ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٥٤٦ - ٥٣٥

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده کراتین

Isolation and recognition of keratinolytic bacteria strains based on their biochemical and molecular properties

بهناز کروژدهی[۱]، علیرضا عباسی*[۱]، معصومه بحرینی[۲]، احمدعلی پوربابایی[۱]، محمدرضا شریف مقدم[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲- استادیاران، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

Korouzhdehi B[1], Abbasi AR*[1], Bahreini M[2], Pourbabaee AA[1], Sharif Moghadam MR[2]
1- Phd Student, Associate professor, Associate professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Ferdowsi University of Mashad, Mashad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rezabbasi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٥/٤ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

مقادیر روزافزون ضایعات کراتینی مقاوم به تجزیه که از محصولات جانبی فرآوری صنایع کشاورزی می‌باشند، توجه را به سمت آنزیم‌های کراتینولیتیک سوق داده‌اند. کراتینازها قادرند پروتئین نامحلول کراتین را از طریق فرایندهای غیرآلاینده به محصولات باارزش تبدیل کنند. در این مطالعه با هدف دستیابی به جدایه‌های توانمند تجزیه‌کننده کراتین، تعداد ۱۲۰ سویه از منابع مختلف محیطی در محیط‌کشت اختصاصی پودرپر، جداسازی و خالص شد. پس از غربالگری، شش سویه که کارایی بالاتری داشتند برای ادامه مسیر انتخاب شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی 16SrRNA سویه‌های برتر متعلق به جنس باسیلوس بودند که در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیدند. این سویه‌ها پس از ٤٨ ساعت ٧٦ تا ٨٠/٨ درصد از سوبسترای پر را مورد حمله قرار دادند. فعالیت پروتئازی و کراتینازی آن‌ها در دماهای ۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۵۰°C مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی‌سویه‌ها بر روی محیط SMA در دماهای مورد آزمایش فعال بودند به‌جز BK111 که در دمای ۵۰°C فعالیت پروتئازی نشان نداد. سویه BK206 در کلیه دماها فعالیت کراتینازی مناسبی داشت در حالی‌که BK107 و BK324 در دمای ۵۰°C فعالیتی نداشتند. سویه BK111 در دماهای ۲۰ و ۵۰°C نتوانست بر روی محیط FMA رشد کند، سویه‌های BK401 و BK402 نیز در دمای ۲۰°C هاله‌ای بر روی این محیط تشکیل ندادند. فعالیت کراتینازی سویه‌های برتر با استفاده از دو سوبسترای کراتین‌آزور (α کراتین) و آزوکراتین (β کراتین) مورد ارزیابی قرار گرفت که تمامی‌سویه‌ها فعالیت قابل توجهی بر روی هر دو سوبسترا نشان دادند. بالاترین فعالیت بر روی سوبسترای کراتین‌آزور به سویه BK324 با ۳٤٥ u/ml تعلق داشت و سویه BK111 نیز ۵۹۹۲ u/ml فعالیت را بر روی سوبسترای آزوکراتین در روز دوم پس از تلقیح نشان داد. به‌طورکلی یافته‌های‌این مطالعه، پتانسیل بالای ٦ سویه طبیعی برای تبدیل زیستی ضایعات کراتین به‌صورت سازگار با محیط زیست و بازیافت آن‌ها به محصولات ارزشمند را آشکار می‌کند.

واژه‌های کلیدی

آزو کراتین
باسیلوس
تبدیل‌زیستی
کراتیناز
کراتین‌آزور

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

مقدمه

کراتین‌ها پروتئین‌های رشته‌ای بسیار تخصصی هستند که در سلول‌های اپی‌تلیال مهره‌داران عالی (خزندگان، پرندگان و پستانداران) و انسان تولید می‌شوند. کراتین‌ها به وفور در سلول‌های اپیتلیومی که در معرض نیروهای مکانیکی قابل‌توجه قرار دارند ازجمله اپیدرم‌های کراتینی مربوط به پوست شامل مو، پشم، ناخن، چنگال، سم، شاخ، فلس، منقار و پر وجود دارند. آن‌ها غیرقابل حل در آب، اسیدهای ضعیف، مواد قلیایی و حلال‌های آلی هستند و نسبت به آنزیم‌های پروتئولیتیک معمول مانند تریپسین و پپسین و پاپائین غیرحساس می‌باشند (Korniłłowicz-Kowalska and Bohacz 2011). تنوع گسترده‌ای در میان انواع کراتین‌ها وجود دارد که می‌توان آن‌ها را به دو گروه بزرگ α کراتین، که شامل کراتین موجود در مو، ناخن، سم و پشم است و β کراتین مانند کراتین پر طبقه‌بندی نمود (Gupta et al. 2013). ضایعات حاصل از واحدهای صنعتی مرغ، پردازش گوشت و صنایع چرم حاوی کراتین می‌باشند که به آرامی در طبیعت تخریب شده و به‌عنوان پسماندهای خطرناک درنظر گرفته می‌شوند (Radha and Gunasekaran 2008). دفع نامناسب این ضایعات باعث آلودگی محیط‌زیست، بیماری و از دست‌دادن منابع مفید بیولوژیکی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و چربی‌ها می‌شود (Lasekan et al. 2013). بدین منظور تخریب ساختار کراتین مقاوم، امری ضروری است (Radha and Gunasekaran 2008). با وجود ثبات قابل ملاحظه، کراتین می‌تواند در طبیعت به صورت کارآمد توسط برخی از میکروارگانیسم‌های ترشح‌کننده کراتیناز تخریب شود (Brandelli et al. 2010). کراتینازها گروهی از پروتئازها هستند که می‌توانند به کراتین حمله نموده و به‌طور کامل این پروتئین‌های بسیار پیچیده را تجزیه نمایند (Gupta et al. 2013).

سالانه چندین میلیون تن زباله پر توسط صنعت طیور تولید می‌گردد، برای بهره‌برداری از این محصول جانبی غنی از پروتئین، تحت دما و فشار بالا، پر به پودرپر (مکمل خوراک دام) تبدیل می‌شود، این فرایند علاوه بر گران بودن، منجر به تخریب برخی از اسیدهای آمینه ضروری شده و محصولی با قابلیت هضم ضعیف و کیفیت غذایی پایین حاصل می‌شود (Herzog et al. 2016). در مقابل، تخمیر توسط میکروارگانیسم‌های کراتینولیتیک به‌صورت چشم‌گیری سبب افزایش سطح اسیدهای آمینه ضروری مانند آرژنین، لیزین و متیونین می‌شود (Ferrareze et al. 2016). در میان منابع مختلف میکروبی، سویه‌های جنس باسیلوس به عنوان تولیدکننده‌گان مهم پروتئازها شناخته می‌شوند که تا حد زیادی در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sanghvi et al. 2016).

برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژیکی مختلفی شامل دفع ضایعات حاوی کراتین، تولید کود و افزایش ارزش غذایی پودرپر به‌عنوان خوراک دام و طیور، برای کراتینازها ارایه شده‌است. این آنزیم‌ها در صنایع مختلف حائز اهمیت‌اند، از جمله در مراحل مختلف صنعت چرم، در صنعت نساجی برای تمیز کردن پشم و ابریشم و تغییر الیاف، تولید اجزای سازنده برای فرمولاسیون محصولات مراقبت از پوست و مو انسان، به‌عنوان یک افزودنی به شوینده‌های لباس‌شویی و ظرف‌شویی، به‌کار می‌روند. برخی از کاربردهای بالقوه مانند تولید فیلم زیست‌تخریب‌پذیر، پپتیدهای زیست‌فعال و هم‌چنین هیدرولیز پریون و تصفیه فاضلاب نیز برای این آنزیم‌های چندکاره[1] درنظر گرفته شده‌است (Demir et al. 2015; Herzog et al. 2016).

آزمون‌های غربالگری میکروارگانیسم‌های کراتینولیتیک با هدف انتخاب سویه‌های فعال و شناسایی محصولات حاصل از تجزیه کراتین طبیعی انجام می‌پذیرند. این مسئله تنها اهمیت تئوری ندارد بلکه دارای پیامدهای کاربردی به‌صورت تأثیر بر توسعه روش‌های مدیریت ضایعات کراتین با استفاده از میکروارگانیسم‌ها است (Korniłłowicz-Kowalska and Bohacz 2011).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین با توانایی بالا در تبدیل ضایعات زیستی به‌ویژه پرمرغ به محصولات ارزشمند، می‌باشد (شکل ۳).

مواد و روش‌ها

جداسازی و غربالگری باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین پر با جمع‌آوری نمونه‌های خاک و فاضلاب مرغداری‌ها و

[1] Multi-functional

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

کشتارگاه‌های اطراف شهر مشهد انجام پذیرفت. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ٤°C نگهداری شدند. آزمایش‌های غربالگری اولیه با استفاده از محیط‌کشت اختصاصی پودر پر جامد[1] (FMA) انجام شد که شامل محیط‌حداقل[2] (NaCl 0.5 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ o.1 g/l, K_2HPO_4 0.3 g/l, KH_2PO_4 0.4 g/l)، پودرپر (۱۰ g/l) به‌همراه آگار (۱۵ g/l) بود (Bach et al. 2011). سریال رقت نمونه‌ها بر روی محیط اختصاصی پودر پر، کشت شد و پتری‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. پر به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن در محیط‌کشت، رشد میکروارگانیسم‌هایی که در تجزیه کراتین ناتوانند را محدود می‌کند. در این مرحله ترجیحاً سویه‌هایی که هاله بزرگ‌تری در اطراف خود ایجاد کرده بودند، انتخاب، جداسازی و خالص شدند (Okoroma et al. 2012). در مرحله دوم غربالگری از محیط‌کشت پودر پر مایع[3] (WFB) استفاده شد. دراین مرحله یک میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری‌ها در محیط NB[4] با غلظت برابر (O.D.600:0.1) به محیط اختصاصی، تلقیح و ارلن‌ها به مدت ٤٨ ساعت در شیکر ۳۷°C با ۱۵۰rpm قرار گرفتند. سپس درصد تخریب سوبسترا براساس میزان کاهش وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد.

بدین‌منظور محیط کشت از کاغذصافی واتمن شماره ۱ عبور داده و برای حذف بقایای باکتریایی با الکل ۷۰ درصد شسته و در آون ٦۰°C به مدت ٤٨ ساعت خشک شد (Liu et al. 2014).

جهت تخمین توان پروتئازی و کراتینازی سویه‌های برتر، قطر هاله هیدرولیز بر روی محیط‌های اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. قابلیت پروتئازی با استفاده از محیط SMA[5] و قابلیت کراتینازی بر روی محیط FMA بررسی شد. سویه‌ها پس از کشت شبانه در محیط NB با غلظت برابر (O.D.600:0.1) روی محیط‌های مذکور تلقیح شدند و پس از گرماگذاری در دماهای ۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۵۰°C، قطر هاله هیدرولیز اطراف کلنی‌ها اندازه‌گیری شد. بررسی پلیت‌های SMA پس از ٤٨ ساعت و FMA پس از ۷۲ ساعت انجام شد (Daroit et al. 2009).

به‌منظور شناسایی فنوتیپی سویه‌های برتر، آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رنگ‌آمیزی گرم، آمیلاز، ژلاتیناز، اوره‌آز، سیترات، احیا نیترات، لیتموس‌میلک، O/F[6]، MR-VP[7]، حرکت، تولید اندول و H_2S، رشد در غلظت‌های مختلف نمک، انجام شد (Holt et al. 1994).

[1] Feather meal agar
[2] Mineral medium
[3] Whole feather broth
[4] Nutrient broth
[5] Skim milk agar
[6] Oxidative fermentative
[7] Methyl red-voges proskauer



شکل ۳- گزارش تصویری مراحل جداسازی، شناسایی و غربال‌گری سویه‌های تولیدکننده کراتیناز

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

شناسایی مولکولی باکتری‌های تجزیه‌کننده کراتین پر، براساس توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA انجام پذیرفت. بدین‌منظور باکتری‌ها برروی محیط NA[1] کشت شدند و پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری، نسبت به استخراج DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از کیت NucleoSpin® Microbial DNA(MN, Germany) اقدام شد. در ادامه ژن‌های 16S rRNA سویه‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی27F و 1492R تکثیر شدند (Liu et al. 2014). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/٤ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، یک واحد آنزیم Pfu DNA Polymerase (Bio Basic, Canada) و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤°C به‌مدت چهار دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹٤°C به‌مدت ٤۰ ثانیه، ۵۵°C به‌مدت ٤۰ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۹۰ ثانیه و در پایان یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲°C به‌مدت۱۰ دقیقه بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد به‌مدت ٤۵ دقیقه تفکیک و سپس با استفاده از کیت تخلیص از ژل Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) استخراج و در pTG19 T-vector کلون شد. از سویه *Escherichia coli DH5α* به‌عنوان میزبان در این پژوهش استفاده شد. کلیه مراحل الکتروفورز DNA، هضم آنزیمی، اتصال و انتقال، مطابق روش سمبوروک انجام پذیرفت (Sambrook et al. 1989). توالی‌یابی دوطرفه قطعه درج‌شده در شرکت Seqlab آلمان انجام شد. در ادامه با استفاده از پایگاه اطلاعاتی EZtaxon، نزدیک‌ترین توالی‌های مشابه باکتری‌ها مشخص و جنس و گونه آن‌ها مورد شناسایی قرار گرفت.

به‌منظور تولید آنزیم کراتیناز از محیط‌کشت WFB استفاده شد که شامل محیط حداقل و پرکامل به‌عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن بود. ۵۰ میلی‌لیتر محیط WFB با یک میلی‌لیتر (۲ ٪V/V) سوسپانسیون باکتریایی (O.D.600:0.1) تلقیح و در دمای ۳۷°C درون شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۵۰ گرماگذاری شد. کشت باکتریایی هر ۲٤ ساعت برداشت و سوپرناتانت آن پس از سانتریفیوژ در g ×۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، به‌عنوان آنزیم خام برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت (Pereira et al. 2014).

سنجش فعالیت کراتیناز برای سویه‌های منتخب با استفاده از سوبستراهای کراتین‌آزور و آزوکراتین انجام شد. سوبسترای کراتین‌آزور از شرکت سیگما خریداری شد و طبق پروتکل ذیل به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

پنج میلی‌گرم کراتین‌آزور در تیوب توزین و ۹۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (pH:8) به آن اضافه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم خام افزوده و به مدت ٦۰ دقیقه در شیکر ۵۰°C با دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. واکنش با قرار دادن تیوب‌ها در یخ به‌مدت ۳۰ دقیقه متوقف شد و درنهایت جذب نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. یک واحد کراتیناز عبارتست از مقدار آنزیمی که سبب افزایش جذب به میزان ۰/۰۱ در طول موج nm/min ۵۹۵، تحت شرایط آزمایش شود (Daroit et al. 2010).

سوبسترای آزوکراتین نیز با استفاده از پودر پر بر سنتز شد. بدین منظور پنج میلی‌گرم پودر پر به ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی همگن شد، در ادامه ۸ میلی‌لیتر ۱۰ درصد $NaHCO_3$ به آن اضافه شد. هم‌زمان در یک بشر جداگانه ۳۵۰ میلی‌گرم سولفانیلیک‌اسید و ۱۵۰ میلی‌گرم $NaNO_2$ به‌ترتیب به ۱۵ میلی‌لیتر سود ۰/۲ مولار افزوده و پس از حل‌شدن کامل با ۱/۵ میلی‌لیتر HCl پنج مولار اسیدی شد. پس از دو دقیقه، محلول با افزودن ۰/۸ میلی‌لیتر NaOH ۵ مولار، خنثی شد. رنگ حاصله به محلول‌پر افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط شد. در انتها پرهای آغشته به رنگ به مدت ۲٤ ساعت در مجاورت آب دیونیزه دیالیز شدند تا رنگ اضافی خارج شود. آزوکراتین سنتزشده با استفاده از دستگاه لیوفلیزاتور خشک و در دمای ٤°C نگهداری شد (Herzog et al. 2016).

سنجش فعالیت با سوبسترای آزوکراتین نیز به روشی مشابه کراتین‌آزور انجام شد، با این تفاوت که ۱۰ میلی‌گرم سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت، نمونه‌ها در دمای ۳۷°C شیک شدند و جذب در ٤۲۰ نانومتر خوانش شد (Martínez et al. 2013).

[1] Nutrient agar

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

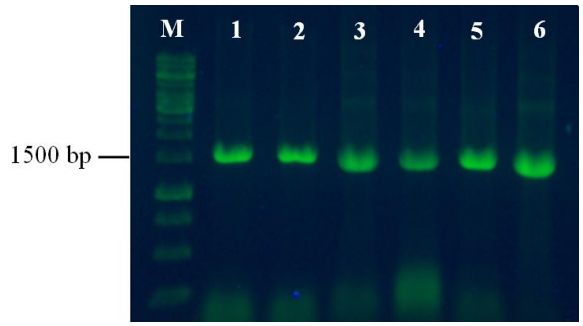
نتایج و بحث

در این پژوهش مجموعا ۱۲۰ سویه باکتریایی با مورفولوژی متفاوت و دارای قابلیت رشد بر روی محیط اختصاصی پر، جداسازی و خالص شد که بسیاری از آن‌ها گرم مثبت بودند. باکتری‌های گرم مثبت به‌علت اهمیتی که در جوامع میکروبی خاک دارند و هم‌چنین به‌دلیل تولید پروتئازهای زیاد، بسیار حائز اهمیت هستند (Bach et al. 2011).

عواملی مانند کاهش وزن سوبسترای کراتین، آزادسازی پروتئین‌های محلول، قلیایی‌شدن محیط و فعالیت کراتینازی به‌عنوان شاخص‌های مفید جهت تخمین قابلیت کراتینولیتیکی میکروبی محسوب می‌شوند (Bach et al. 2015). با توجه به اینکه همیشه یک رابطه مثبت قوی بین فعالیت کراتینازی و درصد کاهش وزن سوبسترا وجود دارد که با ضریب همبستگی بالا (>۰/۹۰) مشخص می‌شود (Queiroga et al. 2012)، در این مطالعه در مرحله نخست، جهت غربال سویه‌ها بر اساس قابلیت کراتینازی از شاخص کاهش وزن سوبسترا استفاده شد که منتج به شناسایی ٦ سویه با قدرت کراتینازی بالا شد (جدول۱). سویه‌های برتر پس از ٤٨ ساعت تجزیه بسیار مطلوبی داشتند، این درحالی است که Lucas et al. (2003) نشان دادند که تخریب کامل پر در بین باکتری‌های کراتینولیتیک نشأت گرفته از خاک متغیر است و برای بسیاری از سویه‌ها درصد پر باقی‌مانده پس از ۳ هفته بیش از ۸۰٪ است. در مقابل، سویه‌های *Bacillus sp.*HTS85 و *Bacillus sp.*HTS126 تجزیه مطلوبی در محیط پر کامل و پر پودرشده داشتند و پس از ۹٦ ساعت گرماگذاری، تنها حدود ۳۰ درصد از سوبسترای پر اولیه در محیط تخمیر به‌جا ماند (Queiroga et al. 2012). سویه‌هایی مانند *Bacillus sp.*FK46 و *B.pumilus* F3-4 نیز توانستند حدود ۸۵ و ۷۵ درصد پر را پس از ۵ و ۷ روز تجزیه کنند (Suntornsuk and Suntornsuk 2003; Son et al. 2008). برخی از سویه‌ها فعال‌تر بوده و قادرند بخش اعظمی از پر را در ٤٨ ساعت تخریب نمایند (Brandelli 2008) در حالی‌که باکتری‌های جدا شده توسط Bach et al. (2011)، کارایی مؤثری نداشته و پس از ۱۱ روز تخریب مطلوبی را نشان ندادند. در ادامه، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های برتر طبق کتاب باکتری‌شناسی "Bergey" بررسی شد (Holt 1994). نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۲، آورده شده‌است. جهت شناسایی مولکولی سویه‌ها، ناحیه 16S rRNA باکتری‌ها با استفاده از پرایمرهای عمومی (جدول ۳)، توسط PCR تکثیر شد (شکل۱) و براساس نتایج توالی‌یابی، باکتری‌های مربوطه مورد شناسایی قرار گرفتند.

جدول ۱- درصد تخریب سوبسترای پر طی ٤٨ ساعت رشد سویه‌های برتر روی محیط مایع پر. نتایج میانگین دو تکرار مستقل می‌باشد.

سویه	BK402	BK401	BK324	BK206	BK111	BK107
درصدتخریب	٧٦	٧٨/٤	٨٠/٨	٧٩/٢	٧٨/٨	٧٦/٨



شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA سویه‌های برتر. M) نشانگر مولکولی kb۱، ۱) سویه BK107، ۲) سویه BK111، ۳) سویه BK206، ٤) سویه BK324، ٥) سویه BK401، ٦) سویه BK402.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

جدول ۲- خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های برتر

نام سویه / نام آزمون	BK107	BK111	BK206	BK324	BK401	BK402
محل جداسازی	خاک کشتارگاه	فاضلاب کشتارگاه	خاک مرغداری	فاضلاب کشتارگاه	خاک کشتارگاه	خاک کشتارگاه
رنگ‌آمیزی گرم	+	+	+	+	+	+
آمیلاز	+	-	+	+	+	+
ژلاتیناز	+	+	+	+	+	+
اوره‌آز	-	-	-	-	+	–
سیمون سیترات	+	+	+	+	-	-
احیانیترات	-	+	-	-	-	-
لیتموس‌میلک	Alk-P	AC-R	AC-R	AC-R	AC-R	AC-R
O/F	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	+	+
VP	-	+	+	+	-	-
حرکت	-	+	-	+	+	+
تولید H_2S	-	-	-	-	-	-
تولید اندول	-	-	-	-	+	+
NaCl 3%	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	+	+

جدول ۳- آغازگرهای عمومی‌مورد استفاده جهت شناسایی سویه‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر
27F	(5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, M = C: A)
1492R	(5′TACGGYTACCTTGTTACGACTT, Y= C: T)

توالی 16S rRNA سویه‌های برتر، در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره‌های دسترسی که در جدول ٤ به آن‌ها اشاره شده، ثبت شد. سویه‌های جنس باسیلوس به‌عنوان باکتری‌های اصلی کراتینولیتیک شناخته می‌شوند که کاربردهای بیوتکنولوژیکی بسیار مهمی برای تبدیل زیستی ضایعات طیور دارند (Ferrareze et al. 2016). فراوانی جنس باسیلوس که ظرفیت کراتینازی بالایی نشان دادند، در این تحقیق نیز مشاهده شد. بسیاری از مطالعات پتانسیل کراتینولیتیکی برای سویه‌های جنس باسیلوس گزارش کرده‌اند، از جمله *B. cereus*، *B. licheniformis*، *B. pumilus*، *B. subtilis*، *B. halodurans*، *B. megaterium*، *B. pseudofirmus* Gegeckas et Pissuwan and Suntornsuk 2001.al. 2014، باکتری‌های کراتینازی را از خاک جدا نمودند و *B.sphaericus* را به‌عنوان بهترین تجزیه‌کننده پر گزارش کردند، سپس *B. cereus*، *B. licheniformis* و *B. subtilis* در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. مطالعه‌ای نیز بر روی خاک‌های جنگل‌های برزیل و آتلانتیک انجام گرفت و جدایه‌های پروتئولیتیک و کراتینولیتیک متعددی شناسایی شد که بسیاری از آن‌ها از جنس باسیلوس بودند (Bach et al. 2011). هیدرولیز محیط SMA جهت غربالگری کیفی جدایه‌های پروتئولیتیک استفاده می‌شود. قابلیت رشد بر روی محیط FMA نیز به‌عنوان شاخصی که نشان‌دهنده توانایی سویه‌ها در استفاده از کراتین‌پر است، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (Bach et al. 2011). از این رو توان پروتئازی و کراتینازی سویه‌های برتر بر روی محیط‌های مذکور در چهار دما و به مدت سه روز بررسی شد (جدول ۵).

نسبت قطر هاله‌هیدرولیز به قطر اندازه‌کلنی (CZ/CS)[1] برای سویه‌های منتخب در دماهای مختلف، بسیار متفاوت بود (شکل۲). تمامی سویه‌ها در دمای ۳۷°C فعالیت پروتئازی و کراتینازی مناسبی نشان دادند. در دماهای ۲۰ و ۳۰°C، سویه‌های BK401 و BK402 فعالیت پروتئازی کمی داشتند. این سویه‌ها در

[1] Clearance zone/ colony size

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

دمای ۲۰°C بر روی محیط پودر پر، کلنی تشکیل دادند ولی به‌دلیل فعالیت کراتینازی ضعیف قادر به تولید هاله نبودند و در دمای ۳۰°C نیز هاله هیدرولیز کوچکی ایجاد کردند. سویه BK111 در دمای ۳۰°C، هاله بزرگ‌تری نسبت به دمای ۲۰°C، بر روی محیط SMA تشکیل داد، درحالی‌که در دمای ۲۰°C قادر به استفاده از کراتین پر نبوده و بر روی محیط FMA رشدی نداشت ولی در دمای ۳۰°C، تک‌کلنی‌هایی با قابلیت کراتینازی ظاهر شد که هاله هیدرولیز ضعیفی ایجاد کردند. سویه‌های BK107، BK206، BK324 فعالیت پروتئازی مناسبی در دماهای ۲۰ و ۳۰°C داشتند و هاله متوسطی بر روی FMA تشکیل دادند. در دمای ۵۰°C، سویه‌های BK206، BK324 و BK401 فعالیت پروتئازی بالاتری نسبت به BK402 و BK107 نشان دادند، در حالی که BK111 در این دما فعالیت پروتئازی نداشت. برروی محیط FMA نیز سویه‌های BK206، BK401 و BK402 هاله هیدرولیز تشکیل دادند و بقیه سویه‌ها رشدی نداشتند. نکته قابل‌توجه، رشد سویه BK206 و تولید هاله هیدرولیز توسط این سویه در تمامی دماها بود.

در مطالعه‌ای مشابه، جهت غربال سویه‌های باکتریایی از کشت برروی محیط‌های SMA و FMA استفاده شد و سه سویه که هاله بزرگتری بر روی SMA تشکیل دادند برای ادامه مسیر انتخاب شدند (Pereira et al. 2014). Elhoul et al. (2016) نیز نسبت CZ/CS را بر روی SMA ملاک قرار دادند و براین اساس پنج جدایه که نسبت بالاتر از ٤ میلی‌متر داشتند را جهت ارزیابی قدرت کراتینازی انتخاب کردند. به‌منظور سنجش فعالیت کراتینازی، سویه‌های برتر برروی محیط مایع پر تلقیح شدند. باتوجه به اینکه برای گونه‌های جنس باسیلوس و دیگر باکتری‌ها متوسط زمان لازم جهت رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید کراتیناز برروی محیط پر معمولا در دامنه ٢٤ تا ١٦٨ ساعت می‌باشد (Ferrareze et al. 2016)، در این مطالعه نیز سنجش فعالیت آنزیم در ۷ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. دمای گرماگذاری براساس نتایج مرحله قبل، ۳۷°C درنظر گرفته شد.

یکی از معیارهای مهم کراتینازها اختصاصیت سوبسترای گسترده‌ای است که این آنزیم‌ها دارند. آن‌ها قادر به تجزیه طیف وسیعی از پروتئین‌های محلول و نامحلول می‌باشند، ازاین رو در مطالعات مختلف از سوبستراهای متنوعی جهت بررسی فعالیت کراتینازها استفاده می‌شود (Gupta et al. 2013).

جدول ٤- شناسایی مولکولی سویه‌های برتر بر اساس توالی 16S rRNA و شماره دسترسی آن‌ها در بانک اطلاعاتی NCBI

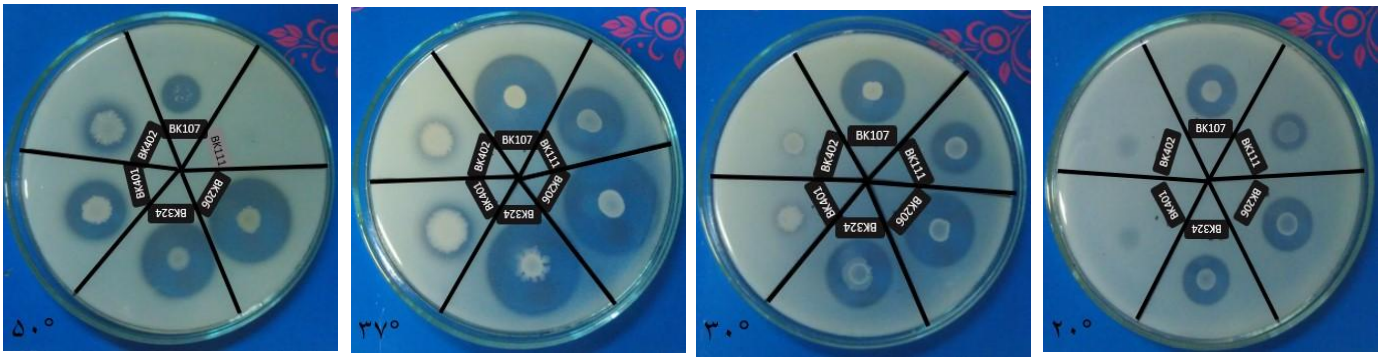
نام سویه	شناسایی سویه	درصد همولوژی	شماره دسترسی
Bacillus sp.BK107	*Bacillus mojavensis*	۹۹/۸٦	MF497523
Bacillus sp.BK111	*Bacillus zhangzhouensis*	۹۹/۷۱	MF540569
Bacillus sp.BK206	*Bacillus tequilensis*	۱۰۰	KY810609
Bacillus sp.BK324	*Bacillus tequilensis*	۹۹/۸٦	MF540572
Bacillus sp.BK401	*Bacillus paralicheniformis*	۹۹/۷۵	MF540573
Bacillus sp.BK402	*Bacillus licheniformis*	۹۹/۷۸	MF540574

جدول۵- فعالیت پروتئولیتیک و کراتینولیتیک سویه‌های برتر برروی محیط‌های SMA و FMA در دماهای مختلف

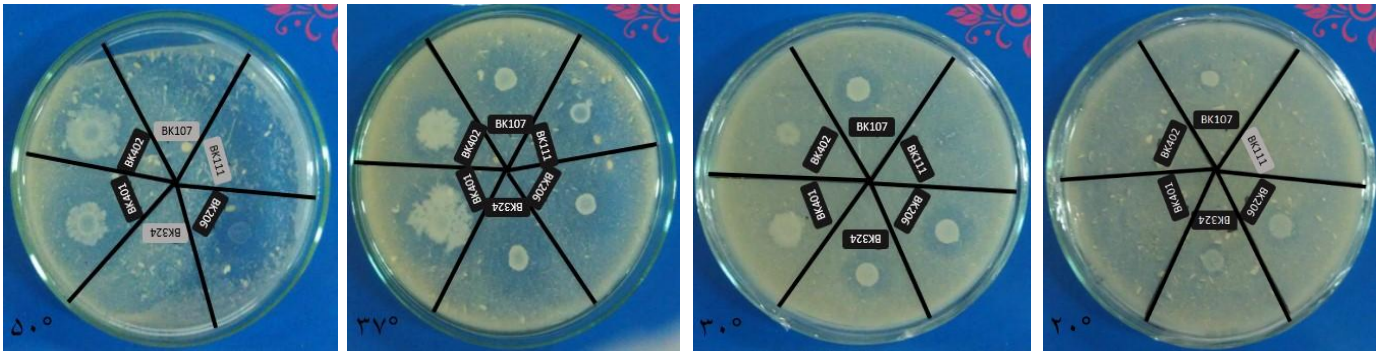
سویه	هیدرولیز محیط SMA				رشد روی محیط FMA			
	۲۰°C	۳۰°C	۳۷°C	۵۰°C	۲۰°C	۳۰°C	۳۷°C	۵۰°C
Bacillus sp.BK107	+	+	+	+	+	+	+	−
Bacillus sp.BK111	+	+	+	−	−	+	+	−
Bacillus sp.BK206	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus sp.BK324	+	+	+	+	+	+	+	−
Bacillus sp.BK401	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacillus sp.BK402	+	+	+	+	+	+	+	+

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

(الف)



(ب)

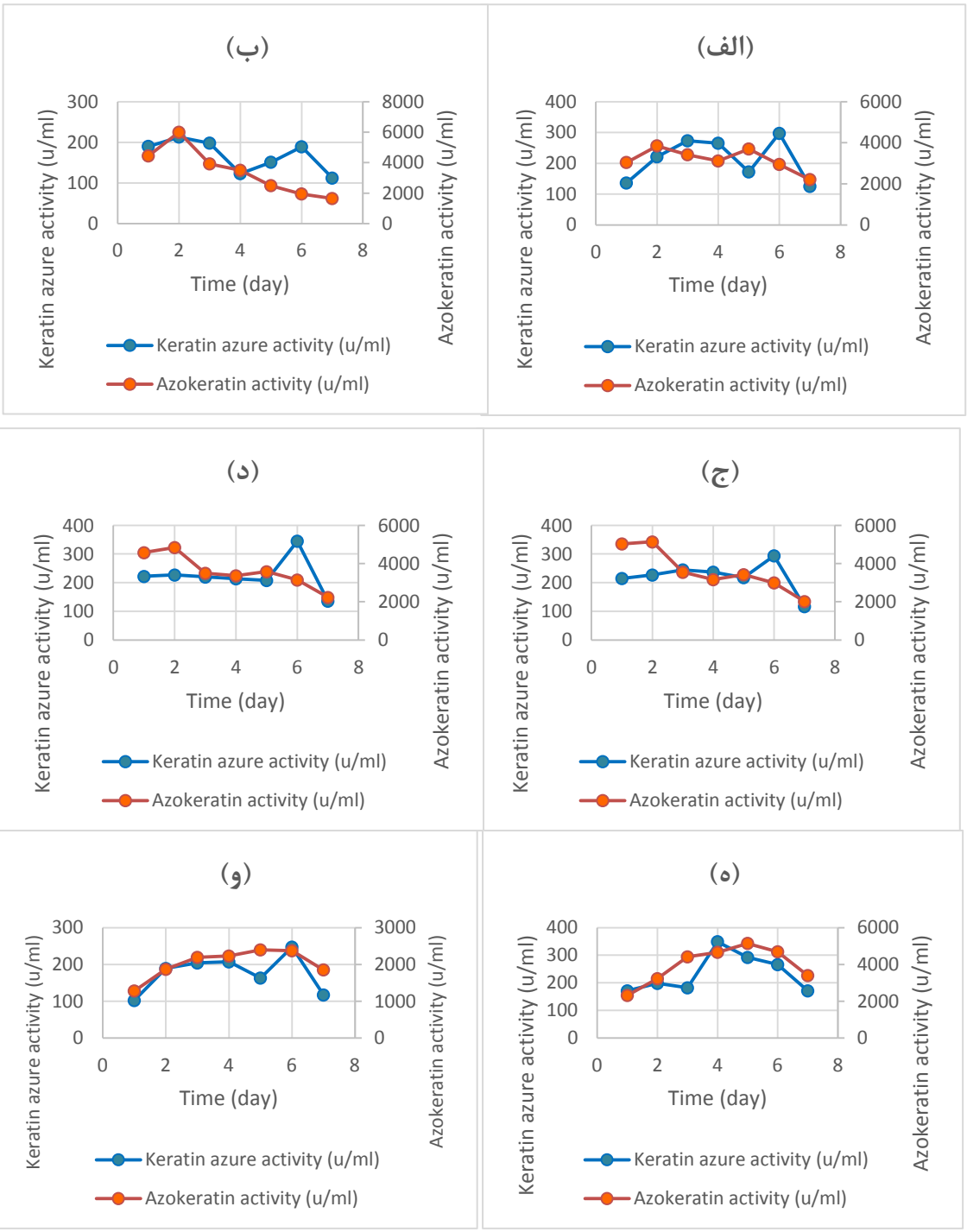


شکل ۲- پلیت‌های SMA در دماهای ۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۵۰°C، روز دوم کشت (الف). عدم تجزیه محیط SMA توسط سویه BK111 در دمای ۵۰°C و تشکیل هاله هیدرولیز توسط بقیه سویه‌ها در کلیه دماها. پلیت‌های FMA در دماهای ۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۵۰°C، روز سوم کشت (ب). عدم رشد سویه BK111 در دمای ۲۰°C و سویه‌های BK107، BK111 و BK324 در دمای ۵۰°C بر روی محیط FMA.

در این بررسی نیز از دو سوبسترای کراتین‌آزور (α کراتین) و آزوکراتین (β کراتین) به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تمامی‌سویه‌ها به‌جز BK401 و BK402 بیش‌ترین فعالیت بر روی سوبسترای آزوکراتین را در دومین روز پس از تلقیح نشان دادند و برای سویه‌های BK401 و BK402 بالاترین فعالیت در روز پنجم مشاهده شد. سویه BK107 پس از کاهش فعالیت در روزهای ۳ و ٤، مجدد در روز پنج فعالیت بالایی نشان داد که در روزهای بعدی کاهش یافت. فعالیت سویه BK111 نیز پس از روز دوم کاهش یافت. BK206 و BK324 الگوی فعالیت مشابهی داشتند و پس از کاهش در روزهای ۳ و ٤، افزایش اندکی در روز پنج نشان دادند. فعالیت سویه‌های BK401 و BK402 نیز از روز نخست سیر صعودی داشت و در روز پنج به حداکثر میزان خود رسید. بالاترین فعالیت مشاهده شده برروی سوبسترای آزوکراتین به سویه‌های BK111، BK401 و BK206 با u/ml ۵۹۹۲، u/ml ۵۱٤٤ و u/ml ۵۱۳٦ تعلق داشت.

سویه‌های BK107، BK206، BK324 و BK402 بیشینه فعالیت کراتینولیتیکی را بر روی سوبسترای کراتین‌آزور در ششمین روز پس از تلقیح نشان دادند. این اتفاق برای سویه‌های BK111 و BK401 به‌ترتیب در روزهای ۲ و ٤ روی داد. سویه‌های BK107 و BK402 الگوی تقریبا مشابهی بر روی کراتین‌آزور نشان دادند و بالاترین فعالیت را در روز ٦ با u/ml ۲۹۷ و u/ml ۲٤۷ داشتند. BK111 حداکثر فعالیت را در روز ۲ با u/ml ۲۱۳ نشان داد که پس از کاهش، مجددا در روز ٦ به u/ml ۱۸۹ رسید. سویه‌های BK206 و BK324 از روز اول تا پنجم، فعالیت بالا و مناسبی داشتند که در روز ٦ حداکثر فعالیت خود را با u/ml ۲۹٤ و u/ml ۳٤۵ به نمایش گذاشتند. فعالیت BK401 در روز ٤ افزایش ناگهانی نشان داد و به u/ml ۳٤۹ رسید که پس از آن کاهش تدریجی داشت.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]



نمودار ۱- فعالیت کراتینازی BK107 (الف)، BK111 (ب)، BK206 (ج)، BK324 (د)، BK401 (ه)، BK402 (و). سویه‌ها به مدت ۷ روز در محیط FMB در دمای ۳۷°C با pH اولیه ۷/۵ و ۱۵۰rpm گرماگذاری شدند. (—●—) فعالیت روی سوبسترای کراتین‌آزور، (—●—) فعالیت روی سوبسترای آزوکراتین.

تفاوت مشاهده شده در فعالیت سویه‌های منتخب و قدرت آن‌ها در تجزیه دو سوبسترای آزوکراتین و کراتین‌آزور، امری کاملا طبیعی است زیرا هیدرولیز β کراتین (پر) نسبت به α کراتین (ناخن، مو، پشم) راحت‌تر بوده و بیش‌تر روی می‌دهد. این روند به‌طور معمول برای کراتینازهای میکروبی مشاهده می‌شود که مرتبط است به تفاوت در ساختار و محتوای پل‌های دی‌سولفیدی در β کراتین‌ها (محتوای سیستئین کمتر) و α کراتین‌ها (محتوای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

سیستئین بیش‌تر) که معمولا باعث دسترسی بیش‌تر سوبسترای اول برای کراتینازها می‌شود (Daroit et al. 2010).

دراین راستا Pereira et al. (2014) سه سویه کراتینولیتیک را مورد مطالعه قرار دادند و فعالیت کراتینازی را با استفاده از سوبسترای آزوکراتین در ۷ روز ارزیابی نمودند. سویه *Lysobacter* sp.A03 فعالیت مطلوب را در روز پنج نشان داد. برای سویه *Arthrobacter* sp.A08 فعالیت کراتینازی در روز ۳ تلقیح به حداکثر خود رسید، از آن پس تا روز ٦ کاهش و در روز ۷ اندکی افزایش یافت. بیشینه فعالیت برای سویه *Chryseobacterium* sp.A17U در روز ٤ مشاهده شد که پس از کاهش در روز ۵، افزایش اندکی در روزهای ٦ و ۷ داشت. فعالیت آزوکراتینولیتیک کراتیناز تولید شده توسط سویه *Bacillus* sp.P45 نیز در روز ۲ تلقیح به حدود ٤۰۰u/ml رسید و پس از آن کاهش یافت (Daroit et al. 2009). برای سویه *Chryseobacterium* Kr6 در دما و pH بهینه، فعالیت در روز ۲ بیش‌ترین مقدار بود که پس از کاهش، مجدد در ساعت ۱۰۰ افزایش نشان داد (Riffel et al. 2003). جدایه‌های (*B. subtilis*) BF11 و (*B. cereus*) BF21 بر روی آزوکراتین u/ml ۱٤/۷–۱۲/۸ فعالیت داشتند که پس از جهش‌زایی و بهینه‌سازی افزایش ۵۰ برابری را نشان دادند و به u/ml ۵۲۰–۵۱۸ رسیدند (Jeevana et al. 2013). آنزیم خام سویه *Bacillus* sp.P7 نیز فعالیتی معادل u/ml ۱٤٤٦ را نشان داد (Corrêa et al. 2010). درحالی که برای جدایه (*Pseudomonas stutzeri*) K4 پس از ۷۲ ساعت، حداکثر فعالیت u/ml ٤۲ گزارش شد (Chaturvedi et al. 2014).

جهت سنجش فعالیت کراتینازی سویه *Bacilus* sp.MBRL 575 از سوبسترای کراتین‌آزور استفاده شد و فعالیتی معادل u/ml ۳۰۵±۱۲، مشاهده شد که در شرایط بهینه این فعالیت به u/ml ۵۳٦±۲٤ افزایش یافت (Kshetri and Ningthoujam 2016). برای سویه (*B. licheniformis*) N22 فعالیت ۰/۷۱±۱۱ گزارش شد که ۵۸ درصد بیش‌تر از فعالیت کراتیناز شناخته شده (ATCC 53757) *B.lichenieormis* PWD-1 است (Okoroma et al. 2012). سویه *Bacillus* sp.FK46 نیز برروی کراتین آزور حداکثر فعالیت u/ml ۰/۹ را نشان داد (Suntornsuk and Suntornsuk 2003). علاوه‌براین، بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که در حضور یک درصد پودرپر حداکثر مقدار کراتیناز u/ml ٦۰–۲۰ خواهد بود (Chaturvedi et al. 2014).

با توجه به گزارشات فوق می‌توان به‌راحتی به اهمیت و فعالیت بالای سویه‌های خالص شده در این تحقیق پی برد. این در شرایطی است که این سویه‌ها در حالت طبیعی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و بهینه‌سازی جهت افزایش تولید و فعالیت آن‌ها انجام نگرفته است.

نتیجه‌گیری کلی

صنعت طیور مقادیر قابل‌توجهی ضایعات کراتینی مقاوم در برابر تخریب، تولید می‌کند که باید با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی به‌درستی مدیریت شوند. پیشرفت تکنولوژی آنزیم نشان می‌دهد که بیوکاتالیز می‌تواند ابزار بیوتکنولوژیکی بسیار مفیدی برای مدیریت محصولات جانبی صنعت طیور باشد.

مطالعه حاضر قدمی روبه‌جلو در فرایند تولید آنزیم کراتیناز بومی است. در این پژوهش ٦ سویه باکتریایی تولیدکننده کراتیناز، جداسازی و شناسایی شد. این سویه‌های کارآمد به جنس باسیلوس تعلق داشتند که در تخریب پر بسیار امیدوارکننده ظاهر شدند. آن‌ها پس از ٤۸ ساعت گرماگذاری بخش اعظمی از سوبسترای پر را تجزیه نمودند. علاوه بر این بر روی هر دو سوبسترای α و β کراتین نیز مؤثر بودند.

این سویه‌ها و کراتیناز حاصل از آن‌ها می‌توانند گزینه‌های نویدبخشی برای کاربرد بیوتکنولوژیکی در زیست‌پالایی باشند. چنین فناوری‌های میکروبی/ آنزیمی یک رویکرد ارزشمند با دو مزیت ذاتی را به نمایش می‌گذارند که شامل بازیابی بقایای صنعتی-کشاورزی همراه با ارزشمندسازی این مواد خام ارزان قیمت است.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، انجام تحقیقاتی در آینده بر روی بهینه‌سازی تولید و فعالیت این آنزیم‌ها، تعیین مشخصه‌های مولکولی، شناسایی ژن‌های کدکننده آن‌ها و دستورزی‌های ژنتیکی به‌منظور دستیابی به عملکرد بیش‌تر، مورد نیاز خواهد بود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

منابع

Bach E, Cannavan FS, Duarte FR, Taffarel JA, Tsai SM, Brandelli A (2011) Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. International Biodeterioration and Biodegradation 65:102-107.

Bach E, Lopes FC, Brandelli A (2015) Biodegradation of α and β-keratins by Gram-negative bacteria. Brandelli International Biodeterioration and Biodegradation 104:136-141.

Brandelli A (2008) Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. Food and Bioprocess Technology 1:105-116.

Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A (2010) Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Applied Microbiology and Biotechnology 85:1735-1750.

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 3:167-174.

Corrêa APF, Daroit DJ, Brandelli A (2010) Characterization of a keratinase produced by Bacillus sp. P7 isolated from an Amazonian environment. International Biodeterioration and Biodegradation 64:1-6.

Daroit DJ, Corrêa APF, Brandelli A (2009) Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish Piaractus mesopotamicus. International Biodeterioration and Biodegradation 63:358-363.

Daroit DJ, Corrêa APF, Brandelli A (2011) Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. International Biodeterioration and Biodegradation 65:45-51.

Daroit DJ, Corrêa APF, Segalin J, Brandelli A (2010) Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. Biocatalysis and Biotransformation 28:370-379.

Demir T, Hameş EE, Öncel SS, Vardar-Sukan F (2015) An optimization approach to scale up keratinase production by Streptomyces sp. 2M21 by utilizing chicken feather. International Biodeterioration and Biodegradation 103:134-140.

Elhoul MB, et al. (2016) Biochemical and molecular characterization of new keratinoytic protease from Actinomadura viridilutea DZ50. International Journal of Biological Macromolecules 92:299-315.

Ferrareze PAG, Correa APF, Brandelli A (2016) Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 7:102-109.

Gegeckas A, Gudiukaitė R, Citavicius D (2014) Keratinolytic proteinase from *Bacillus thuringiensis* AD-12. International Journal of Biological Macromolecules 69:46-51.

Gupta R, Sharma R, Beg QK (2013) Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. Critical Reviews in Biotechnology 33:216-228.

Herzog B, Overy DP, Haltli B, Kerr RG (2016) Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. Systematic and Applied Microbiology 39:49-57.

Holt J, Krieg N Sneath PHA, Stanley JT, Williams ST. 1994. Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, New York.

Jeevana Lakshmi P, Kumari Chitturi CM, Lakshmi V (2013) Efficient degradation of feather by keratinase producing Bacillus sp. International Journal of Microbiology 2013.

Korniłłowicz-Kowalska T, Bohacz J (2011) Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. Waste Management 31:1689-1701.

Kshetri P, Ningthoujam DS (2016) Keratinolytic activities of alkaliphilic Bacillus sp. MBRL 575 from a novel habitat, limestone deposit site in Manipur, India. SpringerPlus 5:595.

Lange L, Huang Y, Busk PK (2016) Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. Applied Microbiology and Biotechnology 100:2083-2096.

Lasekan A, Abu Bakar F, Hashim D (2013) Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. Waste Management 33:552-565.

Liu Q, Zhang T, Song N, Li Q, Wang Z, Zhang X, Lu X, Fang J, Chen J (2014) Purification and characterization of four key enzymes from a feather-degrading *Bacillus subtilis* from the gut of tarantula Chilobrachys guangxiensis. International Biodeterioration and Biodegradation 96:26-32.

Lucas F, Broennimann O, Febbraro I, Heeb P (2003) High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. Microbial Ecology 45:282-290.

Martínez YN, Cavello I, Hours R, Cavalitto S, Castro GR (2013) Immobilized keratinase and enrofloxacin loaded on pectin PVA cryogel patches for antimicrobial treatment. Bioresource Technology 145:280-284.

Mazotto AM, Couri S, Damaso MC, Vermelho AB (2013) Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: comparison of submerged and solid-state fermentation. International Biodeterioration and Biodegradation 85:189-195.

Okoroma EA, Garelick H, Abiola OO, Purchase D (2012) Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. International Biodeterioration and Biodegradation 74:54-60.

Pereira JQ, Lopes FC, Petry MV, da Costa Medina LF, Brandelli A (2014) Isolation of three novel Antarctic psychrotolerant feather-degrading bacteria and partial purification of keratinolytic enzyme from *Lysobacter* sp. A03. International Biodeterioration and Biodegradation 88:1-7.

Pissuwan D, Suntornsuk W (2001) Production of keratinase by Bacillus sp. FK 28 isolated in Thailand. Kasetsart Journal (Natural Science) 35:171-178.

Queiroga AC, Pintado ME, Malcata FX (2012) Potential use of wool-associated Bacillus species for biodegradation

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]

Sanghvi G, Patel H, Vaishnav D, Oza T, Dave G, Kunjadia P, Sheth N (2016) A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. International Journal of Biological Macromolecules 87:256-262.

Son H-J, Park H-C, Kim H-S, Lee C-Y (2008) Nutritional regulation of keratinolytic activity in Bacillus pumilis. Biotechnology Letters 30:461.

Suntornsuk W, Suntornsuk L (2003) Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. Bioresource Technology 86:239-243.

Yusuf I, Ahmad SA, Phang LY, Syed MA, Shamaan NA, Khalil KA, Dahalan FA, Shukor MY (2016) Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-Alcaligenes sp. AQ05-001. Journal of Environmental Management 183:182-195.

of keratinous materials. International Biodeterioration and Biodegradation 70:60-65.

Radha S, Gunasekaran P (2008) Sustained expression of keratinase gene under PxylA and PamyL promoters in the recombinant Bacillus megaterium MS941. Bioresource Technology 99:5528-5537.F

Riffel A, Lucas F, Heeb P, Brandelli A (2003) Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Archives of Microbiology 179:258-265.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Laboratory. Cold Spring Harbor, NY VIII Appendix A pBIND Vector Sequence (continued) A pBIND Vector Sequence (continued) B pBIND Vector Restriction Sites Enzyme of Sites Location Dra I 4:4877.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.5.1]