Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Isolation and optimization of effective conditions on keratinase production by the probiotic *Bacillus licheniformis* isolated from the place of feather waste in chicken slaughterhouse

Parisa Vanki

PhD, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran. dr.prsvanaki@gmail.com

Fatemeh Zaboli

Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran **(Corresponding author).** m.zaboli13799@yahoo.com

Hami Kaboosi

Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran. h.kaboosi@iauamol.ac.ir

Abstract

Objective: Keratinase enzyme produced by different strains of bacteria, fungi, and algae is used to break down crude keratin, produce animal and poultry feed. Due to practicality and economy, the use of keratinase for feather decomposition is better than physical and chemical methods. The purpose of this study was to optimize the conditions according to the factors in keratinase production, which was carried out using the probiotic *Bacillus licheniformis*.

Materials and methods: This experimental-laboratory study was conducted in 2021 on chicken slaughterhouse waste. Heat and alcohol treatment and polymerase chain reaction (PCR) were used to isolate *Bacillus licheniformis* (*B. licheniformis*) strains. To optimally check keratinase activity, precipitated was done by the ammonium sulfate method. Comparison of the mean changes and standard deviation of keratinase rate before and after optimization was done with Tukey's one-way analysis of variance and post hoc test, data analysis was also done by SPSS-26 ($p<0.05$).

Findings: The keratinase activity of *B. licheniformis* strain PVKR15 was higher than other strains (85.57 ± 0.64 units/ml). The total keratinase activity after optimization was 800 units/ml and before optimization was 500 units/ml. pH, temperature, heating time, creatine

source, and creatine concentration to optimize conditions respectively; 11, 37 degrees Celsius, 72 hours, and azocreatine at a concentration of 10 g/l. There was a significant difference between the keratinase activity of *B. licheniformis* PVKR15 with pH, temperature, creatine source, creatine concentration, and incubation time ($p<0.05$).

Conclusion: *B. licheniformis* PVKR15 will have a useful and effective role in the growth of animals to break down keratin as a probiotic supplement for livestock and poultry feed.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Optimization, Keratinase, Animal and Poultry Feed, Iau Science

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

جداسازی و بهینه سازی شرایط موثر بر تولید کراتیناز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* پروبیوتیک جدا شده از محل ضایعات پر در کشتارگاه مرغ

پریسا ونکی

دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
dr.prsvanaki@gmail.com

فاطمه زابلی

استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
(نویسنده مسئول). m.zaboli13799@yahoo.com

حامی کابوسی

استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.
h.kaboosi@iauamol.ac.ir

چکیده

هدف: آنزیم کراتیناز تولید شده توسط سویه های مختلف باکتری، قارچ و جلبک جهت تجزیه کراتین خام، تولید خوراک دام و طیور استفاده می شود. به علت کاربردی و اقتصادی بودن، استفاده از کراتیناز جهت تجزیه پر، نسبت به روش های فیزیکی و شیمیایی، بهتر می باشد. هدف از این مطالعه، بهینه سازی شرایط با توجه به فاکتورهای موجود در تولید کراتیناز بود که با استفاده از *باسیلوس لیکنی فورمیس* پروبیوتیک اجرا گردید.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۱ روی ضایعات کشتارگاه مرغ، انجام شد. تیمار گرمایی و الکلی، و واکنش زنجیره پلیمراز جهت جداسازی جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* استفاده شد. جهت بررسی بهینه فعالیت کراتیناز، رسوب دادن با روش سولفات آمونیوم انجام شد. مقایسه تغییرات میانگین و انحراف معیار میزان کراتیناز قبل و بعد از بهینه سازی با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی، و همچنین تجزیه تحلیل داده ها با SPSS- ۲۶ انجام شد ($p<۰/۰۵$).

یافته ها: میزان فعالیت کراتینازی جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، از سایر جدایه بیشتر بود (۰/٦٤ ± ۸۵/۵۷ واحد بر میلی لیتر). فعالیت کراتینازی کل بعد از بهینه سازی، ۸۰۰ واحد بر میلی لیتر و از قبل از بهینه سازی ۵۰۰ واحد بر میلی لیتر بود. pH، دما، زمان گرماگذاری، منبع کراتین و غلظت کراتین جهت بهینه سازی شرایط به ترتیب؛ ۱۱، ۳۷ درجه سانتی گراد، ۷۲ ساعت و آزوکراتین در غلظت ۱۰ گرم بر لیتر بود. میان فعالیت کراتینازی *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 با pH، دما، منبع کراتین، غلظت کراتین و زمان گرمخانه گذاری، اختلاف معنی داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15، جهت تجزیه کراتین به عنوان مکمل پروبیوتیکی خوراک دام و طیور نقش مفید و موثری در رشد حیوانات خواهد داشت.

کلیدواژه ها: *باسیلوس لیکنی فورمیس*، بهینه سازی، کراتیناز، خوراک دام و طیور، علم Iau

۱. مقدمه

پروتئازهای قلیایی میکروبی گروهی از آنزیم های پروتئولیتیک هستند که قادرند پروتئین هایی مانند کراتین پر که به سختی قابل تجزیه هستند را با کار آمدی بیشتری نسبت به سایر پروتئازها مثل تریپسین، پپسین و پاپایین هیدرولیز کنند. کراتیناز یکی از آنزیم های پروتئازی می باشد که کراتین را به عنوان سوبسترا تجزیه می کند (۱، ۲). کراتیناز عمدتا پیوند های دی سولفیدی را مورد هدف قرار می دهد. اخیرا از کراتیناز به عنوان یک سرین پروتئاز نام برده می شود، زیرا ۹۷ درصد از توالی آن مشابه با پروتئاز قلیایی است، همچنین این آنزیم توسط مهار کننده های سرین پروتئازی مهار می شود. کراتیناز می تواند به صورت یک پروتئاز سرین در ترکیب با یک پروتئاز سیستئین و یک متالوپروتئاز یافت شود (۳). پروتئین های فیبری (الاستین و کلاژن) و پروتئین‌های غیر فیبری (کازئین، ژلاتین، آلبومین و سرم گاوی) از جمله سوبسترا‌های کراتیناز می باشند (۵-۳). این آنزیم توسط جلبک ها، قارچ هایی مانند جنس *استرپتومایسس* و باکتری های جنس اکتینومیست و *باسیلوس* تولید در pH قلیایی و درجه حرارت بالا تولید می شود. استفاده از کراتیناز حاصل از میکروارگانیسم‌ها در تولید آمینواسیدها و پپتیدها، جهت جبران کمبود پروتئین برای تهیه خوراک حیوانات، حائز اهمیت می باشد. تعدادی از جدایه های جنس *باسیلوس* قادر به تولید پروتئاز و تجزیه پر می باشند (۶، ۷). یکی از تحقیقات انجام شده در این زمینه نشان داد که جنس *باسیلوس* A5.3، بهترین خواص کراتینولیتیک را روی پرهای پوسیده نشان داد. این باکتری آنزیم های پروتئولیتیک قلیایی و کراتینازی (پروتئازها و کراتینازها) مقاوم در برابر حرارت تولید می کند (۸). در مطالعه دیگر گزارش شد که *باسیلوس لیکنی فورمیس*، پرکاربردترین تجزیه کننده کراتین در این جنس است (۹). یافته های یکی دیگر از تحقیقات نشان داد که با توجه به تشکیل اندوسپور، تحمل قلیایی و محدوده وسیع دمایی برای رشد، *باسیلوس لیکنی فورمیس* T5 گزینه خوبی برای فعالیت های بیوتکنولوژی و پروتئازی می باشد (۱۰). کراتین یک پروتئین فیبری، با اتصالات عرضی دی‌سولفیدی-هیدروژنی و باندهای هیدروفوبیک باشد. این پروتئین به دو گروه بزرگ آلفا-کراتین (مو، ناخن و پشم) و بتا-کراتین (پر) طبقه بندی می‌شود. کراتین نسبت به تجزیه توسط آنزیم های پروتئولیتیک معمول مانند تریپسین، پاپائین و پپسین بسیار مقاوم است، بنابراین جهت شکستن و تجزیه آن، روش های بیولوژیکی، شیمیایی و مکانیکی مورد نیاز است. در روش های مکانیکی، فشار و حرارت بالا

مورد نیاز است، بنابراین تخریب اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و متیونین امکان پذیر می باشد. روش های مکانیکی هزینه بسیار بالایی دارند و باعث کاهش کیفیت غذایی و گوارش آن می باشد. در روش های شیمیایی نیز سولفید سدیم برای موزدایی استفاده می‌شود که سمی است. روش های تخلیه و سوزاندن زمین نیز احتمالاً منجر به تخریب محیط زیست، تولید گازهای گلخانه ای بسیار سمی، آلودگی زیستی و خطرات احتمالی مسمومیت کارکنان می شود (۱۱-۹). هیدرولیز اسید/قلیا و پخت با فشار بخار، اسیدهای آمینه ضروری حساس به حرارت مانند لیزین، متیونین و تریپتوفان را از بین می‌برند و به غیر از مصرف مقدار زیادی انرژی، اسیدهای آمینه غیر مغذی تولید می‌کنند. لذا واکنش کاتالیز شده با آنزیم مقرون به صرفه، بسیار کارآمد و به راحتی انتخابی است که معمولاً به شرایط واکنش ملایم و انرژی کمتری نیاز دارد که در نتیجه ارزش غذایی پرها را بهبود می بخشد. از طرفی دیگر، مواد کراتینی کاربردهای گسترده ای در زمینه های مختلف دارند. با توجه به افزایش تولید مواد کراتینی از صنایع طیور، مواد کراتینی تصفیه نشده به دلیل مقاومت در برابر تخریب پروتئاز می توانند به آلاینده تبدیل شوند. مواد کراتینی سرشار از اسیدهای آمینه و پپتون‌ها هستند که آنها را به منبع ارزشمندی برای کود و خوراک دام تبدیل می کند. با توجه به ایمنی زیست‌محیطی و در نظر گرفتن عوامل اقتصادی، روش‌های جدید پردازش مواد کراتینی ضروری است. با توجه به مطالب ذکر شده، استفاده از روش های زیستی بر اساس کراتینازهای میکروبی در میزان، کارایی و امنیت زیستی بیشتر، و هزینه کمتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۱).

وجود مطالعات مختلف (۱۰-۸) در این زمینه نشان می دهد که کراتیناز یکی از پراستفاده ترین آنزیم ها در صنعت دام و طیور، و تغذیه آنها می باشد. افزایش تقاضا برای تولید این آنزیم در مقیاس های زیاد صنعتی باعث شده است تا بهینه سازی و روش های مختلف تولید این آنزیم با استفاده از تغییرات فاکتورهای مختلف موثر بر تولید این آنزیم در محیط، مورد توجه قرار گیرد. محققان سعی بر این دارند که این آنزیم را در مقیاس های بالا و با کارایی بهتری تولید کنند، از طرفی دیگر بکار بردن جدایه های باکتریایی که چند خصوصیت کاربردی مفید را در این زمینه بصورت همزمان داشته باشند، با ارزش می باشد. لذا در این پژوهش، بهینه سازی تولید کراتیناز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* مورد بررسی قرار گرفته است که علاوه بر خاصیت کراتینازی، دارای خواص پروبیوتیکی نیز بود و می تواند علاوه بر تجزیه پر و تامین منبع

پروتئین، به عنوان یک منبع پروبیوتیک نیز مورد استفاده قرار گیرد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. طراحی مطالعه

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی در سال ۱۴۰۱ (کد پایان نامه: ۲۳۹٦٤۸۹٥۰۱۰۳٥۳٥۰٤٥۹۷۱۱٦۲۲٦۸۹۰٤)، تحت نظر دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، شهر آمل، استان مازندران، انجام شد (۱۲).

۲-۲. نمونه برداری

برداشت نمونه از قسمت هایی از بستر محل ضایعات پر در کشتارگاه مرغ بهاران واقع در شهر قم، استان قم انجام شد. نمونه‌ها مطابق بر اساس استاندارد ملی شماره ٤۲۰۸ از طریق بطری های استریل انجام شد. طبق استاندارد مذکور، از مکان های مختلف بستر کشتارگاه، نمونه برداری انجام شد و نمونه ها طی ۲ ساعت به محل آزمایشگاه انتقال داده شدند. ابتدا به تعداد ۱۰ عدد ارلن ۳۲٦ گرم، یک لیتری و استریل با ترازوی دیجیتال وزن شدند. سپس توسط قاشقک فلزی استریل، زیر هود بیولوژی، از هر ۱۰ نمونه خاک بستر کشتارگاه مرغ، ۷۰ گرم به طور جداگانه برداشته و داخل ارلن ها ریخته شد. مجموع وزن نمونه و ارلن به ۳۹٦ گرم رسید (۱۲، ٦).

۲-۳. تهیه سوسپانسیون میکروبی از نمونه ها

نمونه ها در ارلن های جداگانه، با نسبت وزن به حجم ۱ به ۱۰ با سرم فیزیولوژی حاوی کلرید سدیم ۰/۹ درصد مخلوط و به خوبی ورتکس شدند. سپس ۳ دقیقه به سوسپانسیون ها فرصت داده شد تا ذرات خاک در آنها ته نشین شود. در مرحله بعد، ۲۵ میلی لیتر از مایع رویی سوسپانسیون را با سمپلر برداشته و در یک فالکون ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد. سپس با نسبت حجم به حجم ۱ به ۱، با ۲۵ میلی لیتر آب پپتونه به حجم ۵۰ میلی لیتر رسید. این محلول، به دو قسمت مساوی تقسیم گشت. یکی از آنها تحت تیمار گرمایی و دیگری تحت تیمار با الکل قرار گرفت (۱۳، ۱۲).

۲-۳-۱. تیمار گرمایی

از سوسپانسیون اولیه، با نسبت حجم به حجم ۱ به ۱۰، توسط سمپلر ۲ میلی لیتر با کدورت نیمه مک فارلند برداشت شد و با ۱۸ میلی لیتر آب پپتونه به حجم ۲۰ میلی لیتر رسید. درب

فالکون به خوبی بسته و به مدت یک ساعت در حمام آبی ٦٥ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس از سوسپانسیون تیمار شده ده عدد سری رقت (10^{-1}–10^{-10}) با آب پپتونه، تهیه گردید.

بعد از همگن کردن رقت ها با ورتکس، از هر رقت ۱۰۰ میلی لیتر برداشته و در سطح پلیت حاوی محیط کشت لوریا برتانی آگار (مرک، آلمان) کشت چمنی داده شد (از هر رقت دو تکرار) و محیط های تلقیح شده، به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. تک کلونی ها در سطح محیط کشت لوریا برتانی آگار ظاهر شدند و کاملا از لحاظ شکل ظاهری از جمله رنگ، قوام و اندازه کلون قابل تفکیک بودند. در این مرحله کلونی ها توسط لوپ استریل جداسازی و روی سطح پلیت جدید حاوی محیط کشت لوریا برتانی آگار به روش استریل خطی چهار منطقه ای کشت داده شدند. پس از مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، یک بار دیگر جهت اطمینان از آن کشت مجدد تهیه گردید (۱۲، ٦).

۲-۳-۲. تیمار الکلی

از سوسپانسیون اولیه، با نسبت حجم به حجم ۱ به ۱، توسط سمپلر ۱۰ میلی لیتر برداشته و با ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹٦ درصد به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شد، به نحوی که غلظت نهایی الکل به ۵۰ درصد رسید. نمونه مذکور، به مدت یک ساعت تحت تیمار با الکل قرار گرفت. از سوسپانسیون تیمار شده ده عدد سری رقت (10^{-1}–10^{-10}) با آب پپتونه، تهیه گردید. همگن کردن رقت ها با انجام ورتکس انجام شد. از هر رقت ۱۰۰ میلی لیتر برداشته و در سطح پلیت حاوی محیط کشت لوریا برتانی آگار کشت چمنی داده شد (از هر رقت دو تکرار). محیط های تلقیح شده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند. مانند روش قبلی، کلونی ها روی سطح پلیت جدید حاوی محیط کشت لوریا برتانی آگار به روش خطی چهار منطقه ای کشت داده شد. پس از مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، کشت مجدد نیز تهیه گردید (۱۲).

۲-٤. واکنش زنجیره پلیمراز

برای شناسایی جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* جداسازی شده، آزمایشات میکروب شناسی فنوتایپی مانند؛ تشکیل اسپور، آزمایش متیل رد–وژپروسکوئر، استفاده از سیترات، ایندول، حرکت، تخمیر گلوکز با تولید گاز و مانیتول، حسایت به پنی سیلین و رشد در شرایط هوازی

انجام شد (۱۳). همچنین جهت تایید کامل، ژن 16S rRNA باکتری ها به روش واکنش زنجیره پلیمراز تکثیر شد. پرایمر های یونیورسال رفت 27F: 5'- A G A G T T T G A T C A T G G C T C A G-3'، برگشت 1492R: 5'- T A C G G A T A C C T T G T T A C G A C T T -3' و مستر میکس واکنش زنجیره پلیمراز لیوفلیزه (خشک کردن مواد زیستی از طریق انجماد) به صورت آماده (تکاپو زیست، ایران) خریداری و در دمای ۲۰- ذخیره گردید. به وسیله سمپلر ۱۰ – ۰/۵ میکرولیتری، هر یک از پرایمر های رفت و برگشت رقیق شد. سپس ۰/۵میکرولیتر از هریک از پرایمرها (۱ میکرولیتر) به علاوه ۱ میکرولیتر نمونه DNA برداشته و به یک ویال افزوده شد. در نهایت با افزودن ۱۸ میکرولیتر آب مقطر تزریقی استریل و ۵ میکرولیتر مستر میکس، به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شدند. تکثیر ژن 16S rRNA هریک از جدایه ها با روش واکنش زنجیره پلیمراز مطابق جدول دمایی انجام شد (جدول ۱) (۱۵، ۱٤).

جدول ۱. مراحل واکنش زنجیره پلیمراز

تعداد چرخه	دما (سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	نام مرحله
۱	۹٤	۱۰	واسرشتگی اولیه
۳۵	۹٤	۱	واسرشتگی هر چرخه
۳۵	٥٤	۱	اتصال آغازگر
۳۵	۷۲	۱	طویل سازی
۱	۷۲	۱۰	طویل سازی نهایی

سپس ۱/۵ میکرولیتر بافر لود کننده رنگی (ترکیب رنگ جهت ردیابی حرکت DNA) با ٤ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره پلیمراز مخلوط و پیپتاژ شد. در مرحله بعد، کل حجم بدست آمده، در چاهک ژل موجود در تانک الکتروفورز به گونه ای آرام بارگذاری و باند ها زیر لامپ فرا بنفش مشاهده شد. برای انجام تعیین توالی محصول واکنش زنجیره پلیمراز، ژن 16SrRNA جدایه ها، میزان کافی از محصول واکنش زنجیره پلیمراز ۸ جدایه *باسیلوس لیکنیفرمیس*، ۵۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره پلیمراز با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز مربوط به ژن 16SrRNA به همراه ۱۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت، برای خوانش دوطرفه از توالی به شرکت فزاپژوه، ایران، ارسال گردید. سپس توالی های به دست آمده با کمک نرم افزار MEGA X مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ابتدا توالی های بدست آمده در خوانش رفت و برگشت همسان سازی و تجمیع شدند. سپس با استفاده از لینک مرتبط با درگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده (NCBI) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/، توالی ها با منابع ثبت شده در بانک ژنی و با کمک نرم افزار BLAST مقایسه و ثبت شدند (۸ توالی؛ Parisa Vanaki Keratinase (PVKR)) (۱۲).

۲-۵. روش استخراج کراتین از پر مرغ جهت ساخت محیط کشت غنی از کراتین

۲-۵-۱. چربی زدایی

پر مرغ تهیه شده، توسط قیچی به قطعات ۳ تا ۵ سانتی متری بریده شد. سپس سه مرتبه با آب لوله کشی و یک مرتبه با آب مقطر شسته شد، سپس یک شبانه روز در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت تا خشک شود. پر ها داخل یک بشر یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محلول کلروفرم و متانول با نسبت ۱ به ۱ ریخته و درون انکوباتور شیکر دار با دمای ۲۷ درجه با دور اختلاط ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت دو روز (٤٨ ساعت) قرار داده شد. پس از این مرحله، مواد شیمیایی بشر تخلیه و پر ها ۳ بار با اب مقطر شست وشو داده شدند. ۵۰۰ میلی لیتر محلول حاوی کلروفرم، استون و اتانول با نسبت ٤: ۱: ۳ در بشر حاوی پر ریخته و به مدت ۳ شبانه روز (۷۲ ساعت) در انکوباتور شیکردار (تکان دادن نمونه ها) (GFL3031، آلمان) با دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و دور اختلاط ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. به علت استفاده از مواد شیمیایی مشتعل دمای انکوباتور به ۲۷ درجه سانتی گراد کاهش داده و مواد شیمیایی درون بشر

هر ٢٤ ساعت یک بار تعویض شد. بعد از اتمام این مرحله، پر ها ۳ مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند و یک شبانه روز در دمای محیط آزمایشگاه روی یک دستمال آبگیر قرار گرفتند تا خشک شوند (١٢، ٦).

۲-۵-۲. حل کردن کراتین در حلال صنعتی

پرهای چربی زدایی شده داخل یک بشر یک لیتری ریخته و زیر هود شیمیایی، ۵۰۰ میلی لیتر حلال صنعتی دی متیل سولفو اکساید همراه با یک مگنت، به آن اضافه و درب بشر با کاغذ آلومنیومی مسدود شد. بشر و محتویات درون آن برای مدت ٤ ساعت روی استیرر با دور اختلاط ٦ دور بر دقیقه با دمای ۱۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بشر از زیر هود خارج و به محیط آزاد انتقال داده شد تا هم دمای محیط گردد. در این مرحله محتویات داخل بشر در فالکون های ۵۰ میلی لیتری ریخته و برای ۲۰ دقیقه با دور ٤٠٠٠ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب را دور ریخته و سوسپانسیون رویی در یک بشر ۲ لیتری ذخیره شد (١٦).

۲-۵-۳. استخراج کراتین

جهت جدا سازی پروتئین کراتین از حلال آن، بشر ۲ لیتری حاوی کراتین حل شده در دی متیل سولفواکساید (ماده اشتعال زا است) به اتاق سرد با دمای ٤ درجه سانتی گراد انتقال و همراه مگنت درون بشر (فضای داخل بشر همگن شود، جهت اینکه دما اعمال نشود، زیرا دی متیل سولفواکساید اشتعال زا بود) روی همزن مغناطیسی (قابل تنظیم در دماهای مختلف و مغناطیسی) با دور اختلاط ٦ دور بر دقیقه (بدون دما) قرار داده شد. سپس به وسیله دکانتور و پایه، یک لیتر استون با دمای ۷۰- درجه سانتی گراد طی دو ساعت به آن اضافه گردید. در این مرحله کراتین به صورت سوسپانسیون در آمد. برای جدا سازی کراتین از استون و دی متیل سولفو اکساید، در فالکون های سیگما ریخته و با دور ۱۳ هزار دور بر دقیقه سانتریفیوژ، و رسوبات چهار مرتبه به وسیله بافر فسفات ۰/۱ مولار شسته شدند. مراحل شست و شو شامل حل کردن رسوبات کراتین درون بافر فسفات ۰/۱ مولار و سانتریفیوژ مجدد آن با دور ٤٠٠٠ دور بر دقیقه بود. سپس کراتین استخراج شده با حجم های ۵ میلی لیتر در فالکون های ۵۰ میلی لیتری تقسیم و به مدت ٢٤ ساعت در دستگاه خشک کن انجمادی گذاشته شد تا به پودرخشک شده کراتین تبدیل گردد (١٢).

۲-٦. جداسازی باکتری های تجزیه کننده کراتین

همه کلونی های مقاوم به الکل و گرما که از سطح محیط لوریا برتانی آگار خالص سازی شده بودند، به صورت جداگانه روی سطح محیط کشت جامد کراتین غنی شده (کراتین ۱/۵٪، نمک طعام ۰/۰۵٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۰۳٪، پتاسیم دی هیدروژن فسفات۰/۰٤٪ و منیزیم کلراید ۰/۰۱٪) به صورت نقطه ای کشت داده شدند. محیط ها ۵ روز در انکوباتور دارای دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند (۱۷).

۲-۷. جدا سازی آنزیم کراتیناز

هر ۸ جدایه باکتری تولید کننده کراتیناز، به روش چهارمنطقه ای روی محیط جامد لوریا برتانی آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. جهت بررسی میزان فعالیت کراتیناز تولید شده از جدایه های کراتینازی، ابتدا کراتیناز از باکتری های کشت داده شده جدا شد. به این منظور، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت غنی از کراتین استریل تهیه و زیر هود بیولوژی در فالکون های ۵۰ میلی لیتری توزیع شد. در هر فالکون، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت غنی از کراتین استریل وجود داشت. سپس با استفاده از لوپ استریل شده روی شعله، یک کلونی از روی پلیت لوریا برتانی آگار برداشته و درون محیط مایع غنی از کراتین استریل کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرما گذاری در انکوباتور شیکردار با دور اختلاط ۱۸۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، فالکون ها خارج شدند. درب فالکون ها محکم شد و بار دیگر با دور ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در این مرحله رسوب سلول ها از محیط کشت رویی حاوی آنزیم به وسیله سمپلر جدا سازی و در فالکون استریل ریخته شدند. جهت ممانعت از اتولیز پروتئازهای تولید شده، فالکون ها در یخچال با دمای ٤ درجه سانتی گراد ذخیره شد (از هر کلونی سه بار تکرار کشت در محیط مایع غنی از کراتین استریل جهت اطمینان از آزمایش کشت داده شد) (۱۲، ٦).

۲-۸. بررسی فعالیت آنزیم کراتیناز

ابتدا زیر هود بیولوژی، ۱۰۰ میکرولیتر از لوریا برتانی براث (مرک، آلمان)، با سمپلر۱۰۰-۱۰ میکرولیتری برداشته و در ویال های ۲ میلی لیتری استریل ریخته شد. سپس به میزان ۸۰۰ میکرولیتر، محتوی ۲ گرم بر لیتر کراتین و ۱/۵ میلی لیتر بافر تریس (بهار تجهیز، ایران) با pH: ۸ به آن اضافه شد. درب ویال ها با پارافیلم محکم بسته و درون یک صفحه یونولیتی که حفره هایی در آن ایجاد شده بود، قرار گرفت. بطوری که درب ویال ها روی آب و بدنه ویال ها

حاوی باکتری های کراتینازی و سوبسترای کراتین داخل حمام آبی قرار گرفتند. ویال ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت این بازه زمانی (۱۵ دقیقه)، برای ممانعت کردن از ادامه فعالیت پروتئولیتیک کراتیناز، میزان ۱ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (بهار تجهیز، ایران) ۱۰ درصد به هر یک از ویال ها اضافه گردید. در ادامه جهت جدا سازی سوبسترا از سوسپانسیون آنزیم، ویال ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰ هزار g در میکروفیوژ، سانتریفیوژ شدند. پس از جدا سازی، میزان جذب محلول مایع رویی، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٤٠ نانومتر اندازه گیری شد. معیار یک واحد فعالیت آنزیمی برای این تست مقداری از آنزیم است که باعث تغییر (افزایش) جذب از نمونه کنترل (حاوی؛ کراتیناز، بافر تریس و تری کلرو استیک اسید که از ابتدا اضافه شد) به اندازه ۰/۰۱ در طول موج ٤٤٠ نانومتر و برای مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد است. با توجه به متفاوت بودن جدایه ها و متعاقبا متفاوت بودن میزان آنزیم های تولیدی آن ها، برای خواندن جذب در ٤٤٠ نانومتر، هر جدایه با بلانک مخصوص (محلول بلانک برای کالیبره کردن اسپکتروفتومتر) خود صفر گردید. فعالیت کراتینازی هر یک از جدایه ها پس از کشت ۷۲ ساعته در محیط کشت مایع غنی از کراتین با خواندن میزان کدورت ناشی از تولید کراتیناز آن ها در طول موج ٤٤٠ نانومتر، بررسی و با یکدیگر مقایسه شد (۱۲).

۲-۹. رسوب دادن کراتیناز (قبل و بعد از شرایط بهینه سازی) با روش سولفات آمونیوم

جهت رسوب کراتیناز (قبل و بعد از شرایط بهینه سازی) ابتدا ۷٦ گرم سولفات آمونیوم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به خوبی حل گردید. ۷۰ میلی لیتر از محلول فوق (با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) با استفاده از دکانتر (یک سانتریفیوژ برای بالا بردن اطمینان از جداسازی جامد از مایع – مایع، توسط نیروی گریز از مرکز مورد استفاده قرار میگیرد) مخصوص به صورت قطره قطره به ۳۰ میلی لیتر مایع رویی آنزیمی، با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد اضافه شد. سپس با دور ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به آرامی دور ریخته شد. رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر بافر تریس با ۸ -pH: ۷/۵ حل شد و نهایتا با استفاده از کیسه دیالیز (غشا دیالیز) (ترموفیشر، آلمان) (سایز پور؛ پورها یا سوراخ های که مانند صافی عمل میکنند. در این مطالعه کیسه دیالیز آزمایشگاهی کاتاف ١٤-١٢ کیلو دالتون با عرض ۲۳/۸ میلیمتر انتخاب شد، به علت اینکه فقط آنزیم از این سوراخ ها عبور کند و محتویات دیگر روی کیسه باقی

بماند). میکروفیوژ با ۱۰ هزار دور بر دقیقه انجام گردید و با استفاده از مخلوط حاصل از رسوب نهایی فعالیت آنزیمی به روش کدورت سنجی مجددا اندازه گیری شد و چگالی نوری یا طبق قرارداد همان فعالیت آنزیمی با واحد بر میلی لیتر محاسبه گردید. *باسیلوس لیکنیفورمیس* PTCC ۱۵۲۵ و *باسیلوس لیکنی فورمیس* PTCC ۱۵۹۵ به ترتیب به عنوان نمونه منفی (عدم تولید کراتیناز) و مثبت (تولید کننده کراتیناز) استفاده شدند (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی، ایران) (۱۸).

۲-۱۰. شرایط بهینه سازی

۲-۱۰-۱. بررسی تاثیر میزان pH روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

در این مرحله، به میزان ۲ میلی لیتر از جدایه کراتینازی در کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند برداشته و به فالکون های حاوی محیط کشت غنی از کراتین تنظیم شده در pH های ٦ تا ۱۳ تلقیح شد، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شدند. پس از گذشت ٢٤ ساعت مایع رویی آنزیمی جداسازی شده به محیط حاوی کراتین اضافه شد. پس از انجام گرماگذاری، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و در طول موج ٤٤٠ نانومتر کدورت محیط توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و pH بهینه جهت رسیدن به بیشترین فعالیت کراتیناز بررسی شد (۱۸، ۱۲).

۲-۱۰-۲. بررسی تاثیر میزان دمای انکوباتور روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

به میزان ۲ میلی لیتر از جدایه کراتینازی در کدورت استاندارد ۰/۵ مکفارلند برداشته و به فالکون های حاوی محیط کشت غنی از کراتین با pH بهینه حاصل از مرحله قبل (pH بهینه ۱۱) تنظیم تلقیح شد. فالکون ها در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ٤٠، ٤٥، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی گراد و با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شدند. پس از گذشت ٢٤ ساعت مایع رویی آنزیمی جداسازی و به محیط کشت کراتین اضافه گردید. گرماگذاری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انجام و کدورت محیط در طول موج ٤٤٠ نانومتر خوانده شد. به این ترتیب دمای بهینه جهت رسیدن به بیشترین فعالیت کراتیناز بدست آمد (۱۲).

۲-۱۰-۳. بررسی تاثیر نوع منبع کراتینی محیط کشت بر روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

پیش کشت ها در محیط مایع حاوی سوبسترای کراتین با pH: ۱۱ بهینه، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بهینه، غلظت ۱۰ گرم بر لیتر سوبسترای کراتین، منبع نیتروژنی پپتون، دور هوادهی

۲۵۰ دور بر دقیقه و میزان تلقیح ۲ میلی لیتر از جدایه کراتینازی پیش کشت شده با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، در محیط کشت های مایع حاوی انواع مختلف از منبع کراتینی از جمله کراتین و آزوکراتین و پر آسیاب شده با غلظت ۱۰ درصد تلقیح شدند. سپس با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار به مدت ۷۲ ساعت (زمان بهینه) گرما گذاری شد. مایع رویی آنزیمی جداسازی شده به محیط حاوی کراتین اضافه و پس از انکوبه کردن آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در طول موج ٤٤٠ نانومتر، کدورت محیط خوانده شد (٦).

۲-۱۰-٤. بررسی تاثیر میزان غلظت کراتین محیط کشت روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

پیش کشت جدایه مورد نظر در محیط کشت مایع حاوی سوبسترای بهینه آزوکراتین، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بهینه، ۱۱ :pH بهینه و اسیدیته بهینه بدست آمده از مراحل قبل تهیه گردید. سپس ۲ میلی لیتر از جدایه کراتینازی پیش کشت شده با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت های حاوی غلظت های مختلف از سوبسترای بهینه کراتین (۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲، ١٤ و ١٦ گرم بر لیتر) تلقیح شد. محیط کشت با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شد. مایع رویی آنزیمی جدا شده به محیط حاوی کراتین اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری در ۵۰ درجه سانتی گراد و خواندن کدورت در طول موج ٤٤٠ نانومتر، بهترین غلظت سوبسترای کراتینی جهت دستیابی به بیشترین میزان فعالیت آنزیمی مشخص گردید (۱۸، ۱۲).

۲-۱۰-۵. بررسی تاثیر نوع منبع نیتروژنی محیط کشت روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

پیش کشت جدایه مورد نظر در محیط کشت مایع بهینه شده با ۱۱ :pH، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۱۰ گرم بر لیتر از سوبسترای آزوکراتین (به عنوان شرایط بهینه بدست آمده از مراحل قبلی) تهیه شد. ۲ میلی لیتر از جدایه کراتینازی پیش کشت شده با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت های مایع حاوی انواع مختلف از منبع نیتروژنی از جمله تریپتون، پپتون، سویا، عصاره مخمر، کازیین، سولفات آمونیوم و نیترات آمونیوم با غلظت ۱٪ تلقیح و با دور ۱۸۰ دور بر دقیقه در انکوباتور شیکردار به مدت ٢٤ ساعت گرماگذاری شد. مایع رویی آنزیمی جدا و به محیط حاوی کراتین اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری در ۵۰ درجه سانتی گراد، کدورت در طول موج ٤٤٠ نانومتر خوانده و بهترین منبع نیتروژن جهت دستیابی به

بیشترین فعالیت آنزیمی مشخص شد (۱۲).

۲-۱۰-٦. بررسی تاثیر زمان انکوباسیون بر روی میزان تولید آنزیم کراتیناز

در این مرحله نیز، پیش کشت جدایه مورد نظر در محیط کشت مایع حاوی سوبسترای بهینه کراتین با؛ pH: ۱۱، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت ۱۰ گرم بر لیتر سوبسترای آزوکراتین، منبع نیتروژنی پپتون، دور هوادهی ۲۵۰ دور بر دقیقه و میزان تلقیح ۲ میلی لیتر بدست آمد. هر ۲٤ ساعت یکبار تا ۵ شبانه روز، میزان کدورت آن در طول موج ٤٤۰ نانومتر اندازه گیری شد تا زمان انکوباسیون مناسب جهت تولید بیشترین میزان کراتیناز بدست آید (۱۲، ٦).

۲-۱۱. بررسی توانایی تجزیه پر خام توسط باکتری پروبیوتیک *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15

ابتدا باسیلوس *لیکنی فورمیس* PVKR15، به مدت ۲٤ ساعت در محیط کشت لوریا برتانی براث کشت داده شد. سپس با نسبت ۵ درصد غلظت حجمی (v/v) یک محلول، محیط کشت حاوی $۱۰^{٦}$ (واحد تشکیل کلنی/میلی لیتر) سوسپانسیون باکتریایی در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت غنی از کراتین (با اعمال تمام شرایط بدست آمده در بهینه سازی مراحل قبل) ریخته شد. سپس دور هوادهی ۲۵۰ دور بر دقیقه، تلقیح اولیه جدایه به میزان ۱۰ میلی لیتر و مدت زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت اعمال گردید. منبع کراتین از نوع پر خام شسته و استریل شده تلقیح و در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. سپس برای جداسازی سلول های باکتریایی از مایع رویی، ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۰ هزار g اعمال شد. از مایع رویی بدست آمده برای بررسی فعالیت کراتینازی استفاده گردید (۱۲).

۲-۱۲. روش تحلیل آماری

از آزمون شاپیرو-ویلک، جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها و از آزمون لون، برای بررسی برابری واریانس‌ها استفاده شد. در آزمون‌های انجام شده، ارزش p بیشتر از ۰/۰۵ به دست آمد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. مقایسه تغییرات میانگین کراتیناز اندازه‌گیری شده بین گروه‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها، آزمون تعقیبی توکی جهت مقایسه دو به دوی تغییرات میانگین استفاده شد. نتایج بر اساس میانگین و انحراف معیار بیان شد. نرم افزار آماری ۲٦ SPSS- جهت ورود و تحلیل داده ها استفاده گردید ($p<۰/۰۵$).

۳. نتایج

۳-۱. نتایج شناسایی باکتری های *باسیلوس* و فعالیت کراتیناز

تعداد ۸ عدد از ٤۲ جدایه پس از گذشت ۷۲ ساعت (بررسی فعالیت کراتینازی) در اطراف کلونی های خود هاله شفاف ایجاد نمودند که نشان دهنده تولید کراتیناز برای تجزیه و استفاده از تنها منبع کربن محیط کشت (کراتین) بود. اطراف بقیه جدایه ها هاله شفاف ایجاد نشد. در نتیجه کراتینازی نبوند، لذا این جدایه ها در این مرحله از مطالعه حذف شدند. ۸ جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* بدست آمده توسط آزمایشات فنوتیپی (۱۳) و واکنش زنجیره ای پلی مراز به عنوان *باسیلوس لیکنی فورمیس* تایید شدند (جدول ۲).

جدول ۲- جدایه **های *باسیلوس لیکنی فورمیس* تجزیه کننده کراتین و روش جداسازی آن ها**

نام جدایه	روش جداسازی	رقت منشاء
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR1	تیمار حرارتی	$۱۰^{-۵}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR6	تیمار الکلی	$۱۰^{-۶}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR8	تیمار الکلی	$۱۰^{-۷}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR9	تیمار الکلی	$۱۰^{-۸}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR10	تیمار حرارتی	$۱۰^{-۹}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR15	تیمار الکلی	$۱۰^{-۳}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR26	تیمار حرارتی	$۱۰^{-۴}$
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR41	تیمار حرارتی	$۱۰^{-۳}$

جدایه تجزیه کننده *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR6 بیشترین (۰/۲۷ ± ۱۲٤/۰۸٤ واحد بر میلی لیتر) فعالیت کراتینازی را طی مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد داشت. بعد از آن جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 (۰/٤۵ ± ۱۰۱/۰۹ واحد/میلی لیتر)، *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR41 (۰/۳۵ ± ۱۰۰/۱۸ واحد بر میلی لیتر) و *باسیلوس لیکنی*

فورمیس PVKR8 (۰/٦٤ ± ۸۵/۵۷ واحد/میلی لیتر)، تقریبا در یک محدوده فعالیت بودند. با توجه به اینکه میزان (۰/٦٤ ± ۸۵/۵۷ واحد بر میلی لیتر) فعالیت کراتینازی قابل قبول به علاوه خصوصیات پروبیوتیکی جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس*PVKR15 جداسازی شده، قبل از تغلیظ آنزیم کراتیناز، در طول موج ٤٤۰ نانومتر، از سایر جدایه های بیشتر بود. لذا از این جدایه در مراحل بعدی آزمایش استفاده شد. جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR1 (۰/۲٤ ± ٦۳/۷٤ واحد بر میلی لیتر)، باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR8 (۰/٦٤ ± ۸۵/۵۷ واحد بر میلی لیتر)، *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR26 (۰/۸۵ ± ۸۵/۳۷۹ واحد بر میلی لیتر)، *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR10 (۰/۵٤ ± ٦۵/۳٤٤ واحد بر میلی لیتر) و *باسیلوس لیکنی فورمیس* PTCC ۱۵۹۵ (۰/٦۳ ± ٤۸/۹۱ واحد بر میلی لیتر)، نیز در یک سطح طبقه بندی شدند (جدول ۳).

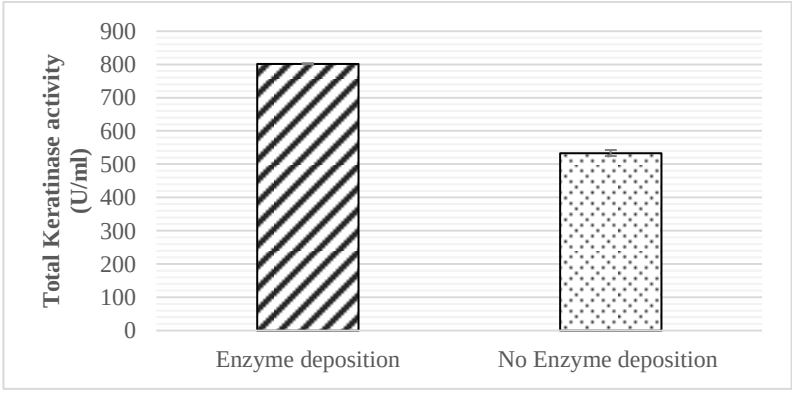
جدول ۳–میزان (میانگین ± انحراف معیار) فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر) جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس*

نام جدایه	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد/میلی لیتر)	فعالیت کل آنزیم (واحد/میلی لیتر)	فعالیت ویژه آنزیم (واحد/میلی لیتر)
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr1	± ۰/۰۰۱۵ ۰/۰۳۴۸	/۷۶ ± ۰/۱۳ ۳	± ۰/۲۴ ۶۳/۷۴	۱۹۱/۲۲ ± ۰/۷۲	/۶۲ ± ۲/۳۰ ۶۵
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr6	±۰/۰۰۲۵ ۰/۰۷۶۸	±۰/۲۲ ۶/۷۸۹	± ۰/۲۷ ۱۲۴/۰۸۴	۳۷۲/۲۵۳ ± ۰/۸۱	± ۱/۶۱ ۵۴/۸۳
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr8	±۰/۰۰۱۱ ۰/۰۵۸	±۰/۱۰ ۵/۱۲	± ۰/۶۴ ۸۵/۵۷	۲۵۷/۲۵ ± ۱/۳۸	±۰/۷۱ ۵۰/۲۴۴
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr9	±۰/۰۰۲ ۰/۰۶۰۴	۵/۳ ± ۰/۰۲	± ۰/۴۴ ۷۸/۴	۲۳۵/۲ ± ۱/۳۲	± ۱/۵۰ ۴۴/۳۷
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr10	±۰/۰۰۳۲ ۰/۰۵۰۴	± ۰/۳۱ ۴/۴۱۹	± ۰/۵۴ ۶۵/۳۴۴	۱۹۶/۰۳۲ ± ۱/۶۰	± ۲/۹۰ ۴۴/۳۵۲
باسیلوس لیکنی فورمیس	±۰/۰۰۴۱ ۰/۰۶۸	± ۰/۳۶ ۶/۰۱۱	± ۰/۴۵ ۱۰۱/۰۹	۳۰۳/۲۹۳ ± ۱/۳۵	± ۲/۶۰ ۵۰/۴۵۵

pvkr15					
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr26	±۰/۰۰۱۷ ۰/۰۴۹۳	±۰ /۱۵ ۴/۳۵	± ۰/۸۵ ۸۵/۳۷۹	۲۵۶/۱۳۷ ± ۲/۵۰	± ۱/۷۰ ۵۸/۸۸
باسیلوس لیکنی فورمیس pvkr41	±۰/۰۰۳۶ ۰/۰۶۵۸	± ۰/۳۱ ۵/۸۱۶	± ۰/۳۵ ۱۰۰/۱۸	۳۰۰/۵۵۷ ± ۱/۰۹	± ۲/۵۰ ۵۱/۶۷۷
باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC ۱۵۲۵ کنترل منفی	-	-	-	-	-
باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC ۱۵۹۵ کنترل مثبت	±۰/۰۰۲۶ ۰/۰۷۱۳	±۰/۲۳ ۶/۳۰۲	± ۰/۶۳ ۴۸/۹۱	۱۴۶/۷۳۳ ± ۱/۹۰	± ۰/۵۳ ۲۳/۲۸۳

۳-۲. نتایج رسوب دادن پروتئین (آنزیم) طبیعی (قبل از شرایط بهینه سازی) و کراتیناز (بعد از شرایط بهینه سازی) با روش سولفات آمونیوم

بر اساس نتایج بدست آمده، فعالیت کراتینازی کل بعد از شرایط بهینه سازی، بالاتر (۸۰۰ واحد بر میلی لیتر) از قبل از شرایط بهینه سازی (۵۰۰ واحد بر میلی لیتر) بود (نمودار ۱).

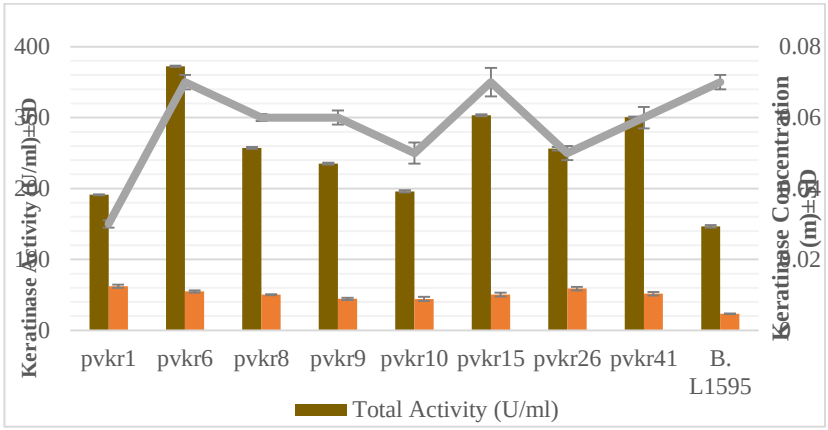


نمودار ۱- نتایج رسوب دادن کراتیناز (قبل و بعد از شرایط بهینه سازی) با روش رسوب بوسیله سولفات آمونیوم

با افزایش فعالیت کراتینازی جدایه های انتخابی *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 (۰/۸۵ ± ۱۶۰/۳۵۹ واحد بر میلی لیتر) بعد از شرایط بهینه سازی، این جدایه به عنوان جدایه تجزیه کننده کراتین و پروبیوتیک (زیرا تنها جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 بر اساس مطالعه قبلی ما (۱۲) هر دو خاصیت کراتینازی و پروبیوتیک را دارا بود) با *باسیلوس لیکنی فورمیس* PTCC ۱۵۹۵ (۰/۹٤ ± ۹۲/۳٤٦ واحد بر میلی لیتر) به عنوان کنترل مثبت، مقایسه شد (جدول ٤ و نمودار ۲).

جدول ٤- تاثیر بهینه سازی کراتیناز *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 (واحد بر میلی لیتر) بر فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)

نام جدایه	میانگین میزان جذب	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کل آنزیم (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت ویژه آنزیم (واحد بر میلی لیتر)
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR15 (قبل از شرایط بهینه)	±۰/۰۰۳۵ ۵/۹۴۲	± ۰/۰۱۲ ۰ /۱۱۹	± ۱/۰۶ ۱۰/۵۱۹	± ۰/۸۵ ۱۶۰/۳۵۹	/۰۷۷ ± ۲/۵ ۴۸۱	± ۳/۹۰ ۴۵/۷۳۴
باسیلوس لیکنی فورمیس PVKR15 (بعد از شرایط بهینه)	۰/۱۸۰±۰/۰۳۵	۱۵/۹۳±۰/۴۵	۲۶۷/۹۵±۲/۲۱	۸۰۱/۶۹±۱/۳۸	۵۱/۰۹±۱/۵۸	۰/۱۸۰±۰/۰۳۵
باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC ۱۵۹۵ کنترل مثبت	±۰/۰۰۱۲ ۶/۰۰۱	±۰/۰۲۵ ۰/۱۲۰	± ۲/۲۱ ۱۰/۶۰۷	± ۰/۹۴ ۹۲/۳۴۶	± ۲/۸ ۲۷۷/۰۳۸	±۲/۸ ۲۶/۱۱۸



نمودار ۲. تاثیر بهینه سازی آنزیم کراتیناز (واحد بر میلی لیتر) بر فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

۳-۳. نتایج شرایط بهینه سازی

۳-۳-۱. نتایج یافتن بهترین pH برای افزایش تولید کراتیناز

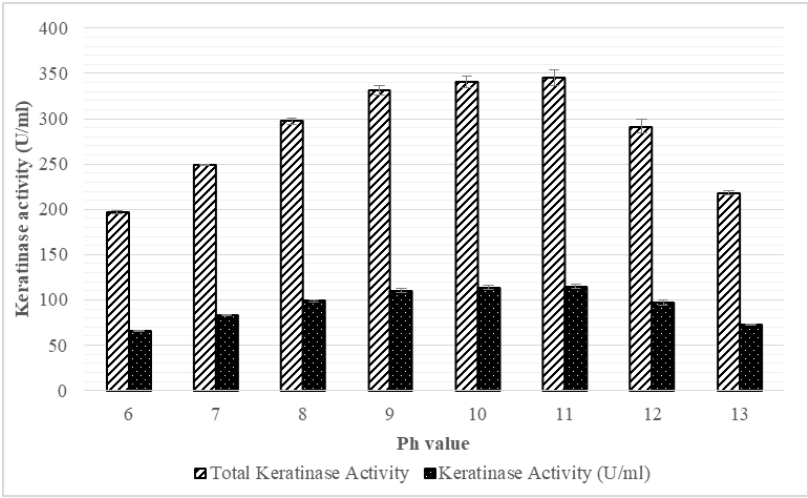
pH بهینه جهت افزایش تولید کراتیناز میکروبی توسط جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، pH:۱۱ بود. در این pH فعالیت کراتینازی به ۲/۸۱ ± ۱۱۵/۰۰۹ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل به ۸/٤۷ ± ۳٤٥/۰۲۸ واحد بر میلی لیتر رسید. میزان فعالیت کراتیناز جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 در pH های ۹، ۱۰ و ۱۱ اختلاف معنی داری نداشت ($p > ۰/۰۵$). همچنین بین pH؛ ۸ و ۱۲ نیز از نظر میزان فعالیت آنزیم کراتیناز تفاوتی دیده نشد ($p > ۰/۰۵$)، اما میان میزان فعالیت کراتینازی این جدایه، در سایر pH ها اختلاف معنی دار وجود داشت ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۵ و نمودار ۳).

جدول ۵- میزان فعالیت کراتیناز (واحد بر میلی لیتر) بر اساس اسیدیته های مختلف

pH	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد/میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی کل (واحد/میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی ویژه (واحد/میلی لیتر)

٦	±۰/۰۰٦ ۰/۰٤۳۸	±۰/٥٤ ۳/۸۷۱	/٦۹±۰/٦۷ ^{d}٦٥	/۰۷۹±۲/۰۲ ۱۹۷	±۰/۷۱ ٥۰/۹٦
۷	±۰/۰۱٤ ۰/۰٥۲۸	±۰/۳٤ ٤/٦۷۱	/۹۹±۰/۲۹ ^{c}۸۲	/۹۹۳±۰/۸۷ ۲٤۸	±٤/۱۲ ٥۳/٤٥
۸	±۰/۰۰۲ ۰/۰٦۳۹	±۰/٤۱ ٥/٦٤۸	/۱۹±۱/۱۹ ^{b}۹۹	/٥۸۱±۳/٥۷ ۲۹۷	±۳/۲۲ ٥۲/۸۰
۹	±۰/۰۱۲ ۰/۰۷۲۳	±۰/۱۳ ٦/۳۹	/٤۷۹±۱/۸۷ ^{a}۱۱۰	/٤۳۷±٥/٦۳ ۳۳۱	/۸۸±۲ ٥۱
۱۰	±۰/۰۱٦ ۰/۰۷٥۲	±۰/۲٦ ٦/٦٥۱	/٥۸±۲/۲۳ ^{a}۱۱۳	/۷٦۳±٦/۷۱ ۳٤۰	±۱/۰٦ ٥۱/۲٥
۱۱	±۰/۰۲٦ ۰/۰۷٥٤	±۰/٤۱ ٦/٦٦٤	/۰۰۹±۲/۸۱ ^{a}۱۱٥	/۰۲۸±۸/٤۷ ۳٤٥	±۱/۹۳ ٥۱/۸۳
۱۲	±۰/۰۱۳ ۰/۰٦٥۳	±۰/۱٤ ٥/۷۷۲	/۱٥۲±۲/٥۱ ^{b}۹۷	/٤٥٦±۷/٥٦ ۲۹۱	±۰/۱۰ ٥۰/٤۹
۱۳	±۰/۰۰۹ ۰/۰٤۸۹	±۰/۰٥ ٤/۳۲۲	/۷۲٤±۰/۸٦ ^{e}۷۲	/۱۷۳±۲/٥۸ ۲۱۸	±۰/۰۹ ٥۰/٤۷

^{a,b} فعالیت کراتینازی جدایه های مختلف با اختلاف معنی‌دار با یکدیگرمی باشد ($P < ۰/۰٥$).



نمودار ۳- فعالیت کراتینازی و کراتینازی کل (واحد واحد بر میلی لیتر) بر اساس اسیدیته های مختلف، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

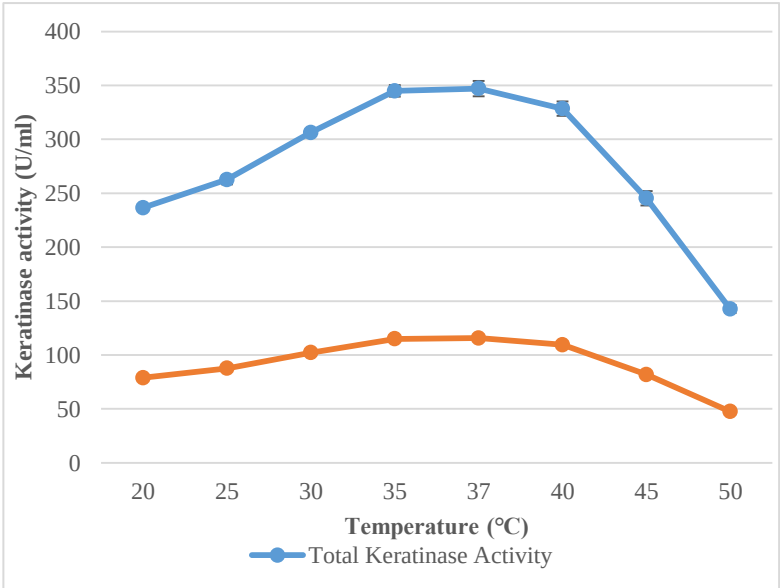
۳-۳-۲. نتایج یافتن بهترین دما برای افزایش تولید کراتیناز

دمای بهینه جهت افزایش تولید کراتیناز میکروبی توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود. در این دما و رعایت pH بهینه، فعالیت کراتینازی به ۲/۳٤ ± ۱۱۵/۷۰۲واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل به ۷/۱٤ ± ۳٤۷/۱۰۸ واحد بر میلی لیتر رسید. فعالیت کراتینازی *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از دماهای دیگر بیشتر بود، اما از لحاظ تحلیل آماری، بین میزان فعالیت این آنزیم در دمای ۳۵ و ۳۷ درجه سانتیگراد اختلاف معنی داری وجود نداشت ($p > ۰/۰۵$)، اما بین سایر دماها میزان فعالیت این آنزیم با یکدیگر اختلاف معنی دار مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ٦ و نمودار ٤).

جدول ٦ – میزان فعالیت کراتیناز (واحد/میلی لیتر) بر اساس دما هـای مختلـف (درجـه سانتیگراد)

دما (درجه سانتیگراد)	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی ویژه (واحد بر میلی لیتر)
۲۰	۰/۰۵۳±۰/۰۰۸	۲/۸۲±۰/۰۳	^{b}۷۸/۸۲±۰/۶۴	۲۳۶/۴۸±۱/۹۴	۵۰/۵۰±۰/۰۰۹
۲۵	۰/۰۵۸±۰/۰۲	۵/۱۲±۰/۰۸۶	^{b}۸۷/۵۳±۱/۴۷	۲۶۲/۶۴±۴/۳۴	۵۰/۴۰±۰/۰۰۸
۳۰	۰/۰۶۸±۰,۰۰۴	۶/۰۱±۰/۰۴۳	^{b}۱۰۲/۰۸±۰/۷۰	۳۰۶/۲۴±۲/۱۲	۵۰/۴۸±۰/۰۱
۳۵	۰/۰۷۷±۰/۰۰۹	۶/۸۰±۰/۱۰	^{a}۱۱۴/۹۷±۱/۷۶	۳۴۴/۹۳±۵/۲۸	۵۰/۵۰±۰/۰۰۹
۳۷	۰/۰۸۱±۰/۰۱۱	۶/۸۷±۰/۰۱۳	^{a}۱۱۵/۷±۲/۳۴	۳۴۷/۱۰۸± ۷/۰۴	۵۰/۴۴±۰/۰۶
۴۰	۰/۰۷۳±۰/۰۱۵	۶/۴۵±۰/۱۳	^{b}۱۰۹/۴۸±۲/۲۳	۳۲۸/۴۶±۶/۶۹	۵۰/۵۰±۰/۰۰۷
۴۵	۰/۰۵۴±۰/۰۰۸	۴/۷۷±۰/۱۵	^{b}۸۱/۷۶±۲/۲۵	۲۴۵/۳±۶/۷۷	۵۰/۴۹±۰/۰۲
۵۰	/۰۳۱±۰/۰۰۷۵ ۰	۲/۷۴±۰/۰۶	^{b}۴۷/۵۳±۱/۲۰	۱۴۲/۶±۳/۶۱	۵۰/۵۱±۰/۰۰۲

^{a,b}حروف الفبا متفاوت در ستون فعالیت کراتینازی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بـا یکـدیگر است ($p < ۰/۰۵$)



نمودار ٤- فعالیت کراتینازی و کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر) بر اساس دما های مختلف (درجه سانتیگراد) ، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

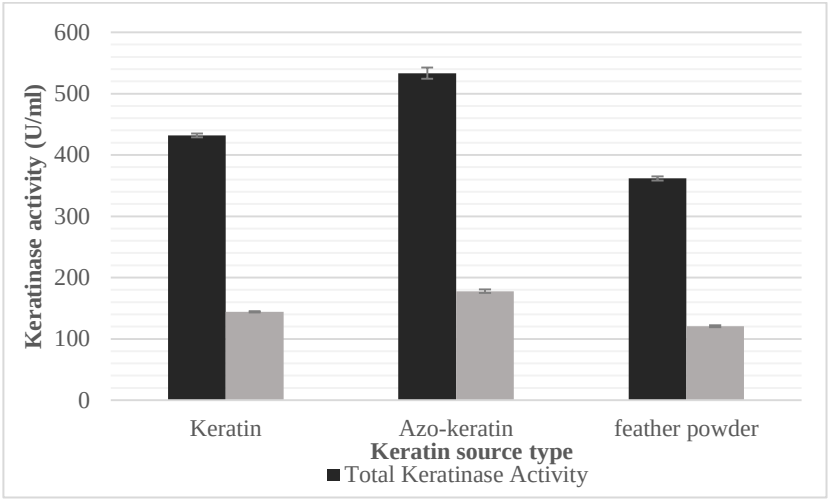
۳-۳-٤. نتایج یافتن بهترین نوع منبع کراتینی برای افزایش تولید کراتیناز

منبع کراتینی مناسب و بهینه جهت افزایش تولید و متعاقبا افزایش فعالیت کراتیناز میکروبی توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، منبع کراتینی آزوکراتین بود. با استفاده از آزوکراتین به عنوان تنها منبع کربن محیط کشت و در حضور شرایط بهینه براساس فاکتورهای بررسی شده قبلی، بهینه فعالیت کراتینازی در حضور آزوکراتین به ۳/۰۳ ± ۱۷۷/۷۷واحد بر میلی لیتر رسید و فعالیت کراتینازی کل به ۹/۱۱ ± ۵۳۳/۳۳٦ واحد بر میلی لیتر بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کراتیناز در حضور آزوکراتین با سایر گروه ها اختلاف معنی دار وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). کمترین (۱/٦۷±۱۲۰/۵۵ واحد بر میلی لیتر) میزان فعالیت آنزیم کراتیناز نیز در گروه پر آسیاب شده بود (جدول ۷ و نمودار ۵).

جدول ۷. میزان فعالیت کراتیناز (واحد بر میلی لیتر) براساس سوبسترهای کراتینی

نوع منبع کراتینی	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی ویژه (واحد بر میلی لیتر)
کراتین	۰/۰۹۴±۰/۰۱۳	۳۷±۰/۳۲ ۸/	/۹۵±۱/۰۴ [b]۱۴۳	۴۳۱/۸۵±۳/۱۲	/۶۲±۱/۶۳ ۵۱
آزوکراتین	۰/۱۱۵±۰/۰۱۵	۸۵±۱/۱۸ ۹/	/۷۷±۳/۰۳ [a]۱۷۷	۵۳۳/۳۳±۹/۱۱	/۴۵±۵/۶۳ ۵۴
پر آسیاب شده	۰/۰۴۳±۰/۰۲۴	۱۱±۰/۱۶ ۷/	/۵۵±۱/۶۷ [c]۱۲۰	/۶۶۵±۳/۱۵ ۳۶۱	/۵۰±۰/۵۰ ۵۰

[a,b]حروف الفبا متفاوت در ستون فعالیت کراتینازی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با یکدیگر است ($P < ۰/۰۵$).



نمودار ۵- فعالیت کراتینازی و کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر) بر اساس سوبسترهای کراتینی، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

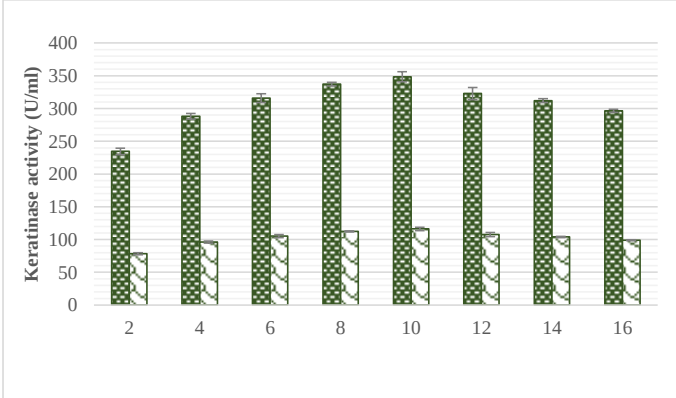
۳-۳-۵. نتایج یافتن بهترین غلظت منبع کراتینی برای افزایش فعالیت کراتیناز

غلظت سوبسترای کراتینی بهینه جهت افزایش تولید آنزیم کراتیناز میکروبی توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، غلظت ۱۰ گرم بر لیتر بود. در این غلظت و رعایت pH و دمای بهینه، فعالیت کراتینازی به ۲/۵۱ ± ۱۱۶/۱۱۵ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل به ۷/۵۵ ± ۳۴۸/۴۶۷ واحد بر میلی لیتر رسید. میزان فعالیت کراتینازی در غلظت کراتین ۱۰ گرم بر لیتر بیش از (۲/۵۱±۱۱۶/۱۵ واحد بر میلی لیتر) سایر غلظت ها بود و دارای اختلاف آماری معنی داری با سایر غلظت ها داشت ($p < ۰/۰۵$). همچنین از غلظت ۲ الی ۱۰ گرم بر لیتر کراتین، فعالیت کراتینازی روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشت. میزان فعالیت کراتینازی در غلظت ۶ گرم بر لیتر با غلظت های ۱۲ و ۱۴ گرم بر لیتر اختلاف معنی دار نداشت ($p > ۰/۰۵$)، همچنین بین غلظت های ۴ و ۱۶ گرم بر لیتر کراتین نیز اختلاف معنی دار آماری دیده نشد ($p > ۰/۰۵$)، اما میان سایر غلظت ها اختلاف های مشاهده شده معنی دار بود ($p < ۰/۰۵$). در غلظت کراتین ۲ گرم بر لیتر از سوبسترای کراتینی، فعالیت آنزیم کراتیناز از تمام گروه ها کمتر (۱/۶۳±۷۸/۱۷ واحد بر میلی لیتر) بود و با آنها اختلافی معنی دار را نشان داد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۸ و نمودار ۶).

جدول ۸- میزان فعالیت کراتیناز (واحد بر میلی لیتر) براساس غلظت های مختلف سوبسترای کراتینی (گرم بر لیتر)

غلظت کراتین (گرم/ لیتر)	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی ویژه (واحد بر میلی لیتر)
۲	±۰/۰۰۷ ۰/۰۵۱	±۰/۱۷ ٤/٥٦	/۱۷±۱/٦۳ ^{d}۷۸	±٤/۹۱ ۲۳٤,٥۳	±۰/۹ ٥۱,٤۳
٤	±۰/۰۰۹ ۰/۰٦۳	±۰/۲ ٥/٦۳	/۰٥±۱/٤۸ ^{c}۹٦	/۱٥±٤/٤٥ ۲۸۸	±۱/۰۲ ٥۱/۱۹
٦	±۰/۰۰٤ ۰/۰۷	±۰/۱٦ ٦/۲۲	/۲۹±۲/۲٦ ^{b}۱۰٥	/۸۷±٦/۷۹ ۳۱٥	±۰/۲۸ ٥۰/۷۲
۸	±۰/۰۱۳ ۰/۰۷۳	±۰/۲٦ ٦/٥۲	/۳۹±۰/۹٤ ^{a}۱۱۲	/۱۹±۲/۸٤ ۳۷۷	±۰/۲۷ ٥۰/٦۸
۱۰	±۰/۰۱ ۰/۰۷٦	±۰/۲٥ ٦/۷٦	/۱٥±۲/٥۱ ^{a}۱۱٦	/٤٦±۷/٥٥ ۳٤۸	±۱/٥٥ ٥۱/٥۷
۱۲	±۰/۰۰۲ ۰,۰۷۱	±۰/۱۳ ٦/۳٥	±۳/۰۷ ^{b}۱۰۷,٥۹	/۷۷±۹/۲۳ ۳۲۲	±۰/٤٤ ٥۰/۷۹
۱٤	±۰/۰۱٦ ۰/۰٦۹	±۰/۰۸ ٦/۱٦	/۰۲±۱/۰۰ ^{b}۱۰٤	/۰٦±۳/۰۱ ۳۱۲	±۰/۱۷ ٥۰/٦۱
۱٦	±۰/۰۰۸ ۰/۰٦٤	±۰/۳۳ ٥/٦۷	/۷۸±۰/۷۹ ^{c}۹۷	/۳٦±۲/۳۸ ۲۹٦	±۲/۳٤ ٥۲/۳٤

a,b حروف الفبا متفاوت در ستون فعالیت کراتینازی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با یکدیگر است ($p < ۰/۰٥$)



نمودار ٦- فعالیت کراتینازی و کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر) بر اساس غلظت هـای مختلف سوبسترای کراتینی (گرم بر لیتر)، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

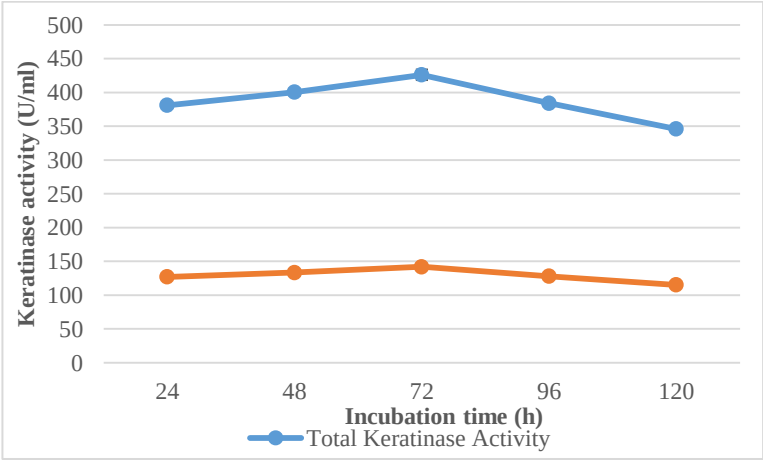
۳-۳-٦. نتایج یافتن بهترین زمان گرماگذاری برای افزایش تولید کراتیناز

زمان گرماگذاری مناسب و بهینه جهت افزایش تولید و متعاقبا افزایش فعالیت آنـزیم کراتینـاز میکروبی توسط *باسیلوس لیکنی فـورمیس* PVKR15، ۷۲ سـاعت بـود. بـا زمـان ۷۲ سـاعت، رعایت pH، دما، غلظت سوبسترای کراتینی، منبع نیتروژنی و میزان تلقیح بهینه، فعالیت کراتینازی به ۲/۵۹ ± ۱٤۲/۰۰۷ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل به ۷/۷۹ ± ٤۲٦/۰۲۳ واحـد بـر میلی لیتر رسید. بیشترین میزان فعالیت کراتینازی در ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری دیده شـد کـه بـا سایر گروهها اختلاف معنی دار نشان داد ($p < ۰/۰۵$). بین زمان ۲٤ و ۹٦ ساعت اخـتلاف معنـی داری دیده نشد ($p > ۰/۰۵$)، ولی بین سایر زمان ها از نظر میزان فعالیت کراتیناز، اختلاف معنـی دار مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). کمترین میزان فعالیت کراتیناز در ۱۲۰ ساعت گرمخانـه گـذاری مشاهده شد (جدل ۹ و نمودار ۷).

جدول ۹- میزان فعالیت آنزیم کراتیناز (واحد بر میلی لیتر) براساس زمان گرماگذاری مختلف (ساعت)

زمان گرماگذاری (ساعت)	غلظت (مولار)	پروتئین (میلی گرم)	فعالیت کراتینازی (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر)	فعالیت کراتینازی ویژه (واحد بر میلی لیتر)
۲۴	۰/۰۸۵±۰/۰۱۲	۷/۵۶±۰/۰۵	^{c}۱۲۷/۰۰±۱/۲۶	۳۸۱/۰۱±۳/۸۶	۵۰/۳۸±۰/۱۲
۴۸	۰/۰۹۰±۰/۰۱۳	۷/۹۳±۰/۱	۱۳۳/۴۷±۱/۷۹ ^{b}	۴۰۰/۴۱±۵/۳۸	۵۰/۴۵±۰/۰۳
۷۲	۰/۰۹۴±۰/۰۱۱	۸/۳۸±۰/۲۲	^{a}۱۴۲/۰۰±۲/۵۹	۴۲۶/۰۲۳±۷/۷۹	۵۰/۷۹±۰/۴۳
۹۶	۰/۰۸۶±۰/۰۲۳	۷/۶۰±۰/۱۱	^{c}۱۲۸/۰۱±۱/۷۱	۳۸۴/۰۵±۵/۱۳	۵۰/۵۲±۰/۰۷
۱۲۰	۰/۰۷۷±۰/۰۱	۶/۸۶±۰/۰۴	۱۱۵/۳۱±۱/۱۵ ^{d}	۳۴۵/۹۵±۳/۴۶	۵۰/۳۷±۰/۱۴

^{a,b}حروف الفبا متفاوت در ستون فعالیت کراتینازی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با یکدیگر است ($p < ۰/۰۵$)



نمودار ۷- فعالیت کراتینازی و کراتینازی کل (واحد بر میلی لیتر) بر اساس زمان گرماگذاری مختلف (ساعت)، U/ml؛ واحد بر میلی لیتر

۳-۳-۷. نتایج بررسی توانایی تجزیه پر خام توسط باکتری پروبیوتیک *باسیلوس لیکنی*

فورمیس PVKR15

تمام پرهای خام توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 در مدت ٢٤ ساعت تجزیه و بصورت محلول ظاهر شدند. در این مرحله فعالیت کراتینازی آنزیم کراتیناز تولید شده توسط این جدایه به میزان ۱/۲± ۱۱۹/۵۷ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل، ۳/۲۱± ۳۵۸/۷۱ واحد بر میلی لیتر بود (نتایج آزمایش با سه بار تکرار تایید شد).

٤. بحث

این بررسی با هدف بهینه سازی تولید کراتیناز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* جهت تجزیه پر و تامین منبع پروتئینی خوراک دام و طیور صورت گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که برخی از جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* (در بررسی حاضر جدایه های *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR1-6-8-9-10-15-26-41) توانایی بسیار بالایی در تولید کراتیناز دارند. در تحقیق Ghasemi و همکارانش، ۳۰ جدایه جداسازی شده *باسیلوس* از نمونه های خاک مرغداری، کشتار گاه و ضایعات کراتینی موجود در طبیعت مورد بررسی قرار گرفتند. پتانسیل تجزیه کنندگی کراتین در صنعت تولید خوراک دام و طیور، براساس محیط پر پایه و با استفاده از پرها به عنوان تنها منبع کربن، نیتروژن و گوگرد تایید گردید. *باسیلوس* MKR5 بالاترین فعالیت کراتینازی (۲۲۵ واحد بر میلی لیتر) را در ۵۰ الی ۲۰ درجه سانتیگراد نشان داد. در بررسی ما بالاترین فعالیت کراتینازی بیشترین (١٢٤/٠٨٤ واحد بر میلی لیتر) فعالیت طی مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد داشت، که مشابه با *باسیلوس* MKR5 بود. همچنین *باسیلوس* MKR5 یک کراتیناز مقاوم در برابر حرارت با فعالیت بهینه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و ۸ pH: تولید کرد. بر خلاف بررسی Ghasemi و همکارانش، در مطالعه ما بهینه دما ۳۷ درجه سانتی گراد بود که از دما در مطالعه بررسی Ghasemi و همکارانش کمتر بود. همچنین در ۸ pH:، جدایه ها فعالیت کراتینازی نداشتند، و ۱۱ :pH بهینه بود. بنابراین پایداری حرارتی این آنزیم استفاده از این باکتری را در فرآیندهای بیوتکنولوژیکی امکان پذیر می کند، از طرفی پایداری حرارتی و pH در جدایه های مختلف متفاوت است که ممکن است بخاطر تغییرات و اختلافات ژنتیکی جدایه ها باشد (۱۹). مطالعه Mousavi و همکارانش نیز مشخص کرد که *باسیلوس سوبتیلیس* در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد و pH: ۱۱، بهینه برای حداکثر فعالیت آنزیم کراتیناز را جهت تخریب پر دارا بودند (۲۰). در بررسی مشابه دیگر، Moridshahi و

همکارانش تولید کراتیناز در جدایه های *باسیلوس* FUM120 کراتینولیتیک مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه جدایه های *باسیلوس* FUM120 جدا شده از مرغداری های در حضور آزوکراتین و طی ۷۲ ساعت، pH: ۱۰/۵، غلظت ۰/٦ درصد آمونیوم کلرید، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، بیشترین میزان تولید کراتیناز (از ٤۹/۹٦٥ به ۱۱۷/٤٥ واحد بر میلی لیتر) را دارا بودند. بنابراین تغییرات فاکتورهای موثر در تولید کراتیناز تاثیر قابل توجهی در افزایش فعالیت کراتینولیتیکی دارند و باعث افزایش بیش از ۲ برابر تولید آنزیم می شود (). عواملی مانند کاهش وزن سوبسترای کراتین، آزادسازی فعالیت کراتینازی پروتئین های محلول، قلیایی شدن محیط و نوع خاک در مناطق مختلف جغرافیایی می تواند در تغییرات میزان کراتیناز نقش داشته باشد، بطور مثال یک رابطه مثبت قوی بین فعالیت کراتینازی و درصد کاهش وزن سوبسترا وجود دارد. همچنین، کراتیناز میکروبی محتوای پل های دی سولفیدی می باشند که به علت تفاوت در ساختار و محتوای کراتین α (محتوای سیستئین کمتر) و کراتین β (سیستئین بیشتر) در تجزیه بیشتر یا کمتر سوبسترا متفاوت می باشند (۲۱). Mohamed و همکارانش، دو جدایه *باسیلوس* از جمله *باسیلوس آمیلولیکوفاشینس* MA20 و *باسیلوس سوبتیلیس* MA21 را به عنوان تولید کننده پروتئاز تجزیه کننده کراتین، جداسازی و شناسایی کردند. جدایه های نام برده روی محیط کشت جامد حاوی ۱ درصد پشم گوسفند، قادر به تجزیه کامل سوبسترای کراتینی بودند. Mohamed و همکارانش میزان فعالیت کراتیناز جدایه ها را ۰/۸۱٤ – ۰/۹۲۲ واحد بر میلی لیتر گزارش کردند که از مطالعه ما (۱۲٤/۰۸٤ واحد بر میلی لیتر) کمتر بود. باکتری های تجزیه کننده کراتین در تحقیق Mohamed و همکارانش از نمونه های خاک و ماسه جمع آوری شده بودند، و ممکن است با توجه به نوع نمونه جمع آوری شده، جدایه ها فعالیت کراتینازی کمتری داشته باشند. جدایه های جدا شده از محیط های مختلف، ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین توالی‌یابی ژنی ۱٦S rRNA متفاوتی دارند، که باعث فیزیولوژی متفاوتی در آنها می شود (۲۲). در بررسی ما، منبع کراتینی مناسب و بهینه جهت افزایش تولید کراتیناز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15، آزوکراتین بود. در بررسی مشابه نیز Deivasigamani و همکارانش بیان داشتند که بیشترین (۰/۱۲۲٥ واحد بر میلی لیتر) فعالیت کراتینازی گونه های *باسیلوس* با استفاده از محیط کشت آزوکراتین بود که از خاک کشتارگاه و مرغ داری جداسازی شده بود. سوبستراهای مختلف کراتینی، ساختاری های متفاوتی در مقایسه با یکدیگر دارند، بطور

مثال کراتین ساختار سخت تری نسبت به آزوکراتین (کراتین فرآوری شده) دارد. با توجه به این مسئله بعضی از سوبستراها کمتر تجزیه پذیر می باشند. با این حال، جدایه *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR15 در تحقیق حاضر، فعالیت کراتینازی بسیار بیشتری را نسبتبه جدایه ها در مطالعه Deivasigamani و همکارانش از خود نشان داد (۵). در مطالعه Mohamed و همکارانش، بهینه فعالیت کراتینازی پشم در pH: ۷ و ۳۷ درجه سانتی گراد (در مطالعه ما نیز بهینه دمای فعالیت کراتینازی در ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده شد) بود. پروتئازهای کراتینولیتیک در محدوده وسیعی از دما و pH فعالیت دارند و ممکن است به بعضی از شرایط محیطی حساس باشند، وجود بعضی از موارد در منبع کراتینی ممکن است فعالیت این آنزیم را مهار کند. در مطالعه مذکور، پروتئازهای تولید شده به دلیل حساسیت به فنیل متیل سولفونیل فلوراید و اتیلن دی آمین تتراستیک اسید که در محیط وجود داشت، تا حدی مهار شدند. در تحقیق حاضر، *باسیلوس* های جدا شده، جدایه های مختلف *باسیلوس لیکنی فرمیس* بودند و جهت مشاهده هاله شفاف ناشی از تجزیه سوبسترای کراتینی، هر یک از جدایه ها، روی محیط کشت حاوی ۱/۵ درصد کراتین استخراج شده از پر مرغ کشت داده شدند، همچنین مهار کننده ای در محیط وجود نداشت. از طرفی دیگر، روش کار و مواد مصرفی در مطالعات مختلف متفاوت می باشد، بنابراین *باسیلوس* ها با خواص کراتینازی بهینه نیز می توانند از نظر میزان تولید بهینه آنزیم متفاوت باشد (۲۲).

همچنین در مطالعه ای مشابه که توسط Mukesh Kumar و همکارانش انجام شد، محققین با استفاده از محیط کشت حاوی ۳ درصد کراتین دریافتند که جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* MPTK6 دارای فعالیت تجزیه کنندگی کراتین است. میزان فعالیت کراتینازی *باسیلوس سوبتیلیس* MPTK6 در این بررسی ۲/٤ – ۲/۱ واحد بر میلی لیتر، گزارش کردند. در مطالعه حاضر، ۸ جدایه *باسیلوس لینکی فورمیس*، دارای قابلیت تجزیه کنندگی کراتین بودند. *باسیلوس لیکنی فورمیس* PVKR6 (۱۲٤/۰۸٤ واحد/میلی لیتر)، PVKR15 (۱۰۱/۰۹ واحد/میلی لیتر)، PVKR41 (۰/۳۵ ± ۱۰۰/۱۸ واحد بر میلی لیتر) و PVKR8 (۰/٦٤ ± ۸۵/۵۷ واحد بر میلی لیتر)، بیشترین فعالیت را داشتند. بنابراین جدایه ها و گونه های مختلف *باسیلوس* می توانند در میزان تولید این آنزیم متفاوت باشند و این امر بستگی به نوع گونه و جدایه دارد (۲۳). در مطالعه Mousavi و همکارانش از میان پنج جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی شده از ضایعات

ماکیان، تنها یکی از آن ها دارای خاصیت تجزیه کنندگی کراتین بود که همانند نتیجه بدست آمده درباره *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15 در پژوهش حاضر، بیشترین فعالیت کراتینازی را در pH=۱۱ داشته است، ولی دمای بهینه جهت افزایش تولید آنزیم کراتیناز، ٤٠ درجه سانتیگراد گزارش شد در حالی که در تحقیق حاضر این دما ۳۷ درجه سانتی گراد بود (۲۰). البته بر اساس نتایج آورده شده در تحقیقات مختلف، دمای بهینه جهت افزایش تولید کراتیناز در *باسیلوس*، بین ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد می باشد (۲۳، ۲۲، ۲۰). در تحقیقی که Ahmad pour و همکارانش انجام دادند، دمای بهینه بدست آمده جهت تولید آنزیم کراتیناز با نتایج تحقیق حاضر (۳۷ درجه سانتی گراد)، تفاوت چشم گیر داشت. دما در مورد *باسیلوس سرئوس*، ۲۲ درجه سانتی گراد گزارش شد. جدایه باکتری *باسیلوس سرئوس* در تحقیق که Ahmad pour و همکارانش از شرکت خریداری شده بوده و همانند باسیلوس استاندارد در تحقیق حاضر، از ضایعات طبیعی جداسازی نشده بود و یک جدایه استاندارد بود، لذا ممکن است در اثر نحوه نگهداری از جدایه، جهشی در ژن آن به وجود آمده باشد یا باکتری در طول زمان نگهداری خود را با دمای محیط سازگار کرده باشد (٢٤). در مطالعه انجام شده توسط Sivakumar و همکارانش، در مراحل تولید کراتیناز توسط *باسیلوس ترنجینسیس* TS2، غلظت بهینه سوبسترای کراتینی (آزوکراتین) جهت افزایش تولید آنزیم کراتیناز به میزان ۱۰ گرم بر لیتر در محیط کشت مایع بود. در پژوهش حاضر نیز غلظت ۱۰ گرم بر لیتر برای سوبسترای کراتین و آزوکراتین، بهترین غلظت بهینه بود و *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15 بیشترین میزان کراتیناز را در این غلظت (۱۰ گرم بر لیتر) تولید کرد. همچنین Sivakumar و همکارانش نشان دادند که میزان تلقیح ٤ درصد از *باسیلوس ترنجینسیس* TS2 در مدت زمان ٩٦ ساعت انکوباسیون، بیشترین میزان فعالیت کراتینازی را در پی افزایش تولید آن، در پی داشته است (۲۵). میزان بهینه تلقیح اولیه جدایه *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15 در مطالعه ما به مقدار ۸ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی در محیط کشت مایع غنی از کراتین با کدورت ۰/۵ نیم مک فارلند بود و بهترین زمان انکوباسیون ۷۲ ساعت اندازه گیری شد. زمان مناسب جهت تولید میزان بهینه کراتیناز در *باسیلوس* طی تحقیقات مختلف بین ٤٨ تا ٩٦ ساعت گزارش شده است (۲۸-۲٦). در این بررسی، بدست آوردن شرایط محیط کشت بهینه و اعمال آن باعث رشد و تولید کراتیناز بیشتر و متعاقبا افزایش فعالیت کراتینازی شد. فعالیت کراتینازی جدایه *باسیلوس لیکنی فرمیس*

PVKR15 در شرایط استاندارد اولیه ۱۰۱/۰۹۷۹ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل ۳۰۳/۲۹۳ واحد بر میلی لیتر بود. بعد از تغلیظ آنزیم با استفاده از سولفات آمونیوم، فعالیت کراتینازی آن به ۱٦۰/۳٥۹ واحد بر میلی لیتر و فعالیت کراتینازی کل به ٤۸۱/۰۷۷ واحد بر میلی لیتر افزایش یافت. در حال حاضر بسیاری از منابع میکروبی دارای توانایی تولید آنزیم کراتیناز هستند، ولی فقط تعداد کمی از آن ها ارزش استفاده در صنعت را دارند. در میان این منابع تجزیه کننده کراتین، گونه *باسیلوس* یکی از بهترین تولید کننده های آنزیم کراتیناز با توانایی تولید ۱۰۰/۱۸ تا ۱۲٤/۰۸ واحد بر میلی لیتر از آنزیم مذکور در محیط کشت هستند. از طرف دیگر، با در نظر گرفتن همه مراحل و مراتب، جهت انتخاب جدایه مناسب *باسیلوس* تولید کننده کراتیناز و دارای ویژگی پروبیوتیکی، تنها جدایه *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15 علاوه بر قابلیت تولید میزان کراتینازی قابل قبول، دارای خصوصیات و پتانسیل ذاتی برای بقا در محیط شکم و عملکرد مفید به عنوان پروبیوتیک اسپور دار بود (۱۲). در نتیجه، می توان از جدایه نام برده، در صنعت تهیه خوراک دام و طیور، با خواص پروبیوتیکی، استفاده کرد. همچنین نتایج ما نشان داد که در مرحله بهینه سازی pH، میزان فعالیت کراتیناز *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15 در pH های ۹، ۱۰ و ۱۱، اختلاف معنی داری نداشت و همچنین بین pH های ۸ و ۱۲ نیز تفاوتی دیده نشد، اما میان میزان فعالیت کراتینازی این جدایه در سایر pH ها اختلاف معنی داری وجود داشت. این اطلاعات به وضوح نشان می دهد که نمودار حاصل در این مرحله به صورت منحنی بود و در قله منحنی pH های ۹، ۱۰ و ۱۱ قرار دارند. از این نتایج اینگونه استنباط می شود که کراتیناز به علت ساختار پروتئینی- قلیا دوستی که دارد، در pH های قلیایی مذکور هم بیشتر تولید می شود و هم بهینه ترین فعالیت را از خود به نمایش میگذارد. اما در بحث نتایج بهینه سازی دما جهت تولید بیشتر آنزیم کراتیناز از جدایه *باسیلوس لیکنی فرمیس* PVKR15، مشخص گردید که با توجه به این که فعالیت کراتینازی این جدایه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از دماهای دیگر بیشتر بوده، اما از لحاظ تحلیل آماری، بین میزان فعالیت این آنزیم در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد اختلاف معنی داری وجود ندارد. در صورتی که بین سایر دماها، میزان فعالیت این آنزیم با یکدیگر اختلاف معنی دار وجود داشت. بر این اساس می توان بازه دمایی ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد (دمای مزوفیل) را مناسب ترین بازه دمای رشد جهت تولید کراتیناز بیشتر توسط این میکروارگانیسم معرفی کرد. با توجه به خصوصیات ذکر شده از جدایه *باسیلوس*

لیکنی فرمیس PVKR15 جهت تجزیه کراتین پر و تولید مستقیم بخشی از پروتئین خوراک دام و طیور با خاصیت پروبیوتیکی می توان استفاده کرد. این جدایه به پاک سازی محیط زیست به واسطه تجزیه حجم بالای پر های دور ریز کشتارگاه ها کمک می کند. همچنین مرحله باکتری زدایی پس از هیدرولیز پر در فرآیند تولید خوراک دام و طیور با اعمال *باسیلوس* کراتینولایتیک دارای خاصیت پروبیوتیک امکان پذیر می شود. در نتیجه پر های دور ریز و آلوده کننده محیط زیست، هدف تغذیه و رشد بهتر دام و طیور قرار می گیرند. با توجه به اینکه مطالعه حاضر صرفاً بصورت آزمایشگاهی بود، پیشنهاد می شود وضعیت سازگاری این باکتری با دستگاه گوارش ماکیان جهت استفاده بهینه تر از این باکتری در مواد غذایی ماکیان در تحقیقات بعدی مورد ارزیابی قرار گیرد.

۵. تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه آرندی، شرکت فزاپژوه (فزابیوتیک)، جهت همکاری در ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Song P, Zhang X, Wang S, Xu W, Wang F, Fu R & Wei F. Microbial proteases and their applications. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1236368.

2. Kotb E, Alabdalall AH, Alsayed MA, Alghamdi AI, Alkhaldi E, AbdulAzeez S & Borgio JF. Isolation, screening, and identification of alkaline protease-producing bacteria and application of the most potent enzyme from *Bacillus* sp. Mar64. *Fermentation*. 2023; 9(7): 637.

3. Rahimnahal S, Shams M, Tarrahimofrad H & Mohammadi Y. Analysis to describe the catalytic critical residue of keratinase *mojavensis* using peptidase inhibitors: A docking-based bioinformatics study. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2020; 7(2): 13-28.

4. Wang Z, Chen Y, Yan M, Li K, Okoye CO, Fang Z, Ni Z & Chen H. Research progress on the degradation mechanism and modification of keratinase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023; 107(4): 1003-1017.

5. Deivasigamani B & Alagappan KM. Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. *Journal of Environmental Biology*. 2008; 29(6): 933-936.

6. Thiyagarajan Amuthavalli CR. Isolation, characterization and optimization of keratinolytic bacteria from chicken feather waste dumping site. *Challenge*. 2023; 11(3): 144-152.

7. Abd El Nasser NH, Aly AM, Hanafy SS & Motawe FH. Keratinase production from chicken feather by new Egyptian local Streptomyces Isolates. *Egyptian Journal of Microbiology*. 2024; 58(1): 25-33.

8. Aktayeva S, Baltin K, Kiribayeva A, Akishev Z, Silayev D, Ramankulov Y & Khassenov B. Isolation of *Bacillus* sp. A5. 3 strain with keratinolytic activity. *Biology*. 2022; 11(2): 244.

9. Li Q. Progress in microbial degradation of feather waste. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10 (2019): 2717.

10. Mussakhmetov A, Kiribayeva A, Daniyarov A, Bulashev A, Kairov U & Khassenov B. Genome sequence and assembly of the amylolytic *Bacillus licheniformis* T5 strain isolated from Kazakhstan soil. *BMC Genomic Data*. 2024; 25(1): 3.

11. Moridshahi R, Bahreini M, Sharifmoghadam MM, Asoodeh A & Korouzhdehi B. Optimization of keratinase production by a native

isolate, *Bacillus* sp FUM120, using one factor at a time methodology. *Journal of Molecular and Cellular Researches*. 2020; 33(4): 542-554. [in persian]

12. Vanaki P, Zaboli F, Kaboosi H, Amoli RI & Savadkoohi F. Isolation and identification of keratinolytic probiotic *Bucillus licheniformis* bacteria from the soil below poultry slaughterhouse waste. *Brazilian Journal of Biology*. 2022; 84: e257473.

13. Mohamadkhani M & Shishegaran A. Identifying associations between local drought and global sea surface temperature. *Journal of Research in Science, Engineering and Technology*. 2020;8(3):1-4.

14. Shahbani Zahiri H, Goudarzi Z, Chamani M & Akbari Noghabi K. Isolation and characterization of a PHA-producing bacterial strain: biopolymer production under different growth conditions. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2011; 1(3): 23-32. [in persian]

15. Ashengroph M & Sahami Soltani M. Antimicrobial effects of extracellular copper sulfide nanoparticles synthesized from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Microbial World*. 2018; 11 (3 (36): 243-257. [in persian]

16. Garbati P, Salis A, Adriano E, Galatini A, Damonte G, Balestrino M & Millo E. A new method to synthesize creatine derivatives. *Amino Acids*. 2013; 45: 821-33.

17. Korouzhdehi B, Abbasi AR, Bahreini M, Pourbabaee AA & Sharif Moghadam MR. Isolation and recognition of keratinolytic bacteria strains based on their biochemical and molecular properties. *Journal of Genetics*. 2018; 12 (4): 535-546. [in persian]

18. Kumar M, Bhatia D, Khatak S, Kumar R, Sharma A & Malik DK. Optimization and purification of keratinase from *Bacillus anthracis* with dehairing application. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2019; 13 (1): 585-590.

19. Ghasemi Y, Shahbazi M, Rasoul-Amini S, Kargar M, Safari A, Kazemi A & Montazeri-Najafabady N. Identification and characterization of feather – degrading bacteria from keratin-rich wastes. *Annals of Microbiology*. 2012; 62 (2012): 737-744.

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

21. Moridshahi R, Bahreini M, Sharifmoghadam MM, Asoodeh A & Korouzhdehi, B. Optimization of keratinase production by a

native isolate, *Bacillus* sp FUM120, using one factor at a time methodology. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*. 2020; 33(4): 542-554. [in persian]

22. Mohamed AH, Bakry M, Haroun A, Amara A & Ehab AS. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* epecies isolated from Egyptian ecosystem. *BioMed Research International*. 2013; 2013: 175012.

23. Mukesh Kumar DJ, Priya P, Nithya Balasundari S, Nandhini Devi GSD, Immaculate Nancy Rebecca A & Kalaichelvan PT. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* Sp. MPTK6 and its antioxidant potential. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2012; 11(7): 900-907.

24. Ahmad Pour F, Yakhchali B & Sadat Musavi M. Isolation and Identification of a keratinolytic *Bacillus cereus* and optimization of Keratinase production. *Journal of Applied Biotechnology Reports*. 2016; 3(4): 507-512. [in persian]

25. Sivakumar T, Shankar T, Vijayabaskar P & Ramasubramanian V. Optimization for keratinase enzyme production using *Bacillus thuringiensis* TS2. *Plant Science*. 2012; 5(3): 102-109.

26. Surti A & Taral M. Study of optimization, characterization and applications of keratinase produced by a *Bacillus* strain. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2024; 18(2): 143-161.

27. Alamnie G, Gessesse A & Andualem B. Production of surfactant-stable keratinolytic protease from *B. subtilis* ES5 and its application as a detergent additive. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2023; 50 (2023): 102750.

28. Nnolim NE & Nwodo UU. *Bacillus* sp. CSK2 produced thermostable alkaline keratinase using agro-wastes: keratinolytic enzyme characterization. *BMC Biotechnology*. 2020; 20(1): 65.