Investigation of Keratinas Producing Microorganism

Emtiazi, G., and Habibian. G.
Isfahan University, Isfahan, Iran

Abstract

Keratine is a protein in feather, hair and nail, hard to degrade. It is in poultry and Textile wastewater and can not be digested by pepsine and tripsine. Since it has cystein, during biodegradation of this compound H_2S is produced. In this research the microorganism with Keratinase activity were isolated in keratin agar.

Amoung the microorganism isolated, biodegradation of keratine by ***bacillus*** and ***cocubacille*** was studied. The isolated bacillus could produce protein from feather, more than the other microorganism which were studied in this research. The effects of temperature, pH on stability of this enzyme was investigated. The enzyme from ***bacillus*** which is termostable could reduce the COD of wastewater by 50%.

بررسی میکروارگانیسم‌ها و شرایط تولید کراتیناز به منظور کنترل آلودگی پساب حاوی پروتئین

گیتی امتیازی* گلک حبیبیان**

چکیده

کراتین پروتئینی است غنی از سیستئین که تجزیه آن مشکل است. این ماده در پر مرغ، مو، ناخن و پساب‌های مرغداری و دباغی وجود دارد. این پساب‌ها معمولاً مشکلات بسیاری در محیط زیست ایجاد می‌کنند. تجزیه بی‌هوازی این مواد منجر به تولید H_2S می‌شود که خود در خوردگی و از بین بردن میکروارگانیسم‌های مفید تصفیه کننده مؤثر است. بسیاری از قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه کراتین می‌باشند. در این تحقیق خاصیت کراتیناز دو باکتری باسیلوس (B) و کوکوباسیل (C) که در محیط کراتین آگار از خاک جدا گردید بررسی شده و مقدار تجزیه کراتین آنها با قارچ‌های پست (آسپرژیلوس ترئوس) و قارچ‌های آلی (فانئوروکت کریزوسپوریوم) مورد مطالعه قرار گرفت. در این میان باسیلوس جدا شده از کراتین آگار بیشترین مقدار پروتئین (۱۰۰$\mu g/ml$) را از کراتین (پرمرغ) تولید می‌کند در حالی که کوکوباسیل گرم مثبت بیشترین مقدار سولفات را از پر مرغ آزاد می‌کند. دو قارچ آسپرژیلوس ترئوس و فانئوروکت کریزوسپوریوم به خوبی قادر به تجزیه پر نمی‌باشند و میزان پروتئین آزاد شده ۳۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است. کوکوباسیل گرم مثبت کازئین را نیز به نسبت مناسبی تجزیه می‌کند. تأثیر حرارت و pH بر پایداری آنزیم‌های کراتیناز و پروتئاز این دو باکتری مورد مطالعه قرار گرفته است. آنزیم کراتیناز باسیلوس قادر است COD پساب را تا ۵۰٪ درصد کاهش دهد.

مقدمه

پَر از زایداتی است که به مقدار زیاد تولید می‌شود و معمولاً چون از کراتین تشکیل یافته، تجزیه آن به کندی انجام می‌گیرد. در ساختمان کراتین سیستئین با پیوندهای سولفیدی وجود دارد و به همین جهت تحت تأثیر آنزیم‌هایی مانند تریپسین، پپسین و پاپائین قرار نمی‌گیرد [۲]. میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند که از پر به عنوان منبع کربن، سولفور، انرژی و ازت استفاده می‌کنند. در آمریکا طرح‌هایی به صورت محرمانه برای استفاده پر در غذای مرغ وجود دارد [۲، ۹ و ۱۰]. از باکتری‌های تجزیه کننده پر برای تصفیه پساب‌هایی که دارای کراتین می‌باشد نیز استفاده می‌شود. در تحقیقی نشان داده شده است که باکتری تجزیه کننده سلولز پر را نیز تجزیه می‌کند [۴] و از تجزیه پر متان حاصل می‌گردد. تجزیه کراتین توسط آسپرژیلوس [۱۱]، استرپتومیست [۶] و باسیلوس [۲، ۵ و ۸] گزارش داده شده است. تجزیه پر توسط جوشاندن به طور نسبی نیز صورت می‌گیرد ولی این امر موجب از بین رفتن اسید آمینه‌های مهم پر می‌شود [۷، ۸ و ۱۲]. کراتیناز حاصل از میکروب‌های تجزیه کننده کراتین کاربرد بسیاری در صنعت دارد و ژن آن در باسیلوس لیکنی فورمیس شناسایی شده است [۴]. روش‌های مختلفی برای پایداری و تثبیت این آنزیم و استفاده آن در تصفیه پساب ارائه شده است [۱۴ و ۱۰]. آنزیم تثبیت شده قابل شستشو و استفاده مجدد می‌باشد. مواد مختلفی

* - دانشگاه اصفهان - گروه زیست شناسی
** - دانشگاه اصفهان - گروه زیست شناسی

مانند پلی آگریل آمید، سیلیکاژل، آلجینات و پلی وینل کلراید برای تثبیت آنزیم کراتیناز مورد استفاده قرارگرفته است [۳و۱۱]. در این تحقیق سعی در شناسایی میکروب‌های تجزیه‌کننده پر شده است و تولید آنزیم کراتیناز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده کراتین

دو قارچ آسپرژیلوس ترئوس و فانتوروکت کریزوسپوریوم از کلکسیون آزمایشگاه میکروبی دانشگاه اصفهان تهیه گردید. باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین در محیط کشت کراتین آگار که حاوی کراتین ۵g/L، عصاره مخمر ۱g/L، K_2HPO_4 ۲g/L، $MgCl_2$ ۰/۰۳g/L، $FeCl_3$ ۰/۰۰۴g/L، NaCl ۱g/L در pH=۷ از خاک اطراف مرغداری جداسازی گردید [۲].

اندازه‌گیری مقدار سولفات

برای اندازه‌گیری سولفات ۰/۵ میلی‌لیتر معرف شامل NaCl ۷۵g/L، اتانل ۱۰۰ میلی‌لیتر، HCl ۳۰میلی‌لیتر، گلیسرول ۵۰ میلی‌لیتر، آب مقطر ۳۰۰ میلی‌لیتر و کلروباریم ۰/۵g/L اضافه می‌شود. کدورت تولید شده سولفات باریم در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و با توجه به منحنی استاندارد مقدار سولفات آزاد شده در اثر تجزیه پر محاسبه گردید.

سنجش فعالیت کراتیناز

مقدار ۱ml محلول رویی کشت حاوی کراتین به ۰/۰۱گرم کراتین اضافه گردید، ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول را به ۵ میلی‌لیتر محلول کوماسی بلو اضافه کرده و میزان پروتئین حاصل از تجزیه کراتین در یک ساعت در طول موج ۵۹۵ محاسبه گردید [۱]. لازم به ذکر است که در این آزمایش دو شاهد وجود دارد، یکی شاهد بدون کراتین و دیگری شاهد بدون آنزیم. اختلاف این دو شاهد با نمونه‌ای که حاوی کراتین و آنزیم است میزان پروتئین آزاد شده را در اثر فعالیت کراتیناز نشان می‌دهد.

سنجش فعالیت پروتئاز

در این روش کازئین نامحلول به عنوان پروتئین مورد بررسی قرارگرفت و مایع رویی محیط کشت در مجاور این پروتئین قرارگرفت. مقدار پروتئین آزاد شده در مجاور ۱۰۰mL از فولین سیوکالتئو (۲۰٪) پس از توقف واکنش آنزیمی با ۲۰۰mL تری‌کلرواستات در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱].

تجزیه پر

میکروارگانیسم‌هایی که حاوی کراتیناز بوده به محیط پر به عنوان منبع کربن، انرژی و گوگرد انتقال داده شد. چون پر حاوی گوگرد و ازت و کربن می‌باشد، توسط این میکروارگانیسم‌ها تجزیه گشته و میزان پروتئین آزاد شده حاصل از تجزیه پر با معرف کوماسی بلو مورد بررسی قرارگرفت.

آنزیم‌های حاصل از این محیط به صورت خام از میکروارگانیسم جداگشت و به پر سالم اضافه گردید و کاهش وزن پر در حضور آنزیم مورد مطالعه قرارگرفت.

تأثیر pH، حرارت بر فعالیت کراتیناز

فعالیت کراتیناز در pH = ۶، ۷، ۸ و حرارت ۴۰، ۶۰، ۸۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرارگرفت.

تأثیر pH، حرارت بر فعالیت پروتئاز

فعالیت پروتئاز در pH = ۶، ۷، ۸ و حرارت ۴۰، ۶۰، ۸۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرارگرفت.

تأثیر pH در تولید کراتیناز

محیط مایع حاوی پر به عنوان منبع کربن، انرژی و ازت در pH = ۶، ۷، ۸ برای تولید ماکزیمم کراتیناز مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر کراتیناز در پساب

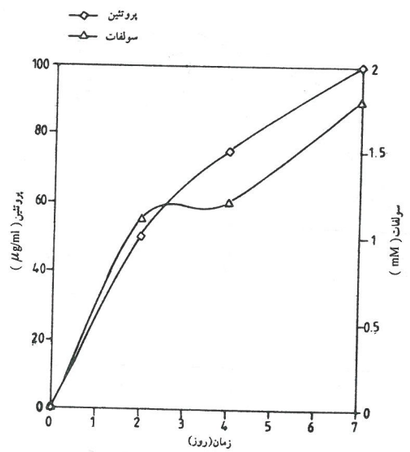
پساب به طور استریل به آزمایشگاه منتقل گردید و به یک نمونه آن مقدار ۱ درصد آنزیم از محلول رویی پر اضافه گشت

بعد از یک ساعت COD اولیه و COD بعد از افزودن آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

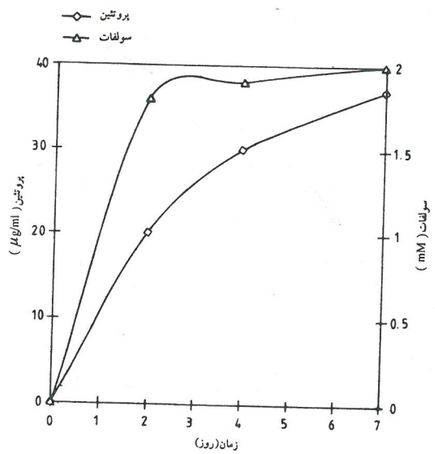
نتایج

میکروارگانیسم تجزیه‌کننده کراتین

در محیط کراتین آگار دو میکروارگانیسم تجزیه‌کننده جداسازی شد. یک میکروارگانیسم باسیلوس، کاتالاز + ۱گرم مثبت اسپوردار بوده و دیگری کوکوباسیل گرم مثبت کاتالاز مثبت بدون اسپور. هر دو قادر به تجزیه کراتین و پر می‌باشند.



شکل ۱- تولید پروتئین و سولفات در اثر تجزیه پر توسط باسیلوس (مدت آنکوباتورگذاری ۷ روزه در 35°C)

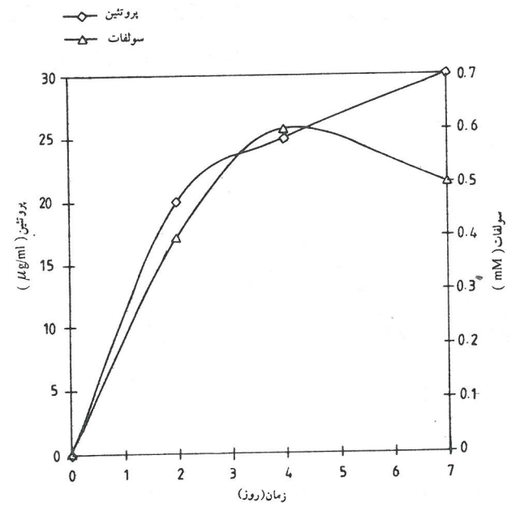


شکل ۲- تجزیه پر توسط کوکوباسیل گرم مثبت و تولید پروتئین و سولفات از آن

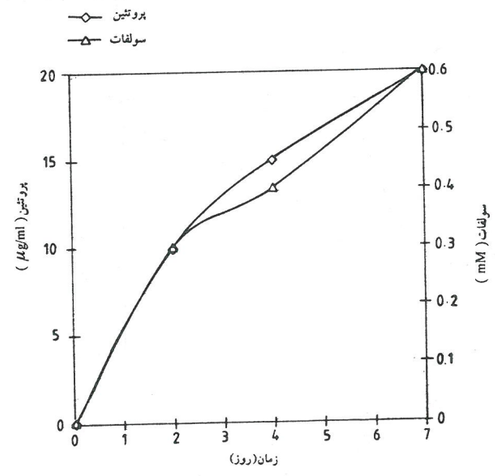
باسیلوس گرم مثبت میزان پروتئین آزاد شده در هر میلی‌لیتر ۱۰۰µg تولید می‌کند. این در حالی است که میزان سولفات آزاد شده ۱/۷۵mM می‌باشد (شکل ۱). چون این محیط فاقد هرگونه گوگرد به عنوان منبع گوگردی سلول بوده گوگرد مورد نیاز از پر تهیه شده و مقداری از آن نیز به محیط کشت وارد شده است. این میکروارگانیسم پر را تجزیه کرده و پروتئین آن را آزاد می‌کند. تجزیه پر توسط کوکوباسیل گرم مثبت در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

میزان پروتئین آزاد شده ۴۰μg/ml می‌باشد. میزان تجزیه پر توسط آسپرژیلوس ترئوس و فانئوروکت بسیار کم بود و میزان تولید پروتئین آن بسیار ناچیز بوده در حالی که رشد مناسبی در محیط حاوی پر دارد. شکل ۳ و ۴ میزان تولید سولفات و پروتئین را از پر توسط فانئوروکت کریزوسپوریوم و آسپرژیلوس ترئوس در طول ۱۲ روز هوادهی نشان می‌دهد.

آسپرژیلوس پروتئین بیشتری (۳۰μg/ml) نسبت به فانئوروکت (۲۰μg/ml) آزاد می‌کند ولی فعالیت هر دو قارچ نسبت به باکتری کمتر می‌باشد. آنزیم حاصل از باسیلوس در عرض یک هفته تمام پر به جز رگ اصلی را هضم می‌کند و ۶۰ درصد وزن پر را کاهش می‌دهد.

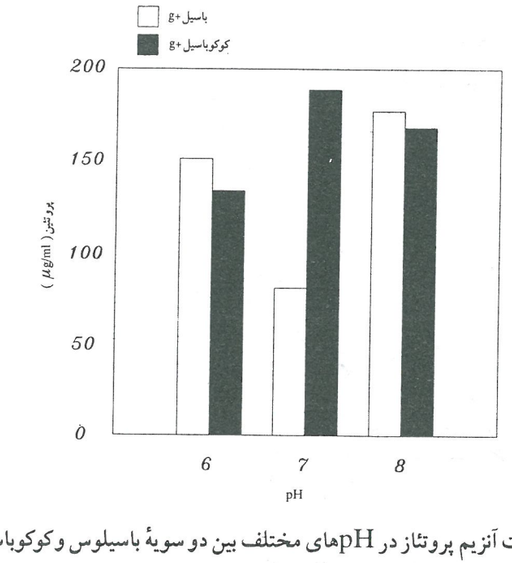


شکل ۳- تجزیه پر توسط آسپرژیلوس ترئوس



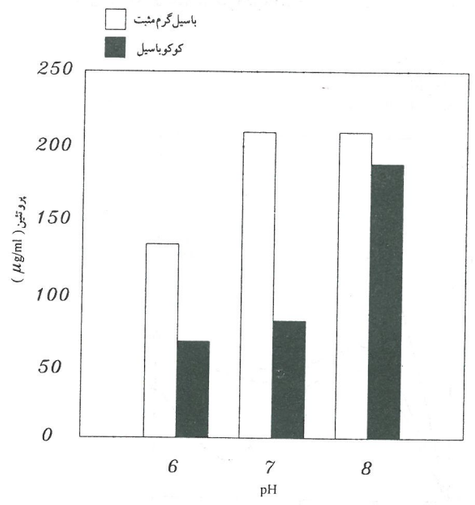
شکل ۴- تجزیه پر توسط فانئوروکت کریزوسپوریوم

از آنجایی که کوکوباسیلوس گرم مثبت و باسیلوس گرم مثبت تجزیه کراتین و پر را بهتر انجام می‌دهند، اثر تجزیه کازئین نامحلول به وسیله این دو میکروارگانیسم در pH = ۶، ۷، ۸ مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده است فعالیت پروتئاز و تولید پروتئین از کازئین در کوکوباسیل بیشتر از باسیلوس می‌باشد. بهترین pH برای باسیلوس ۸ و بهترین pH برای تولید پروتئاز کوکوباسیل pH=۷ می‌باشد. در این pH کوکوباسیل ۱۸۰ میکروگرم در لیتر و باسیلوس ۷۵ میکروگرم در لیتر پروتئین از کازئین آزاد می‌کند در حالی که باسیلوس گرم مثبت پروتئین بیشتری (۲۱۰μg/ml) از کراتین تولید می‌کند (شکل ۶).



شکل ۵- مقایسه فعالیت آنزیم پروتئاز در pHهای مختلف بین دو سویهٔ باسیلوس و کوکوباسیل گرم مثبت.

همان طور که ملاحظه می‌گردد در کوکوباسیلوس فعالیت پروتئازی بیشتری نسبت به باسیلوس جداشده دارد.

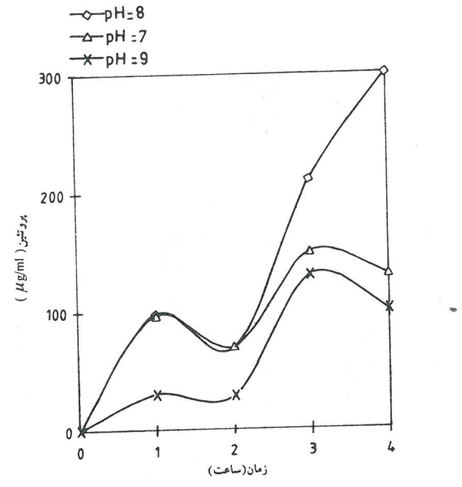


شکل ۶- مقایسه فعالیت آنزیم کراتیناز در pHهای مختلف بین دو سویهٔ باسیلوس و کوکوباسیل گرم مثبت.

همان طور که ملاحظه می‌گردد کوکوباسیل در pH قلیایی فعالیت بیشتری دارد ولی باسیلوس در pH=۷ فعالیت بیشتری دارد.

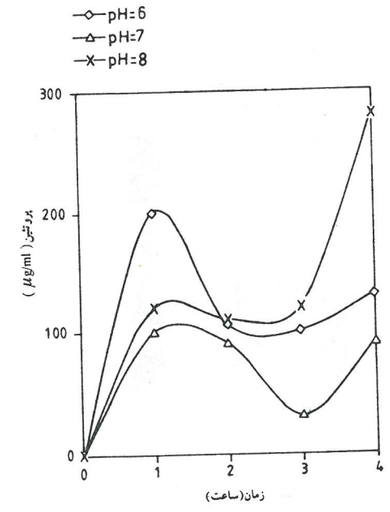
تأثیر pH در تولید پروتئین ازکازئین

اثر pH بر فعالیت پروتئازکوکوباسیل گرم مثبت در شکل ۷ نشان داده شده است. همان طورکه ملاحظه می‌شود کوکوباسیل در pH = ۷ فعالیت پروتئازی بیشتری دارد و پروتئین بیشتری آزاد می‌کند. در حالی که در pH اسیدی فعالیت کمتری دارد. اثر pH در فعالیت پروتئازی باسیلوس در شکل ۸ نشان داده شده است. همان طورکه ملاحظه می‌شود هیچکدام از پروتئازهای این دو باکتری به pH اسیدی مقاوم نمی‌باشند در حالی که پروتئاز باسیلوس در pH مساوی ۸ فعالیت بیشتری دارد.



شکل ۷- اثر pH بر فعالیت پروتئازکوکوباسیل گرم مثبت.

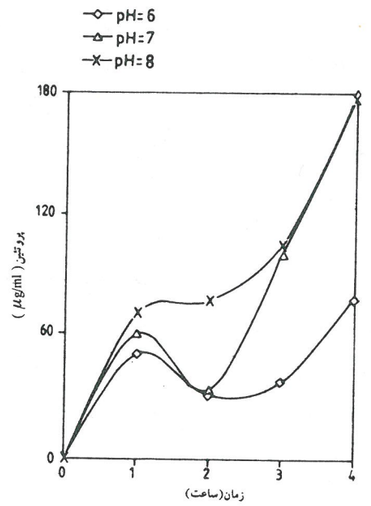
همان طورکه ملاحظه می‌شود در pH خنثی فعالیت این آنزیم در باکتری کوکوباسیل بیشتر است.



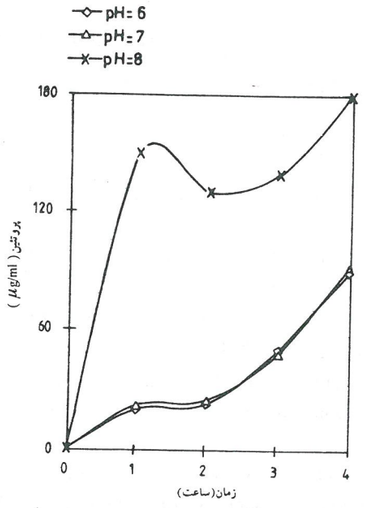
شکل ۸- اثر pH در فعالیت پروتئازی باسیلوس

تأثیر pH در تولید پروتئین ازکراتین

اثر pH در فعالیت کراتیناز باسیلوس و کوکوباسیل گرم مثبت در شکل‌های ۹ و ۱۰ نشان داده شده است. همان طورکه ملاحظه می‌گردد کوکوباسیلوس کراتیناز بالاتری در pH = ۸ دارد. در حالی که هیچکدام از باکتری‌ها در pH اسیدی پروتئاز و یاکراتیناز مناسبی ندارند. لازم به ذکر است که pH قلیایی ۸ برای تولید پروتئین بیشتر در محیط کشت حاوی پر نیز برای هر دو باکتری مناسب می‌باشد.



شکل ۹- اثر pH در فعالیت کراتیناز باسیلوس



شکل ۱۰- فعالیت آنزیم کراتیناز در کوکوباسیل.

فعالیت کراتیناز این باکتری در pH قلیایی بیشتر است.

تأثیر حرارت در فعالیت کراتیناز و پروتئاز

افزایش حرارت تا ۸۰°C فعالیت کراتیناز سویه B را افزایش می‌دهد ولی ماکزیمم فعالیت کراتیناز سویه C در ۶۰ درجه سانتی‌گراد است. در حالی که پروتئاز باسیلوس و کوکوباسیل به حرارت بالای ۴۰°C مقاوم نمی‌باشند. بنابراین پروتئاز تولیدی در این دو باکتری، حساس به افزایش حرارت می‌باشند ولی کراتیناز این دو باکتری در اثر افزایش حرارت پروتئین بیشتری تولید می‌کنند. با توجه به آن‌که در شاهد حرارت دیده نیز کراتین وجود دارد، حرارت باعث فعالیت بیشتر کراتیناز در هر دو باکتری می‌شود.

تأثیر کراتیناز باسیلوس در حذف COD

پساب آب پنیر که حاوی کازئین می‌باشد تحت تیمار آنزیم حاصل از باسیلوس قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر آنزیم به ۱۰۰mL پساب آب پنیر اضافه گشت COD پساب آب پنیر در حدود ۴۰/۰۰۰ و بعد از تیمار با آنزیم ۲۰/۰۰۰ کاهش یافت. این نمایانگر کاهش COD آب پنیر به میزان ۵۰٪ می‌باشد.

بحث

از میان قارچ‌ها و باکترهای مورد مطالعه باسیلوس بهترین سوش تولیدکننده کراتیناز از محیط حاوی پر و کوکوباسیلوس بهترین سویه تولیدکننده پروتئاز می‌باشد. بهترین pH تجزیه پر در pH = ۷ می‌باشد ولی آنزیم کراتیناز سویه باسیلوس در pH = ۸ نیز فعالیت دارد. pH اسیدی تأثیر منفی بر فعالیت هر دو آنزیم کراتیناز و پروتئاز دارد. بنابراین سویه B در پساب‌های حاوی کراتین قلیایی قابل استفاده می‌باشد و حدوداً ۵۰ درصد COD پساب آب پنیر را کاهش می‌دهد. باکتری‌های زیادی به عنوان تجزیه کراتین شناسایی شده‌اند [۱۳] ولی در این کار تحقیقاتی میزان پروتئین آزاد شده از کراتین بسیار بالا می‌باشد (۱۰۰μg/mL) و حتی آنزیم پر را در مدت یک هفته هضم نموده و فقط رگبرک اصلی پر باقی می‌ماند. به علاوه باسیلوس جدا شده فعالیت پروتئازی نیز دارد. آنزیم کراتیناز باسیلوس لیکنی فورمیس ۶۰°C فعالیت خود را از دست می‌دهد [۵] در حالی که آنزیم کراتیناز باسیلوس جدا شده حرارت دوست می‌باشد. با وجود آن‌که فعالیت کراتیناز در قارچ‌ها و استرپتومسیت‌ها و اکتینومسیت‌ها گزارش شده است [۶] ولی دو قارچ مورد مطالعه در این تحقیق به صورت مناسب قادر به تجزیه پر نمی‌باشند. با تثبیت این باکتری و یا آنزیم آن در کاهش بارآلی پساب دباغی، آب پنیرسازی و مرغداری می‌توان از آنها استفاده نمود [۳].

تشکر و تقدیر

بدینوسیله از زحمات خانم زهره خالصی، آقای محمد باقی و آقای شفیعی تشکر می‌شود.

منابع و مراجع

1- Frederick, M.A. (1992). " *Short Protocols in Molecular Biology* ", P.P 5-10 John Wiley & Sons, New York.

2- Lee, C.G., Ferket, P.R. and Shih, J. C.H. (1991). " *Improvement of Feather Digestability by Bacterial Keratinas as a Feed Additive* ", FASEBJ., 5 : A596.

3- Lin, X. Jason. C.H., and Swaisgood, E. (1996). " *Hydrolysis of Feather Keratin by Immobilized Keratinase* ", Appl. Environ. Microbiol., 62: 4273-7275.

4- Lin, Kelemen, X. D. W. Miller, E.S., and Shih, J. C. H. (1995). " *Nucleotide Sequence and Expression of KerA. The Gene Encoding a Kerationolytic Protease of Bacillus Licheniformis* ", PWD-1, Appl. Environ Microbiol, 61 : 1469-1474.

5- Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S. and Shih., C. J. (1992). " *Purification and Characterization of Keratinase from a Feather - Degrading Bacillus Licheniformis* ", Appl. Environ. Microbiol., 58: 3271-3275.

6- Noval, J., and Nickerson, W. J. (1959). " *Decomposition of Native Keratin by Streptomyces Fradiae* ", J. Bacteriol. 77:251-263.

7- Papadopoulous, M. C., Boushy, A.R. E and Roodbeen, A. E. (1985). " *The Effect of Varying Autoclaving Conditions and Added Sodium Hydroxide on Amino Acid Content and Nitrogen Characteristics of Feather Meal* ", J. Sci. Food Agric. Abstr., 36 : 1219-1229.

8- Papadopoulos, M. C., Boushy, A. R. Roodbeen, A. E. and Ketelaars, E. H. (1986). " *Effects of Processing Time and Moisture Content on Amino Acid Composition and Nitrogen Characteristics of Feather Meal* ", Anim. Feed Sci. Technol., 14 : 279-290.

9- Shih, J. C. H. and Williams, C. M. (1990). U.S. Patent 4, 959, 311.

10- Shih, J. C. H., and Williams, C. M. (1990). U.S. Patent 4, 908, 220.

11- Sen Gupta, S. R. Nigam, S. S. and Tandan, R. N. (1950). " *A New Wool Degrading Fungus - Ctenomyces Species* ", Text. Res. J., 20: 671-675.

12- Williams, C. M., and Shih, J. C. H. (1989). " *Enumeration of some Microbial Groups in Thermophilic Poultry Waste Digesters and Enrichment of a Feather - Degrading Culture* ", J. Appl. Bacteriol, 67:25-35.

13- Williams, C. M., Lee, C. G. Gartich, J. D. and Shih, J. C. H. (1990). " *Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium* ", Appl. Environ. Microbiol, 56: 1509-1515.

14- Williams, C. M., Lee, C. G. Gartich, J. D. and Shih, J. C. H. (1991). " *Evaluation of a Bacterial Feather Fermentation Product Feater - Lysate as a Feed Protein* ", Poult. Sci., 70: 85-94.

راهنمای تهیه مقالات

۱ـ مقالات ارسالی برای نشریهٔ آب و فاضلاب نباید در هیچ نشریه داخلی یا خارجی به چاپ رسیده باشد.

۲ـ مسئولیت صحت و سقم مطالب و نتایج آزمایشات با مؤلف یا مؤلفین می‌باشد.

۳ـ حداکثر تعداد صفحات مقاله، ۱۰ صفحه، ده هزار کلمه شامل شکلها، جدولها، مراجع و غیره باشد.

۴ـ ترتیب قرار گرفتن اجزای مقاله به شرح زیر است: عنوان مقاله ـ نام نویسنده یا نویسندگان، سمت و نام مؤسسه محل کار آنها ـ چکیده فارسی ـ چکیده انگلیسی ـ فهرست علایم و متن اصلی مقاله که شامل مقدمه، مواد و روشها، نتایج و بحث، نتیجه گیری، قدردانی ، ضمائم، مراجع، واژه‌نامه‌ها، جدولها و شکلها می‌باشد.

۵ـ شماره مراجع در متن مقاله در داخل کروشه [ ] به ترتیبی که در متن آمده شماره گذاری و مرتب شوند. در لیست مراجع ابتدا مراجع فارسی و سپس مراجع خارجی نوشته شوند. در صورت لزوم نام مؤلفان مراجع در متن مقاله به فارسی نوشته شود.

۶ـ تمام معادلات باید به وضوح تایپ شده و به صورت (۱)، (۲) ، (۳) و ... شماره گذاری شود.

۷ـ از بکار بردن لغات انگلیسی در متن مقاله احتراز شود.

۸ـ مقاله دریافتی به هیچ عنوان مسترد نمی‌گردد.

نسخه اصل مقاله را برای سردبیر نشریه به آدرس :

اصفهان ـ صندوق پستی ۱۸۴۳ بنام مهندسین مشاور طرح و تحقیقات آب و فاضلاب ارسال نمایید.

هیأت تحریریه نشریه آب و فاضلاب