بهینه سازی تولید آنزیم کراتیناز توسط سویه بومی Bacillus sp. FUM120 به روش تک متغیره

رقیه مریدشاهی[۱]، معصومه بحرینی[۱*]، میرزا محمدرضا شریف مقدم[۱]، احمدآسوده[۲] و بهنازکروژدهی[۳]

[۱] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[۲] ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه شیمی

[۳] ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

امروزه با توجه به کاربرد گسترده آنزیم کراتیناز در صنایع مختلف از جمله خوراک دام، صنعت چرم، تصفیه فاضلاب، پزشکی و داروسازی تقاضا برای این آنزیم با کاربرد صنعتی رو به افزایش است. در پژوهش حاضر تولید آنزیم کراتیناز در جدایه FUM120 کراتینولیتیک، جدا شده از مرغداریهای اطراف مشهد مورد بررسی و بهینه سازی قرارگرفت. با استفاده از سوبسترای آزوکراتین، مشخص گردید که این باکتری در ساعت ۷۲ رشد خود با ۴۹/۹۶۵ U/ml بیشترین میزان تولید خود را دارا می باشد. سپس بهینه سازی تک متغیره پارامترهای دما، pH، غلظت سوبسترا، منابع کربن و نیتروژن اضافه، میزان تلقیح و هوادهی به منظور افزایش تولید آنزیم کراتیناز انجام گرفت و مشخص گردید pH:۱۰/۵ و غلظت ۰/۶ درصد آمونیوم کلرید به‌عنوان منبع نیتروژن اضافه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تأثیر قابل توجهی در افزایش فعالیت کراتینولیتیکی دارند و باعث افزایش بیش از ۲ برابر تولید آنزیم گردیدند. همچنین باکتری بدون نیاز به منبع کربن اضافه با میزان هوادهی ۵۰ درصد قادر به تولید مقادیر بالایی از آنزیم بود. در نهایت تولید آنزیم به U/ml ۱۱۷/۴۵ واحد آنزیمی رسید و افزایش ۲/۳۴ برابری را نسبت به ابتدای بهینه سازی نشان داد. با بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و توالی ژن 16S rRNA مشخص گردید، جدایه FUM120 متعلق به جنس باسیلوس می باشد و ۱۰۰ درصد مشابه سویه Bacillus pumillus ATCC 7061 می باشد.

واژه های کلیدی: کراتین، پر، آزوکراتین، *باسیلوس پومیلوس*، فعالیت کراتینولیتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۰۲ ، پست الکترونیکی: mbahreini@um.ac.ir

مقدمه

صنعت مرغداری یکی از صنایع مهم مواد غذایی است که تولیدات آن شامل گوشت و تخم‌مرغ به عنوان یکی از منابع اصلی رژیم غذایی اکثر مردم دنیا می باشد. این صنعت دائما در حال رشد بوده و بزرگترین تولید کنندگان آن در سراسر جهان شامل آمریکا، برزیل و چین با بیش از۴۰ میلیون تن تولید در سال و اتحادیه اروپا با بیش از ۱۱ میلیون تن تولید در سال می‌باشند. این تولید انبوه باعث ایجاد ضایعات زیادی شده است. پرمرغ، یکی از این ضایعات فراوان است که حدود ۸ درصد وزن مرغ بالغ را تشکیل می دهد(۲). به این‌ترتیب میلیونها تن پر، سالانه در صنایع مرغداری تولید می‌شود که منجر به آلودگیهای زیست محیطی، اتلاف ذخایر غنی از پروتئین، بروز عفونتهای مختلف و ایجاد مشکلاتی در ذخیره سازی، حمل و نقل، کنترل انتشار و دفع خاکستر حاصل از آن می-شود (۱۵ و ۲۴).

پر شامل۹۰ درصد پروتئین خام در قالب کراتین می باشد. کراتین پروتئینی فیبری شکل، نامحلول با اتصالات عرضی دی‌سولفیدی، هیدروژنی و باندهای هیدروفوبیک زیاد می باشد (۳۵). کراتین به دو گروه بزرگ α-کراتین (مو، ناخن و پشم) و β-کراتین (پر) طبقه‌بندی می‌شود (۱۱). این پروتئین نسبت به تجزیه توسط آنزیمهای پروتئولیتیک معمول مانند تریپسین، پاپائین و پپسین بسیار مقاوم است (۲۹)، ولی با وجود این ساختار سخت، توسط روشهای بیولوژیکی، شیمیایی و مکانیکی تجزیه می‌شود (۵). در روشهای مکانیکی، پر را با اعمال فشار و حرارت زیاد به پودر پر تبدیل نموده و از آن به عنوان مکمل خوراک دام استفاده می‌کنند، اما این پروسه دارای معایبی نظیر تخریب اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و متیونین، هزینه بسیار بالا، کاهش کیفیت غذایی و گوارش آن می باشد (۱۶). در روشهای شیمیایی از مواد سمی نظیر سولفید سدیم برای موزدایی استفاده می‌شود که استفاده از آن باعث آلودگی زیستی و همچنین خطر آفرین برای کارکنان مربوطه می باشد. وجود این معایب سبب تمرکز بر روی استفاده از روشهای زیستی مثل استفاده از کراتینازهای میکروبی گردیده است (۱۷ و ۲۷).

کراتینازها در جهان میکروبی بسیارگسترده هستند و از میکروارگانیسمهای مختلفی (قارچها، باکتریها و آرکیها) جدا شده‌اند. کراتینازها، پروتئازهایی هستند که توانایی تجزیه کراتین را دارند و تقریباً همه آنها سرین یا متالوپروتئاز هستند (۳). آنزیمهای کراتینولیتیک باکتریایی در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی و در بخشهای مختلف صنعتی کاربرد دارند و از آنها به عنوان پروتئازهای مدرن نام می‌برند (۶). از کاربردهای متعدد کراتینازها می‌توان استفاده آنها را در تهیه خوراک دام (۹)، صنایع چرم (۴)، تصفیه فاضلاب (۳۲)، مواد شوینده (۲۸)، سوختهای زیستی (۳۸)، در پزشکی (۳۱) و داروسازی(۱۰) نام برد. کاربردهای مختلف کراتیناز منجر به افزایش تقاضا برای تولید این آنزیم در مقیاس صنعتی شده است. بنابراین تلاش در راستای تولید کراتیناز با ویژگیهای برتر و تولید بیشتر افزایش یافته است.

هدف از این تحقیق بررسی خصوصیات کراتینولیتیک بودن جدایه FUM120 جداسازی شده از ضایعات مرغداریهای اطراف مشهد بود. پس از شناسایی جدایه به روش مورفولوژیکی و مولکولی، شرایط کشت جهت افزایش میزان تولید آنزیم بهینه‌سازی گردید.

مواد و روشها

محیط کشت مورد استفاده: در این پژوهش از سه محیط کشت استفاده شد که عبارت بودند از: محیط کشت اختصاصی مایع پر Feather meal broth (FMB) حاوی ترکیبات NaCl (0/5 g/l)، $MgCl_2.6H_2O$ (0/1 g/l)، (0/4 g/l) K_2HPO_4، KH_2PO_4 (0/3 g/l) و پَر (1 g/l) که در یک لیتر آب مقطر حل شد و سپس pH محیط روی ۷/۵ تنظیم گردید. محیط کشت اختصاصی جامد پر Feather (FMA) meal agar با افزودن ۱/۵ درصد آگار به محیط کشت اختصاصی مایع تهیه گردید و محیط کشت اسکیم میلک آگار (Merk, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تهیه و pH محیط روی ۷/۵ تنظیم گردید.

روش تهیه پودر پر: جهت تهیه پودر پر، ابتدا مقداری پر صنعتی خریداری و سپس با آب و مواد شوینده شستشو داده شد. سپس جهت خشک شدن پر، به مدت یک شب در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، در مرحله بعد برای حذف لیپید موجود در سطح پر، به مدت یک ساعت تحت تیمار با محلول کلروفرم : اتانول با نسبت (۱:۱) (حجمی-حجمی) قرار گرفت و مجدداً یک شب در دمای ۶۰ درجه قرار داده شد و در نهایت با استفاده از دستگاه mixer meal (شرکت امین آسیا، ایران) پودر گردید (۲۱).

روش جداسازی و نگهداری باکتری: نمونه های خاک و فاضلاب مرغداریها و کشتارگاههای اطراف شهر مشهد جهت جداسازی و غربالگری باکتریهای تجزیه کننده پر

جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. از نمونه ها سریال رقت تهیه و بر روی پودر پر جامد (FMA) کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند. سپس جدایه هایی که هاله بزرگتری در اطراف خود ایجاد کرده بودند جداسازی و خالص گردیدند. از بین مجموعاً ۱۲۰ جدایه باکتریایی جداسازی شده جدایه FUM120 که دارای هاله بزرگی بود جهت ادامه کار انتخاب گردید. پس از خالص سازی، خاصیت کراتینولیتیک بودن نمونه از نظر کیفی مورد سنجش قرار گرفت. مقدار ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت استاندارد نیم مک فارلند از جدایه مورد نظر روی محیط اسکیم میلک آگار به صورت نقطه‌ای کشت و به انکوباتور ۳۷ درجه منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، خاصیت پروتئولیتیکی آن ضمن رشد و تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی بررسی شد. همچنین به طور اختصاصی‌تر خاصیت کراتینولیتیکی جدایه با کشت آن به همین روش در محیط FMA که دارای ۱ درصد پودر پر به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن بود، با رشد و تشکیل هاله اطراف کلنی مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از قدرت کراتینولیتیکی جدایه، نمونه در محیط اسلنت (Slant) اسکیم میلک آگار یا FMA برای نگهداری کوتاه مدت منتقل شد و برای نگهداری دراز مدت، یک کلنی خالص به محیط نوترینت براث (Nutrient broth) تلقیح و پس از رشد مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری و ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل در میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و بعد از هم زدن به فریزر ۲۰- درجه جهت نگهداری منتقل شد.

ساخت سوبسترای آزوکراتین: برای تهیه آزوکراتین، ابتدا ۵ میلی‌گرم پودر پر با ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط و ۸ میلی‌لیتر محلول سدیم بیکربنات ۱۰ درصد (وزنی-حجمی) به آن اضافه و با کمک همزن مغناطیسی همگن شد (محلول ۱). در یک بشر جداگانه ۳۵۰ میلی‌گرم اسید سولفانیلیک و ۱۵۰ میلی‌گرم سدیم نیتریت به ترتیب در ۱۵ میلی‌لیتر NaOH ۰/۲ مولار حل و با ۱/۵ میلی لیتر HCl ۵ مولار اسیدی و به‌مدت ۲ دقیقه با کمک همزن مغناطیسی مخلوط شد (محلول ۲). پس از آن با افزودن ۰/۸ میلی‌لیتر NaOH ۵ مولار محلول خنثی گردید. این محلول به محلول شماره یک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه با کمک همزن مغناطیسی مخلوط شد و در ادامه فیلتر گردید. آزو کراتین نامحلول حدود ۳ بار با کمک آب دیونیزه شسته و به مدت ۲۴ ساعت دیالیز گردید و سپس مجدداً فیلتر شد. پروسه فیلتر کردن تا زمانی‌که pH محلول فیلتر شده به ۷-۶ رسید و میزان جذب آن در ۴۵۰ نانومتر کمتر از ۰/۰۱ شد، ادامه یافت. در نهایت آزوکراتین سنتزی توسط دستگاه فریز درایر (Christ Co., Germany) خشک و در دمای ۴ درجه نگهداری شد (۱۲).

سنجش کمی فعالیت آنزیم کراتیناز: از کشت شبانه جدایه FUM120، میزان ۲ درصد (حجمی-حجمی) با غلظت استاندارد نیم مک فارلند به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت FMB به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن تلقیح شد. نمونه به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه و با دور ۱۵۰ rpm درون شیکر انکوباتور قرار گرفت و در فواصل زمانی ۲۴ ساعت ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و در ۱۰۰۰۰rpm، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به عنوان آنزیم خام برداشته و میزان فعالیت آنزیم کراتیناز با استفاده از سوبسترای آزوکراتین مورد سنجش قرارگرفت.

برای سنجش فعالیت آنزیمی، ۱۰ میلی‌گرم سوبسترای آزوکراتین در ۹۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl با غلظت ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۸ اضافه گردید. مخلوط تا حل‌شدن کامل سوبسترای آزوکراتین در بافر همزده شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم خام تهیه شده اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردید. برای متوقف نمودن فعالیت آنزیمی، محلول به مدت نیم ساعت در یخ قرار داده شد و پس از آن محلول

فیلتر گردید. در پایان جذب نوری نمونه در مقایسه با گروه شاهد در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. از محیط کشت بدون تلقیح باکتری به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. آزمایشات در دو تکرار انجام و میانگین به دست آمده از دو تکرار به عنوان نتیجه اعلام شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان ۰/۰۱ افزایش واحد جذب در ۴۵۰ نانومتر در هر میلی‌لیتر در برابر نمونه شاهد پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در نظر گرفته شد (۲۲).

نتایج حاصل از خوانش جذب به واحد آنزیمی تبدیل گردید بدین صورت که یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان ۰/۰۱ افزایش واحد جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر در هر میلی‌لیتر در برابر نمونه شاهد پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در نظر گرفته شد (در این روش به منحنی استاندارد آنزیم نیازی نمی باشد) (۱).

شناسایی ریخت شناسی و بیوشیمیایی جدایه: بررسی مشخصات فنوتیپی و انجام آزمونهای تشخیص اولیه، شامل رنگ آمیزی گرم، رنگ آمیزی اسپور و تست کاتالاز بر روی جدایه انجام گردید. در ادامه آزمونهای افتراقی شامل آمیلاز، لیتموس میلک، ژلاتیناز، اوره آز، احیای نیترات، سیمون سیترات آگار، SIM، متیل رد (MR) ، وژپروسکوئر(VP)، تست اکسیداسیون –تخمیر (O-F) و رشد روی محیط ۱۰ درصد نمک سدیم کلرید با استناد به باکتریولوژی سیستماتیک Bergey 's انجام و بررسی شد (۱۴). محیطهای کشت به صورت تجاری از شرکت Merck آلمان تهیه و طبق دستور العمل شرکت سازنده ساخته شد.

شناسایی مولکولی جدایه: DNA ژنومی سویه مورد نظر با استفاده ازکیت استخراج (Macherey-Nagel CO.,Germany) DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد و ژن 16S rRNA سویه با استفاده از آغازگرهای عمومی (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 27F و 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R تکثیر گردید. واکنش PCR با استفاده از کیت آمپلیکون (Amplicon, Denmark) انجام شد. مواد مورد نیاز جهت انجام PCR درحجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (10 pmol)، ۲ میکرولیتر DNA ، ۱۲ میکرولیتر Master mix و۱۰ میکرولیتر آب بود.

برنامه دمایی واکنش PCR که شامل، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه برای یک سیکل ، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز قطعه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای ۳۰ سیکل وگسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای یک سیکل در برنامه PCR گنجانده و توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD t100 thermal cycler,.USA) انجام شد. پس از پایان یافتن PCR جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز گردید و از مارکر DNA ladder 100bp شرکت فرمنتاز برای مقایسه طول قطعات استفاده شد. محصول PCR، جهت تعیین توالی از طریق شرکت سیناژن ایران به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید. قرابت فیلوژنتیکی جدایه با سویه‌های موجود در پایگاههای اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA (Version7) و هم راستا سازی توالیها با نرم‌افزار MUSCLE انجام شد. همچنین با استفاده از الگوی Neighbour-joining دسته‌بندی توالیها صورت گرفت و از باکتری *Halopenitus persicus* به عنوان outgroup استفاده و درخت فیلوژنی آن رسم گردید.

بهینه‌سازی تک متغیره: جهت افزایش میزان تولید آنزیم شرایط مختلف محیط کشت مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بودند از: دما

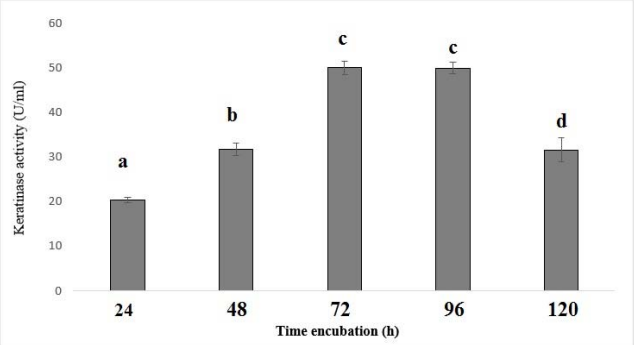
(۲۰، ۳۰، ۳۷، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد) ، pH(۶، ۷، ۸، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵ و۱۲)، غلظت سوبسترای پر (۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ درصد)، منابع کربن مختلف (گلوکز، ساکارز، لاکتوز ،فروکتوز ،مانیتول و نشاسته با غلظت ۱ درصد (w/v)) ، منابع نیتروژن مختلف (منابع آلی شامل پپتون، عصاره مخمر، اوره و از منابع معدنی شامل آمونیوم نیتریت، آمونیوم کلرید و پتاسیم نیتریت با غلظت ۰/۴ درصد (w/v)) و غلظتهای مختلف منبع نیتروژن مطلوب (۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸ درصد)، میزان تلقیح (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و۱۰ درصد (v/v) و هوادهی(۲۵، ۵۰، ۷۰ درصد). بدین صورت که محیط اختصاصی مایع حاوی پر، استریل و سپس سوسپانسیون باکتریایی تلقیح گردید و هر یک از فاکتورهای محیطی مرحله به مرحله بررسی شدند. در انتها به منظور بررسی معنادار بودن تأثیر هر یک از فاکتورها، آنالیز آماری به روش ANOVA صورت گرفت.

نتایج

آنالیز کیفی تولید آنزیم توسط باکتری: فعالیت پروتئازی جدایه FUM120 پس از کشت روی محیط اسکیم میلک آگار مورد بررسی قرار گرفت. هاله ایجاد شده توسط این جدایه در دمای ۳۷ درجه نشان داد که این باکتری دارای خاصیت پروتئولیتیک است. بررسی این باکتری در محیط FMA و تشکیل هاله اطراف آن نیز نشان‌دهنده مثبت بودن فعالیت کراتینولیتیکی جدایه مورد نظر بود (شکل۱).

شکل۱- رشد باکتری در (الف) محیط اسکیم میلک آگار و تشکیل هاله پروتئازی، (ب) محیط FMA و تشکیل هاله کراتینازی

سنجش فعالیت آنزیم کراتیناز: میزان تولید آنزیم توسط جدایه FUM120 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۷/۵ در روزهای اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب برحسب واحد آنزیمی (U/ml) محاسبه گردید. بیشترین میزان تولید آنزیم در روز سوم پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با (U/ml) ۴۹/۹۶۵ اندازه‌گیری گردید که این مقدار تا روز چهارم ثابت و در روز پنجم کاهش یافت (شکل۲).

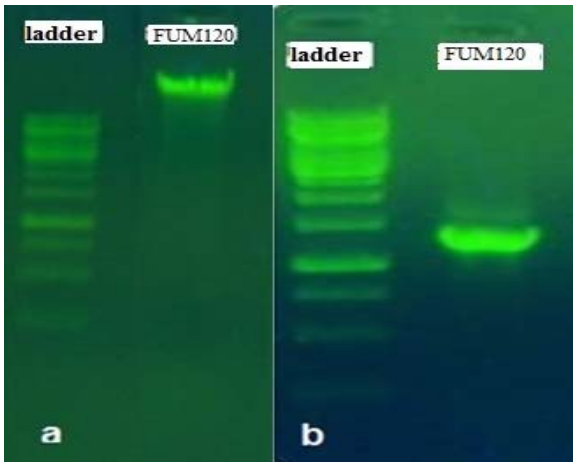


شکل ۲- میزان تولید آنزیم توسط جدایه FUM120 در دوره گرماگذاری (حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

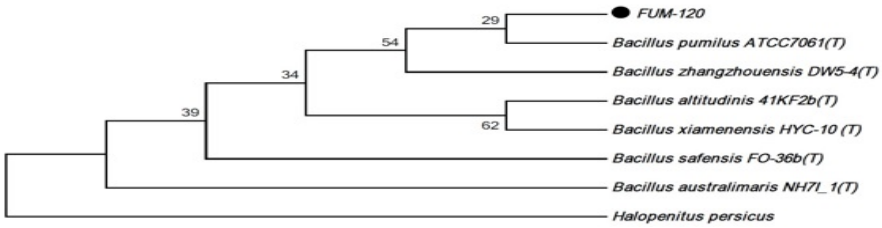
شناسایی میکروارگانیسم و توالی یابی ژن 16S rRNA: جدایه FUM120 طبق خصوصیات مورفولوژی گرم مثبت، دارای اسپور و کاتالاز مثبت بود و بر اساس نتایج تستهای بیوشیمیایی (جدول ۱) و مقایسه توالی ژن 16S rRNA به‌دست آمده با توالیهای موجود در پایگاه اطلاعاتی Ez-Taxon شناسایی و مشخص گردید که دارای تشابه ۱۰۰ درصد با Bacillus pumilus ATCC7061 می باشد. شکل۳ تصویر ژل الکتروفورز DNA استخراج شده و محصول PCR را نشان می دهد و رابطه تکاملی سویه FUM120 با برخی از گونه‌های جنس باسیلوس در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول۱- نتایج تستهای بیوشیمیایی جدایه FUM120

تست	اوره آز	ژلاتیناز	آمیلاز	احیای نیترات	سیترات	لیتموس میلک
نتایج	-	+	-	+	+	Ac-R
تست	MR	VP	O-F	حرکت	تولید H_2S	تولید اندول
نتایج	-	+	-	-	-	-



شکل ۳- تصویر ژل (a): استخراج DNA ژنومی. (b): محصول PCR ژن 16SrRNA سویه FUM120

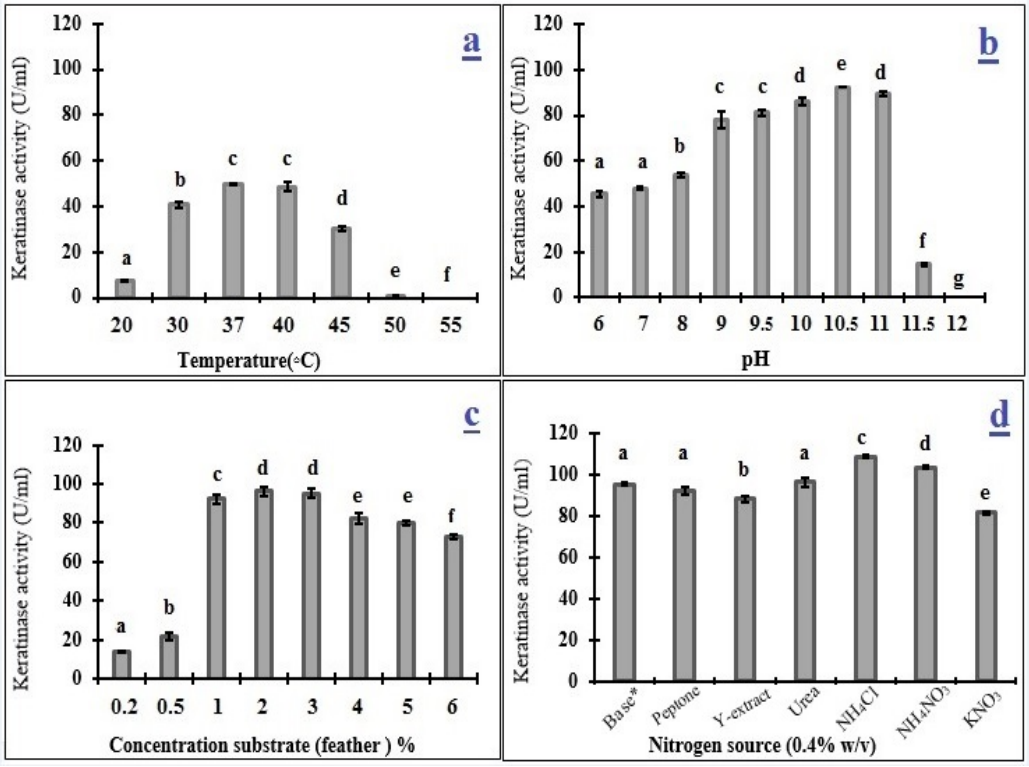


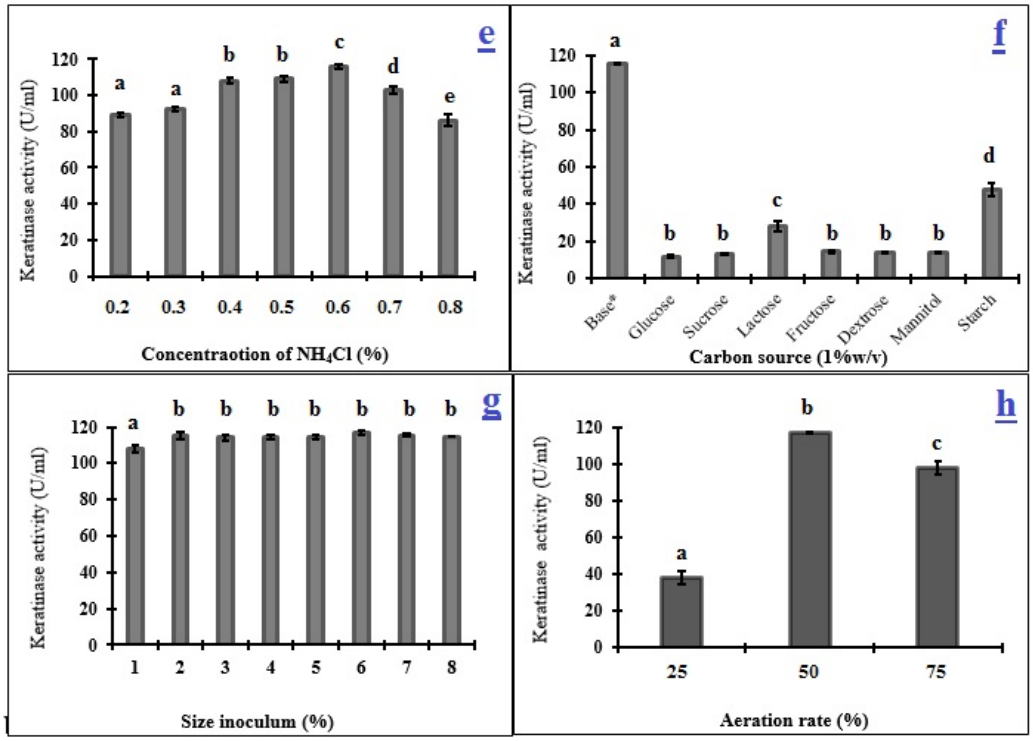
شکل۴- درخت فیلوژنی رابطه بین جدایه FUM120 را با دیگر توالیهای به دست آمده از بانک جهانی ژن نشان می دهد (Halopenitus persicus به عنوان outgroup مشخص گردیده است).

بهینه‌سازی: در این مرحله هدف دستیابی به بهترین شرایط کشت برای جدایه بر اساس فعالیت کراتینولیتیک آن بود. برای این منظور فاکتورهای دما، pH، غلظت سوبسترا، غلظتهای مختلف منابع کربن و نیتروژن، میزان تلقیح و هوادهی بررسی شد. تمام آزمایشات با دو تکرار انجام و میانگین اعداد به دست آمده در نمودارها قرار گرفت. میزان خطای هر آزمایش به صورت Error bar روی هر نمودار مشخص گردید.

با بررسی میزان تولید آنزیم در دماهای مختلف، بیشترین میزان تولید در دمای ۳۷ درجه وکمترین میزان تولید در

دمای ۵۰ درجه به دست آمد. در دمای ۵۵ درجه جدایه قادر به رشد و تولید آنزیم نبود. آنالیز آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان داد، تفاوت معنی داری در فعالیت کراتینولیتیک جدایه در دو دمای ۳۷ و ۴۰ درجه وجود ندارد (شکل۵a). مقایسه میزان تولید آنزیم در pH های مختلف نشان داد که جدایه FUM120 در pH:۱۰/۵ بیشترین فعالیت کراتینولیتیک را دارد. تأثیر pH در این مرحله منجر به افزایش قابل توجه ۱/۸ برابری نسبت به مرحله قبل گردید که نشان دهنده این است که این جدایه تولید کننده یک کراتیناز قلیادوست می‌باشد (شکل۵b). تأثیر درصدهای مختلف وزن پر بر تولید آنزیم مورد سنجش قرار گرفت و بیشترین میزان تولید در ۲ درصد وزنی پر مشاهده شد. نتایج نشان داد افزایش میزان سوبسترا باعث کاهش تولید آنزیم می گردد (شکل ۵c). با بررسی اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید کراتیناز ، حداکثر فعالیت کراتینولیتیکی در محیط حاوی آمونیوم کلرید با افزایش ۱/۱۳ برابری نسبت به مرحله قبل مشاهده شد. لذا غلظتهای مختلف آمونیوم کلرید در میزان عملکرد جدایه نیز بررسی گردید و بیشترین میزان تولید آنزیم در غلظت ۰/۶ درصد آمونیوم کلرید محاسبه شد (شکل۵dو ۵e). بررسی اثر منابع مختلف کربن نشان داد که منابع کربن نه‌تنها باعث افزایش تولید آنزیم نمی‌شوند بلکه باعث کاهش فعالیت آن شده و همچنین مشخص گردید که این جدایه می تواند از پر به عنوان تنها منبع کربن استفاده کند و نیازی به منابع دیگر ندارد (شکل۵f). میزان تولید آنزیم در درصدهای مختلف تلقیح بر حسب واحد آنزیمی (U/ml) محاسبه و نتایج نشان داد درصدهای مختلف میزان تلقیح تفاوت معنی داری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) در میزان عملکرد جدایه ندارد که در نتیجه میزان تلقیح ۲ درصد به عنوان بهینه انتخاب گردید (شکل ۵g). میزان فعالیت کراتینولیتیک جدایه FUM120 در مقادیر ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۲۵ درصد هوادهی در ارلن با گرماگذاری در شیکر انکوباتور ۱۵۰rpm بررسی شد و هوادهی ۵۰ درصد بهترین شرایط فعالیت را برای جدایه فراهم کرد (شکل۵h).





شکل ۵- نمودارهای مربوط به بهینه‌سازی پارامترهای مختلف. نمونه (Base*) در شکل d و f همان محیط پایه مرحله قبل می باشد (حروف یکسان نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

بحث

کراتینازها گروه خاصی از پروتئازها هستند که قابلیت تجزیه کراتین نامحلول و سخت را دارند و به دلیل تنوع زیاد در خصوصیات بیوشیمیایی و سوبستراهای گوناگون حاوی کراتین از جمله پر، پشم، ناخن و مو از سایر پروتئازهای موجود متمایز گردیده‌اند و به دلیل همین ویژگیها به عنوان کاتالیزورهای با ارزش در صنعت مورد توجه قرار گرفته اند (۳۶). جدایه FUM120 جدا شده از مرغداریهای اطراف مشهد متعلق به جنس باسیلوس بود و ۱۰۰ درصد تشابه با سویه *Bacillus pumilus* ATCC7061 داشت. تاکنون چندین مطالعه بر روی سویه‌های *Bacillus pumilus* به عنوان تولید کننده آنزیم کراتیناز انجام شده است. El-Refai و همکاران، چندین باکتری مختلف تجزیه کننده پر را از خاک جداسازی و شناسایی کردند که بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی را در سویه *Bacillus pumilus* FH9 مشاهده نمودند (۷). Rajput و همکارانش نیز یک کراتیناز خارج سلولی از سویه *Bacillus pumilus* KS12 را شناسایی و مورد بررسی قرار دادند (۳۲). همچنین Fakhfakh-Zouari و همکاران سویه *Bacillus pumilus* A1 تولیدکننده آنزیم کراتینولیتیک (KerA1) ، را شناسایی و بررسی کردند (۸).

جدایه مورد نظر بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی خود را پس از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری نشان داد که مشابه نتایج گزارش شده توسط دیگران می باشد (۱۹ و ۳۳). مطالعات حاکی از این است که اکثر سویه‌های باسیلوس معمولاً بیشترین تولید آنزیم کراتیناز را در محدوده دمایی ۵۰-۳۰ درجه سانتی گراد نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر نیز دمای ۳۷ درجه بهترین شرایط را برای حداکثر فعالیت کراتینولیتیکی جدایه مهیا کرد. در این راستا Matikevičienė و همکاران و El-Refai و همکاران نیز دمای بهینه ۳۷ درجه را برای حداکثر فعالیت کراتینولیتیکی باکتریهای *B. licheniformis* و *Bacillus pumilus* FH9 به

ترتیب گزارش کردند (۷ و ۲۰). همچنین نتایج نشان داد جدایه FUM120 بیشترین فعالیت کراتینولیتیکی خود را در pH قلیایی (۱۰/۵) نشان می دهد که مشابه نتایج دیگران بود. در مطالعه Saibabu و همکارانش، pH بهینه ۱۰ برای تولید آنزیم کراتیناز توسط *B. megaterium* گزارش گردید (۳۳). به همین‌ترتیب Kainoor و همکارانش نیز pH بهینه ۱۰ را برای تولید آنزیم کراتیناز توسط *Bacillus* sp. JB99 مطلوب گزارش کردند (۱۳). بیشتر مطالعات انجام شده روی باسیلوسها نشان می دهد که قادر به تولید پروتئازهایی قلیایی هستند که با توجه به پتانسیل استفاده از این آنزیمها به عنوان افزودنی در مواد شوینده و صنایع چرم یک ویژگی مطلوب محسوب می‌شود.

غلظت سوبسترا یک عامل تنظیم کننده بسیار مهم در رشد میکروب و تولید آنزیم است. در این پژوهش غلظت ۲ درصد پر باعث افزایش فعالیت کراتینولیتیک جدایه مورد بررسی شد و با افزایش میزان غلظت پر تولید آنزیم کاهش یافت که احتمالاً به‌دلیل افزایش ویسکوزیته محیط کشت و اختلال در میزان هوادهی آن است (۱۸). Ni و همکاران با بررسی اثر درصد سوبسترا در محیط کشت مایع بر تولید آنزیم کراتیناز، نشان دادند که باکتری *B. licheniformis* ZJUEL31410 در غلظت (w/v) ۲ درصد پر بیشترین فعالیت کراتینولیتیک را دارد که مشابه نتایج حاضر است (۲۵). Pandian و همکاران نیز غلظت (w/v) ۲ درصد پر را به عنوان میزان بهینه سوبسترا در تولید آنزیم کراتیناز *Bacillius sp* بیان کردند (۲۷).

مجموع نتایج در این پژوهش حاکی از آن بود که افزودن مواد قندی تأثیری بر تولید آنزیم ندارد و جدایه FUM120 قادر به استفاده از پر به عنوان تنها منبع کربن می باشد، ولی نیاز به منبع نیتروژن اضافی دارد به طوریکه فعالیت کراتینولیتیک آن در حضور غلظت ۰/۶ درصد آمونیوم کلرید به عنوان منبع نیتروژن اضافی افزایش یافت. هوادهی نیز پارامتر مهمی جهت افزایش تولید کراتیناز توسط جدایه معرفی گردید. اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید کراتیناز و فعالیت کراتینولیتیکی توسط سویه‌های مختلف متفاوت گزارش شده است و باکتریهای مختلف واکنش متفاوتی طی رشد و فعالیت کراتینولیتیکی در حضور نیتروژن آلی و معدنی از خود نشان می دهند. در مجموع چنین استنباط می‌شود که افزودن منبع نیتروژن به محیط کشت باعث افزایش میزان تولید آنزیمهای قلیایی می‌گردد (۲۶ و ۳۰).

در مطالعه Mini و همکاران روی بهینه‌سازی تولید آنزیم کراتیناز در *Aspergillus flavus* ، هیچ‌یک از منابع کربن مورد آزمایش اثر افزایشی در تولید آنزیم کراتیناز نشان ندادند (۲۳). همچنین بررسی اثر منابع مختلف کربن روی تولید آنزیم کراتیناز در سویه *Bacillus* sp MIR-99 نیز نشان داد که افزودن کربوهیدراتهای گلوکز،گلیسرول و ساکارز به محیط کشت باعث مهار ترشح آنزیم می‌گردد (۱۳). به طورکلی چنین بیان شده است که مواد قندی به ویژه گلوکز دارای اثر مهار کنندگی روی تولید آنزیمهای پروتئولیتیکی می‌باشد که این اثر مهارکنندگی می تواند ناشی از سرکوب کاتالیتیکی باشد (۳۷). معمولاً اثر منابع مختلف کربن و نیتروژن اضافی روی تولید آنزیم کراتیناز با توجه به سویه مولد، سوبسترا و غلظت منابع کربن و نیتروژن بسیار متفاوت می باشد. بنابراین بهینه‌سازی شرایط کشت برای حداکثر تولید آنزیم به صورت جزء به جزء ضروری است. Rajput و همکارانش گزارش کردند کراتیناز حاصل از *Bacillus pumilus* KS12 دارای پتانسیل بالقوه تخریب پر در دمای ۳۷ درجه است و حداکثر فعالیت کراتینولیتیکی آن در pH برابر ۱۰ گزارش شد که مشابه نتایج پژوهش حاضر است (۳۲). همچنین طالبی و همکارانش، ضمن جداسازی و شناسایی، فعالیت کراتیناز حاصل از سویه *Bacillus pumilus* ZED17 را با استفاده از شرایط مختلف و سوبستراهای متنوع ارزیابی کردند که دارای بهینه فعالیت در pH خنثی تا قلیایی بود و از آنجا که این سویه هالوتولرانت وتثبیت‌کننده نیتروژن بود کاندیدای

خوبی برای تولید کودهای نیتروژن‌دار خاک معرفی شد (۳۴).

نتیجه گیری

بهینه‌سازی تولید آنزیم کراتیناز در جدایه FUM120 منجر به افزایش قابل توجه ۲/۳۴ برابری تولید آنزیم گردید و عوامل دما، pH ، هوا دهی و منبع نیتروژن اضافی بیشترین تأثیر را در تولید آنزیم در جدایه FUM120 نشان دادند. این جدایه در دمای ۳۷ درجه و در محدوده pH بین ۱۰ تا ۱۱ دارای فعالیت بالایی بود و در pH برابر با ۱۰/۵ حداکثر فعالیت کراتینولیتیکی را نشان داد. داشتن فعالیت کراتینولیتیکی در یک محدوده نسبتاً مناسب pH قلیایی می تواند یکی از ویژگیهای قابل توجه آنزیم این جدایه باشد. نتایج بیانگر مزوفیل بودن این جدایه است که با توجه به مصرف انرژی کمتر سویه‌های مزوفیل در مقایسه با سویه‌های ترموفیل و با توجه به فعالیت در شرایط قلیایی می تواند در صنعت مورد استفاده قرار گیرد و در صنایع چرم و نساجی، تصفیه فاضلاب و مواد شوینده دارای قابلیت ویژه‌ای باشد. از سوی دیگر تولید آنزیم در حضور پر به عنوان تنها منبع کربن بدون نیاز به منابع کربن اضافی و همچنین مطلوب بودن منبع نیتروژن آمونیوم کلرید که در مقایسه با عصاره مخمر و پپتون سوبسترای ارزان قیمتی است، آن را از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه ساخته است. در مجموع نتایج نشان می دهد که آنزیم کراتیناز جدا شده از جدایه *Bacillus sp.* FUM120 با توجه به قدرت بالای کراتینولیتیکی می تواند از نظر اقتصادی ارزشمند باشد و مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تأمین کلیه امکانات این تحقیق (گرنت شماره۳/۴۰۹۴۲) تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

1- Abdel-Naby, M.A., Ibrahim, M.H.A., El-Refai, H.A. 2016. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of Bacillus pumilus FH9 keratinase conjugated with activated pectin. International journal of biological macromolecules, 85, 238-245.

2- Brandelli A., Sala L., Kalil S.J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. Food Research International. 73, 3-12.

3- Brandelli, A., Daroit, D.J., Riffel, A., 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Applied microbiology and biotechnology, 85(6), 1735-1750.

4- Chaturvedi, V., Bhange, K., Bhatt, R., Verma, P., 2014. Production of kertinases using chicken feathers as substrate by a novel multifunctional strain of Pseudomonas stutzeri and its dehairing application. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2), 167-174.

5- Da Gioppo, N.M.R., Moreira-Gasparin, F.G., Costa, A.M., Alexandrino, A.M., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M., 2009. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by Myrothecium verrucaria in submerged and solid state cultures. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 36(5), 705-711.

6- Desai, S.S., Hegde, S., Inamdar, P., Sake, N., Aravind, M.S., 2010. Isolation of keratinase from bacterial isolates of poultry soil for waste degradation. Engineering in Life Sciences, 10(4), 361-367.

7- El-Refai, H.A., AbdelNaby, M.A., Gaballa, A., El-Araby, M.H., Fattah, A.A., 2005. Improvement of the newly isolated Bacillus pumilus FH9 keratinolytic activity. Process Biochemistry, 40(7), 2325-2332.

8- Fakhfakh-Zouari, N., Haddar, A., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M., 2010. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by Bacillus pumilus A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. Process Biochemistry, 45(5), 617-626.

9- Gang, G., Jie, C., Jun-gao, W., Qiu-xia, H., Ke-chun, L., 2013. A two-step biotechnological process for improving nutrition value of feather meal by Bacillus licheniformis S6. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 20(3), 71-77.

10- Gupta R, Rajput R, Sharma R, Gupta N., 2013. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. Applied microbiology and biotechnology. 97(23), 9931-40.

11- Gupta, R., Ramnani, P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology, 70(1), 21.

12- Herzog, B., Overy, D. P., Haltli, B., Kerr, R.G., 2016. Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. Systematic and applied microbiology, 39(1), 49-57.

13- Kainoor, P.S., Naik, G.R. 2010. Production and characterization of feather degrading keratinase from Bacillus sp. JB 99. http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/10436.

14- Kersters, K., Vancanneyt, M., 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology. – http://hdl.handle.net/1854/LU-436918.

15- Khardenavis, A.A., Kapley, A., Purohit, H.J., 2009. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from Serratia sp. HPC 1383. Waste management, 29(4), 1409-1415.

16- Korniłowicz-Kowalska, T. 1999. Studies on the decomposition of keratin waste by saprotrophic microfungi. III. Activity and properties of keratinolytic enzymes. Acta Mycologica, 34(1), 65-78.

17- Korniłłowicz-Kowalska, T. 1997. Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. Acta Mycologica, 32(1), 51-79.

18- Langeveld, J.P., Wang, J.J., Van de Wiel, D.F., Shih, G.C., Garssen, G.J., Bossers, A., Shih, J.C., 2003. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. Journal of Infectious Diseases, 188(11), 1782-1789.

19- Lin, H.H., Yin, L.J., 2010. Feather meal and rice husk enhanced keratinases production by Bacillus licheniformis YJ4 and characters of produced keratinases. Journal Mar Sci Technol Taiwan, 18, 458-465.

20- Matikevičienė, V., Masiliūnienė, D., Grigiškis, S., 2015. Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity. In Environment. Technology. Resources. Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (Vol. 1: 284-289).

21- Mazotto, A.M., Couri, S., Damaso, M.C., Vermelho, A.B., 2013. Degradation of feather waste by Aspergillus niger keratinases: comparison of submerged and solid-state fermentation. International Biodeterioration & Biodegradation, 85, 189-195.

22- McKittrick, J., Chen, P.Y., Bodde, S.G., Yang, W., Novitskaya, E.E., Meyers, M.A., 2012. The structure, functions, and mechanical properties of keratin. The Journal of the Minerals, metals and materials Society, 64(4), 449-468.

23- Mini K.D., Paul, M., Mathew, J., 2015. Optimization of conditions for production of keratinase by Aspergillus flavus by submerged fermnetation. International Journal of Pharma and Bio Sciences. International Journal of Pharmacology Biology Science, 6(4), B377–B385.

24- Mousavi, S., Salouti, M., Shapoury, R., Heidari, Z., 2013. Optimization of keratinase production for feather degradation by Bacillus subtilis. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(8): e7160.

25- Ni, H., Chen, Q.H., Chen, F., Fu, M.L., Dong, Y.C., Cai, H.N., 2011. Improved keratinase production for feather degradation by Bacillus licheniformis ZJUEL31410 in submerged cultivation. African Journal of Biotechnology, 10(37), 7236-7244.

26- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource technology, 74(1), 69-80.

27- Pandian, S., Sundaram, J., Panchatcharam, P., 2012. Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. European Journal of Experimental Biology, 2(1), 274-282.

28- Paul, T., Halder, S.K., Das, A., Bera, S., Maity, C., Mandal, A. et al., 2013. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate Paenibacillus woosongensis TKB2. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2(1), 50-57.

29- Pillai, P., Archana, G., 2008. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel Bacillus subtilis isolate. Applied Microbiology and Biotechnology, 78(4), 643.

30- Prakasham, R. S., Rao, C.S., Sarma, P.N., 2006. Green gram husk an inexpensive substrate for alkaline protease production by Bacillus sp. in

solid-state fermentation. Bioresource Technology, 97(13), 1449-1454.

31- Purchase, D. 2016. Microbial keratinases: characteristics, biotechnological applications and potential. – http://www.cabi.org/bookshop/book/9781780645216.

32- Rajput, R., Sharma, R., Gupta, R., 2010. Biochemical characterization of a thiol-activated, oxidation stable keratinase from Bacillus pumilus KS12. Enzyme Research, 2010, 1-8.

33- Saibabu, V., Niyonzima, F.N., More, S.S., 2013. Isolation, partial purification and characterization of keratinase from Bacillus magaterium. International Research Journal of Biological Sciences, 22(2), 13-20.

34- Talebi, M., Emtiazi, G., Sepahy, A. A., Zaghian, S., 2013. Zymogram analysis of alkaline keratinase produced by nitrogen fixing Bacillus pumilus ZED17 exhibiting multiprotease enzyme activities. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(10), e7974.

35- Tatineni, R., Doddapaneni, K.K., Potumarthi, R.C., Vellanki, R.N., Kandathil, M. T., Kolli, N., Mangamoori, L.N., 2008. Purification and characterization of an alkaline keratinase from Streptomyces sp. Bioresource Technology, 99(6), 1596-1602.

36- Verma, A., Singh, H., Anwar, S., Chattopadhyay, A., Tiwari, K.K., Kaur, S., Dhilon, G.S., 2017. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. Critical reviews in biotechnology, 37(4), 476-491.

37- Vidyasagar, M., Prakash, S., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K., 2007. Optimization of culture conditions for the production of halothermophilic protease from halophilic bacterium Chromohalobacter sp. TVSP101. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(5), 655-662.

38- Xia, Y., Massé, D.I., McAllister, T.A., Beaulieu, C., Ungerfeld, E., 2012. Anaerobic digestion of chicken feather with swine manure or slaughterhouse sludge for biogas production. Waste management, 32(3), 404-409.

Optimization of keratinase production by a native isolate, Bacillus sp. FUM120, using one factor at a time methodology

Moridshahi R.,[1] Bahreini M.,[1] Sharifmoghadam M.R.,[1] Asoodeh A.[2] and Korouzhdehi B.[3]

[1] Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Nowadays, demand for Keratinase enzyme with the industrial application is increasing due to the extensive use of this enzyme in various fields including, animal feed, leather industry, water treatment, medicine, and pharmacy. In the present study, Keratinase production was examined and optimized in FUM120 Keratinolytic strain isolated from a poultry farm in Mashhad. Using of Azokeratin substrate, it was determined that the isolate produces the most in the 72th hours of its growth with the amount of 49.965 U/ml. Then, In order to increase the production of keratinase, the single-variable optimization of parameters, temperature, pH, substrate concentration, extra carbon and nitrogen sources, inoculum size and aeration rates were done and it was determined that pH:10.5 and 0.6% concentration of ammonium chloride, as an additional source of nitrogen, at 37 °C had a significant effect on keratinolytic activity and increased the enzyme production by more than 2 times. In addition, the isolate was able to produce the high level of enzyme in the presence of 50% aeration without addition of carbon source . Finally, enzyme production reached to 117/45 U/ml and the enzyme unit showed an increase of 2.34 fold compared to the beginning of the optimization. The morphological studies and the gene sequence of 16SrRNA determined that FUM120 belongs to the genus Bacillus and shows 100 % similarity to Bacillus pumilus ATCC 7061.

Key words: keratin, feather, azokeratin, Bacillus pumilus, keratinolytic activity