase test	-
Lecithinase test	-
gelatinase test	-
Urease test	+
Citrate lyase	-
OF aerobic	+
OF anaerobic	+
Biofilm test	-

*علامت (+) به معنی فعالیت باکتری و علامت (-) به معنی عدم فعالیت باکتری می‌باشد.

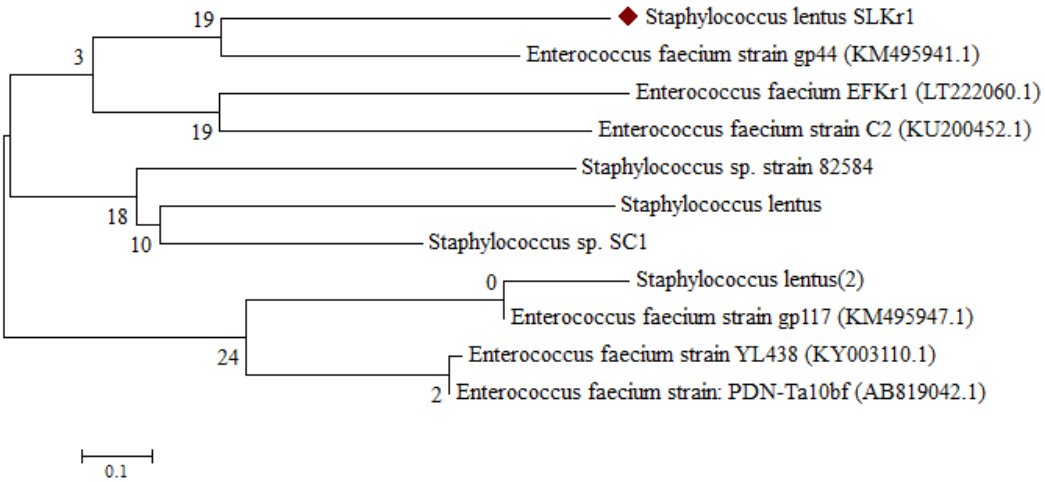
هضم میکروبی پر با استفاده از سویه Kr1 در شرایط هضم با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۸۰rpm انکوبه‌گذاری نشان داد که در کمتر از ۴۸ ساعت هضم پر انجام شد. اما به منظور هضم کامل، انکوبه‌گذاری به مدت یک هفته ادامه پیدا کرد. برای بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز حاصل از سویه Kr1 از روش تغییر یافته گوارتانان (Govarthanan) و همکاران (۱۴)، استفاده شد. این آزمایش با سه تکرار بر روی آنزیم کراتیناز حاصل از سویه وحشی انجام شد که در آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. نتیجه این آزمایش نشان داد که، فعالیت آنزیم کراتیناز حاصل از این سویه وحشی در طول موج ۲۸۰ نانومتر، به طور متوسط برابر با ۰/۵۶ می‌باشد.

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج انجام شد و مقدار ۵۰ میکرولیتر DNA با غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر حاصل گردید. همانطور که در شکل (شکل ۳) مشاهده می‌گردد، در چاهکهای شماره ۴-۱، تک‌باند خالص و با وضوح بالا، مربوط به ژن تکثیر شده 16S rRNA با اندازه ۱۵۰۰ جفت باز می‌باشد.



شکل ۳- الکتروفورز ژن 16S rRNA تکثیرشده به روش PCR. M) نشانگر اندازه مولکولی 1kb، چاهکهای ۱-۴) محصول PCR به ترتیب مربوط به سویه‌های Kr1- Kr4 (تکثیر ژن 16S rRNA).

محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تعیین توالی به شرکت ژن‌فناوران ارسال شد. تطابق توالی 16S rRNA تکثیر شده سویه Kr1 با سایر توالیهای 16S rRNA موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که باکتری مورد نظر متعلق به جنس *استافیلوکوکوس* سویه *لنتوس* می‌باشد. سویه باکتری *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 با شماره LN999936.1 (*Staphylococcus lentus* SLKr1) در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شد. رسم درخت فیلوژنیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 انجام گرفت. در واقع همردیفی توالی با استفاده از Clustal W و همچنین برای رسم درخت تکاملی از روش neighbor-joining موجود در نرم افزار MEGA 5 استفاده شد. از روش بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار برای ارزیابی درخت ترسیم شده استفاده شد (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن 16S rRNA باکتری استافیلوکوکوس لنتوس SLKr1 و سایر توالیهای موجود در بانک ژنی NCBI که نشان دهنده موقعیت این سویه در میان سایر سویه‌ها می‌باشد. رسم این درخت بر اساس الگوریتم neighbor-joining و با Bootstrap (1000 replication) می‌باشد.

این روش یک آزمون آماری درختهای فیلوژنی با استفاده از روش نمونه برداریهای متعدد از داده‌های اولیه است. در این آزمون، نتایج به صورت عدد در کنار گره یک درخت نشان داده می‌شود که در واقع درصد دفعاتی است که هر شاخه مشخص در نمونه برداری مختلف توسط این آزمون و درختهای حاصل از آن تشکیل می‌شود.

بحث

کراتیناز از آنزیمهای پروتئولیتیک در طبیعت می‌باشند. این آنزیم در دسته پروتئینازهای با مکانیسم ناشناخته قرار گرفته‌اند که توسط کمیته نامگذاری اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی با EC نامبر (3.4.99.11) (۸) شناخته می‌شود. اخیراً از کراتیناز به عنوان یک سرین پروتئاز نام برده می‌شود چرا که ۹۷ درصد از توالی آن مشابه با پروتئاز قلیایی بوده و توسط مهار کننده‌های سرین پروتئازی مهار می‌شود. و گاهی اوقات، به صورت یک پروتئاز سرین در ترکیب با یک پروتئاز سیستئین و یک متالوپروتئاز یافت شده است (۲۹).

کراتیناز تنها در حضور کراتین به عنوان سوبسترا، تولید می‌شود. که عمدتاً پیوندهای دی‌سولفیدی را مورد هدف قرار می‌دهد. گزارشهای زیادی مبنی بر تولید کراتیناز توسط میکروارگانیسمهای مختلف وجود دارد. این آنزیم توسط قارچها، استرپتومایسس و باکتریها در pH قلیایی و درجه حرارت بالا تولید می‌شوند (۲۳). در مطالعه حاضر به بررسی میکروارگانیسمهای تجزیه‌کننده کراتین موجود

در بستر مرغداری پرداخته شد که در نتیجه کشت اختصاصی باکتریهای جدا شده بر روی محیط کشت حاوی کراتین (پر مرغ)، تعداد چهار سویه باکتریایی مجزا شد. توالی ژن 16S rRNA دارای بخشهای حفاظت شده و غیرحفاظت شده می‌باشد که از اطلاعات مربوط به این بخشها برای شناسایی گونه‌های باکتریایی استفاده می‌شود (۱). در بین سویه‌های تفکیک شده پس از بررسیهای بیوشیمیایی و مولکولی، سویه‌ای که بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی را دارا بود، *استافیلوکوکوس لنتوس* شناسایی شد. این سویه به عنوان اولین سویه *استافیلوکوکوس* می‌باشد که دارای فعالیت کراتینولیتیکی بوده و تاکنون در پایگاه اطلاعات داده‌ای NCBI گزارش نشده است.

در سال ۲۰۱۲، گروهی از محققین به مطالعه جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات باکتریهای تجزیه کننده پر پرداختند. برای این منظور، باکتریهایی که مسئول تجزیه کراتین بودند از لحاظ خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و محیط کشت، بررسی و شناسایی شدند. نتایج مطالعات موروفولوژی و بیوشیمیایی، باکتریهای موجود را جزء باسیلوسها معرفی کردند (۴). وربلسکا (Wróblewska) و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی فعالیت آمیلولیتیکی سویه‌های کوآگولاز منفی استافیلوکوکوس پرداختند که در نتایج خود گزارش کردند از بین ۳۰ سویه، ۲۳ سویه دارای فعالیت آمیلولیتکی بوده و ۷ سویه باقی مانده این فعالیت را دارا نیستند (۳۱). این نتایج با نتایج این مطالعه مطابقت داشت چرا که در این مطالعه به این نتیجه رسیده شد که سویه *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 فاقد فعالیت آمیلولیتیکی می‌باشد. طبق گزارش استانداردهای انگلستان جهت تحقیقات میکروبیولوژی، سویه *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* دارای فعالیت کاتالاز و اوره‌آز مثبت می‌باشد و این سویه فاقد فعالیت ژلاتین هیدرولاز بوده و همچنین قادر به رشد در شرایط هوازی می‌باشد (۵). این نتایج با نتایج این مطالعه که سویه *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 فاقد فعالیت ژلاتین هیدرولیز بوده و دارای فعالیت کاتالاز و اوره‌آزی می‌باشد، به صورت کامل مطابقت دارد.

سایبابو (Saibabu) و همکاران در سال ۲۰۱۳ به جداسازی، خالص‌سازی و تعیین ویژگیهای کراتیناز حاصل از *B. megaterium* پرداختند. در این مطالعه، باکتریها از خاکهای حاوی ضایعات دفعی مزارع پرورش طیور جمع‌آوری شدند. این باکترهای استخراج شده بر روی محیط کشت آگار حاوی کراتین کشت داده شدند و کلنیهای رشد یافته بر این محیط را به عنوان تولید کننده‌های آنزیم شناسایی کردند. بر اساس آزمایشهای بیوشیمیایی و میکروسکوپی، باکتریهای ایزوله شده از خانواده باسیلوس *megaterium* بودند (۲۶). تاکنون گزارشی مبنی بر فعالیت *استافیلوکوکوس* در تجزیه پر ارائه نشده است. بنابراین در این مطالعه برای اولین‌بار سویه *استافیلوکوکوس لنتوس* به عنوان یک سویه با فعالیت کراتینولیتیکی گزارش می‌شود. براندلی و ریفل (Brandelli and Riffel) (۲۰۰۵)، تولید کراتیناز خارج سلولی را توسط *Chryseobacteriom sp*. مورد بررسی قرار دادند. شدت تجزیه آنزیم در این مطالعه در دامنه دمایی ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و pHهای ۸-۶ به دست آمد که ماکسیمم فعالیت آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۶ و ۷ مشاهده شد (۷). این در صورتی می‌باشد که در این مطالعه، *استافیلوکوکوس لنتوس* دارای بیشترین فعالیت کراتینازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH ۷/۵ بود. امروزه محققین در پی تولید و پرورش میکروارگانیسمهایی هستند که با سرعت بیشتر و هزینه کمتر باعث تولید آنزیم می‌شوند. بنابراین انتظار می‌رود که در آینده‌ای نزدیک شاهد تولید فرآورده‌هایی مانند قند، اتانول و دیگر محصولات تخمیری از زباله‌های مواد غذایی، کاغذهای باطله و پسماندهای کشاورزی می تون برد (۲).

نتیجه‌گیری

آنزیمهای میکروبی از اهمیت زیادی در توسعه فرآیندهای

زیستی برخوردار می‌باشند. نقش حیاتی آنزیمهای میکروبی به عنوان کاتالیزور متابولیک، منجر به استفاده از آنها در صنایع و برنامه‌های کاربردی مختلف شده است. بنابراین استفاده از باکتریهای تجزیه کننده کراتین به عنوان باکتریهای کراتینولیتیک می‌تواند نقش عظیمی در استفاده از پروتئین غیرقابل هضم کراتین (پر) مورد استفاده در تغذیه طیور داشته باشد. بنابراین باکتری شناسایی شده در این مطالعه، *استافیلوکوکوس لنتوس* SLKr1 یک باکتری تولید کننده کراتیناز با قابلیت کراتینولیتیکی بالا می‌باشد که قابلیت استفاده در صنایع مختلف مانند صنعت چرم‌سازی، صنعت خوراک دام و شوینده‌ها را دارد. بر اساس مطالعات انجام شده، تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر فعالیت کراتینولایتیکی *استافیلوکوکوس* در پایگاه اطلاعات داده‌ای (NCBI) ارائه نشده است. بنابراین در این مطالعه برای اولین‌بار این سویه باکتریایی به عنوان یک سویه تولید کننده آنزیم کراتیناز معرفی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کسانی که در فراهم نمودن شرایط این پروژه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

۱- رمضانی‌پور، ن، بدویی دلفارد، ا، کرمی، ز، نمکی شوشتری، ع، ۱۳۹۵، شناسایی و معرفی سویه پانتوآ آگلومرانس AKH25 با استفاده از توالی 16S rRNA و بررسی قدرت تجزیه کنندگی مالونونیتریل آن، مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۹، شماره ۲، ص ۲۰۸-۱۹۸.

۲- عصاره، ر، شهبانی ظهیری، ح، عشقی، س، ۱۳۹۳، جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی تجزیه کننده سلولز از خاک، مجله زیست شناسی ایران، دوره ۲۷، شماره ۱، ص ۱۱۰-۹۹.

3- Adelere, IA and Lateef, A. 2016. Keratinases: emerging trends in production and applications as novel multifunctional biocatalysts. Kuwait Journal of Science. 43(3).

4- Anitha, T and Palanivelu, P. 2012. Production and characterization of keratinolytic protease (s) from the fungus, Aspergillus parasiticus. International Journal of Research in Biological Sciences. 2:87-93.

5- Anonymous, 2014. Identification of Staphylococcus species, Micrococcus species and Rothia species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 7 | Issue no: 3 | Issue date: 12.11.14 | Pages: 32.

6- Bernal, C, Cairo, J and Coello, N. 2006. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from Kocuria rosea. Enzyme and microbial technology. 38(1):49-54.

7- Brandelli, A and Riffel, A. 2005. Production of an extracellular keratinase from Chryseobacterium sp. growing on raw feathers. Electronic Journal of Biotechnology. 8(1):35-42.

8- Cai, C-g, Chen, J-s, Qi, J-j, Yin, Y and Zheng, X-d. 2008. Purification and characterization of keratinase from a new Bacillus subtilis strain. Journal of Zhejiang University-Science B. 9(9):713-20.

9- Duarte, T, Oliveira, S, Macrae, A, Cedrola, S, Mazotto, A, Souza, E, Melo, AC and Vermelho, AB. 2011. Increased expression of keratinase and other peptidases by Candida parapsilosis mutants. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 44(3):212-6.

10- El-Naghy, M, El-Ktatny, M, Fadl-Allah, E and Nazeer, W. 1998. Degradation of chicken feathers by Chrysosporium georgiae. Mycopathologia. 143(2):77-84.

11- El-Refai, H, AbdelNaby, M, Gaballa, A, El-Araby, M and Fattah, AA. 2005. Improvement of the newly isolated Bacillus pumilus FH9 keratinolytic activity. Process Biochemistry. 40(7):2325-32.

12- Fakhfakh, N, Ktari, N, Siala, R and Nasri, M. 2013. Wool-waste valorization: production of protein hydrolysate with high antioxidative potential by fermentation with a new keratinolytic bacterium, Bacillus pumilus A1. Journal of applied microbiology. 115(2):424-33.

13- Friedrich, J, Gradišar, H, Vrecl, M and Pogačnik, A. 2005. In vitro degradation of porcine skin epidermis by a fungal keratinase of

Doratomyces microsporus. Enzyme and microbial technology. 36(4):455-60.

14- Govarthanan, M, Selvankumar, T and Arunprakash, S. 2011. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather degrading bacillus sp. from chick feather waste. International Journal of Pharma and Bio Sciences. Vol 2. Issue 3.

15- Gradišar, H, Kern, S and Friedrich, J. 2000. Keratinase of Doratomyces microsporus. Applied Microbiology and Biotechnology. 53(2):196-200.

16- Gushterova, A, Vasileva-Tonkova, E, Dimova, E, Nedkov, P and Haertle, T. 2005. Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21(6):831-4.

17- Hall, BG. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. Molecular biology and evolution. 30(5):1229-35.

18- Ignatova, Z, Gousterova, A, Spassov, G and Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain Thermoactinomyces candidus. Canadian Journal of Microbiology. 45(3):217-22.

19- Kojima, M, Kanai, M, Tominaga, M, Kitazume, S, Inoue, A and Horikoshi, K. 2006. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from Bacillus pseudofirmus FA30-01. Extremophiles. 10(3):229-35.

20- Laurila, K. 2014. Optimization of growth conditions for a recombinant keratinase producing bacterial strain. University of Borås School of Engineering.

21- Matikevičienė, V, Masiliūnienė, D and Grigiškis, S. 2015. Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity. Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference. Environment. Technology. Resources.

22- Onifade, A and Babatunde, G. 1998. Comparison of the utilisation of palm kernel meal, brewers' dried grains and maize offal by broiler chicks. British poultry science. 39(2):245-50.

23- Poopathi, S, Thirugnanasambantham, K, Mani, C, Lakshmi, P and Ragul, K. 2014. Purification and characterization of keratinase from feather degrading bacterium useful for mosquito control–a new report. Trop Biomed. 31:97-109.

24- Riffel, A, Brandelli, A, Bellato, CdM, Souza, GH, Eberlin, MN, Tavares, FC. 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from Chryseobacterium sp. kr6. Journal of biotechnology. 128(3):693-703.

25- Riffel, A, Lucas, F, Heeb, P and Brandelli, A. 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Archives of Microbiology. 179(4):258-65.

26- Saibabu, V, Niyonzima, FN and More, SS. 2013. Isolation, partial purification and characterization of keratinase from Bacillus magaterium. International Research Journal of Biological Sciences. 22(2):13-20.

27- Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N and Mangamoori LN. 2008. Purification and characterization of an alkaline keratinase from Streptomyces sp. Bioresource Technology. 99(6):1596-602.

28- Vidhya, and Palaniswamy. M. 2013. Identification and characterization of a local bacterial strain with high keratinolytic activity from chicken feathers. *IJPBS*. Volume: 3. Issue: 3. 308-316.

29- Wang, Z, Qiao, S, Lu, W and Li, D. 2005. Effects of enzyme supplementation on performance, nutrient digestibility, gastrointestinal morphology, and volatile fatty acid profiles in the hindgut of broilers fed wheat-based diets. Poultry Science. 84(6):875-81.

30- Wawrzkiewicz, K, Łobarzewski, J and Wolski, T. 1987. Intracellular keratinase of Trichophyton gallinae. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 25(4):261-8.

31- Wróblewska, J, Niezgódka, P, Gospodarek, E and Wróblewski, M. 2011. The evaluation of amylolytic activity of strains of coagulase negative staphylococci. Medycyna Doswiadczalna I Mikrobiologia. 63(3):219-23.

Identification of the newly isolated *Staphylococcus lentus* SLKr1 as a keratinase enzyme producing bacteria

Rahimnahal S.[1], Meimandipour A.[2], Fayazi J.[1], Shamsara M.[2], Beigi Nasiri M.T.[1] and Karkhane A.A.[2]

[1] Deprt. of Animal Science, Ramin University of agriculture and Natural Resources, Ahwaz, I.R. of Iran

[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Feathers, a largely wastes produced in poultry industries represents a rich insoluble protein resource containing over 90% keratins**.** The aim of this study was to analyze and characterize the diversity of keratinase producing bacteria in broiler chicken litter house. A total of 10 gram samples were cultured in skim milk agar. The isolates were cultured on keratine and Azokeratin agar medium using keratin as the sole source of carbon to isolate keratinolytic microbes. The colonies with high feather hydrolyzing ability were subjected to identification by microscopic observation, biochemical characterization and molecular analysis. The results showed that among a total of 10 bacterial strains obtained from skim milk agar plates with proteolytic activity, only four bacteria were capable of degrading keratin. According to the biochemical and morphological characters, the isolated strain was grouped under the genus of *Coccus* (*Staphylococcus*). Based on 16S rRNA typing and phylogenetic analysis this strain was identified as *Staphylococcus lentus* SLKr1 and according to diameter clear zone on keratin agar medium, exhibited higher level of keratinolytic activity among other isolated strains. *Staphylococcus lentus* SLKr1 as a new keratinase producing bacteria also possessed high caseinase activity but was negative in amylase, lecithinase, cellulase and gelatinase production. Taken together, these results suggest *Staphylococcus lentus* SLKr1, a new keratinase producing bacteria with high keratinolytic activities which have the potential use in industrial biotechnology.

Key words*:* Bacteria, Keratinase, Screening, *Staphylococcus lentus*.