



Scan online to view this article

## Increasing the stability of keratin protein solubility in aqueous solutions using the chemical structure modification by alkylation and sulfitolysis methods

Maryam Saleknezhad, Seyed Morteza Robotjazi\*, Mehdi Zeinoddini

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

### Abstract

**Aim and Background:** In the past two decades, proteins and peptides have become an important class of therapeutic drugs. However, their sensitivity to chemical and physical degradation has posed challenges for scientists. Approximate 90% of the chicken feather of slaughterhouse waste is Keratin. Keratin protein is insoluble in water and has a strong tendency to accumulate and precipitate. Today, the stability of proteins in pharmaceutical applications is of great importance.

**Materials and Methods:** In this study, Keratin was extracted from feather by sodium hydroxide 0.2 M and hydrolyzed by 8% (V/V) Alcalase enzyme in 55 Celsius, at 8 pH. The hydrolyzed Keratin solution was chemically modified by alkylation and sulfitolysis to reduce aggregation. Keratin solubility, degree of chemical modification, percentage of stability, mol amount of free thiol, also DLS, and FTIR of the samples were investigated.

**Results:** The result showed that the degree of chemical modification of Keratin in the alkylation method was 72% and the sulfitolysis method was 66%. The chemical modification of hydrolyzed Keratin was reduced aggregation at pH3 to 288.65% and 335.3% for alkylation method and sulfitolysis respectively. Investigation of the stability and preservation of protein content showed that the stability of modified Keratin by alkylation method was 81.9% and by sulfitolysis method was 86.3% in 30 days, but the hydrolyzed Keratin as a control preserved only 9.8% of protein content. The result of the DLS test shows that the Keratin modified by alkylation in water has  $PI=0.476$  and a mean particle size of 157.3 nm and Keratin modified by sulfitolysis in water has  $PI=0.475$  and a mean particle size of 136.2 nm, which was more uniform and dispersed than the hydrolyzed Keratin with  $PI=0.552$  and a mean particle size of 990.3 nm.

**Conclusion:** The chemical modification of hydrolyzed Keratin was a permanent change and binding of expected groups increased the Keratin solubility in aqueous solution and decreases the aggregation at acidic pH. The results of the FTIR analysis confirmed the chemical modification of Keratin.

**Keywords:** Feather Keratin, Chemical modification, stabilization, Alkylation of protein, sulfitolysis of protein.

Corresponding author:

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Email: s\_m\_robotjazi@mut.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## افزایش پایداری حلالیت پروتئین کراتین در محلول های آبی با استفاده از اصلاح ساختار شیمیایی به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز

مریم سالک نژاد<sup>۱</sup>، سید مرتضی رباط جزی<sup>۱\*</sup>، مهدی زین الدینی<sup>۲</sup>

۱. گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران.

۲. گروه بیوتکنولوژی سلولی مولکولی، دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** در دو دهه گذشته، پروتئین ها و پپتیدها تبدیل به یک گروه مهم از داروها شده اند. با این حال، حساسیت به تخریب شیمیایی و فیزیکی از چالش های اصلی کاربردهای صنعتی و دارویی پروتئین ها است. کمابیش ۹۰ درصد از وزن پرمرغ از ضایعات صنایع دام و طیور، کراتین است. این پروتئین نامحلول بوده و تمایل شدیدی به تجمع و رسوب دهی دارد.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش کراتین از پر مرغ با محلول سدیم هیدروکسید ۰/۲ مولار استخراج شد و توسط آنزیم آلکالاز صنعتی (V/V) ۸ درصد در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت در pH برابر ۸ هیدرولیز شد. محلول کراتین به دست آمده، توسط روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز به منظور کاهش اگریکاسیون مورد اصلاح ساختار شیمیایی قرار گرفت. حلالیت کراتین، درجه اصلاح شیمیایی، درصد پایداری، مقدار مول تیول آزاد و هم چنین DLS و FTIR نمونه ها بررسی شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد درجه اصلاح شیمیایی کراتین در روش آلکیلاسیون ۷۲ درصد و در روش سولفیدولیز با ۶۶ درصد بوده است. اصلاح شیمیایی کراتین هیدرولیز شده باعث کاهش اگریکاسیون در pH ۳ به میزان ۲۸۸/۶۵ درصد و ۳۳۵/۳ درصدی به ترتیب برای روش آلکیلاسیون و روش سولفیدولیز به دست آمده است. بررسی پایداری و حفظ محتوی پروتئینی نشان داد، کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون ۸۱/۹ درصد و کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز ۸۶/۳ درصد در طی ۳۰ روز پایدار بوده است. در صورتی که کراتین هیدرولیز شده به عنوان شاهد تنها ۹/۸ درصد از محتوای پروتئینی خود را حفظ کرده و پایداری داشته است. نتیجه تست DLS نمونه محلول کراتین اصلاح شده با روش آلکیلاسیون در آب، دارای  $PI=0/476$  و اندازه متوسط ذرات ۱۵۷/۳ نانومتر است، در نمونه کراتین اصلاح شده با روش سولفیدولیز در آب، مقدار  $PI=0/475$  و اندازه متوسط ذرات ۱۳۶/۲ نانومتر تعیین گردید، که نسبت به نمونه کراتین هیدرولیز شده با  $PI=0/552$  و اندازه متوسط ۹۹۰/۳ نانومتر، یکنواخت تر و پراکنده تر بوده است.

**نتیجه گیری:** اصلاح شیمیایی انجام شده بر روی کراتین هیدرولیز شده تغییری دائمی بوده و اتصال گروه های عاملی مورد انتظار باعث افزایش حلالیت کراتین در محیط های آبی و کاهش تجمع در pH اسیدی شده است. هم چنین نتایج آنالیز FTIR اصلاح شیمیایی کراتین را تأیید کرد.

**واژه های کلیدی:** کراتین پر مرغ، اصلاح شیمیایی، پایدار سازی، آلکیلاسیون پروتئین، سولفیدولیز پروتئین.

### مقدمه

جایگاه بیوتکنولوژی به عنوان یک مبنای تحقیق و توسعه دارویی تعیین شده است و داروهای جدید مبتنی بر پروتئین در طول دهه های آینده به سرعت در حال افزایش است (۱). علاوه بر صنعت دارو و مباحث درمانی، پروتئین ها در صنایع غذایی (۲)

### نویسنده مسئول:

گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی دانشکده شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران

پست الکترونیکی: s\_m\_robotjazi@mut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

سیستین و متیونین است (۲۰). برای افزایش حلالیت کراتین استخراج شده در حلال‌های آبی، رویکردهای مختلفی مطرح شده است که بیش‌تر آن‌ها شامل ایجاد تغییرهای شیمیایی در کراتین هستند (۲۱) از این تکنیک در صنایع داروسازی، غذا و خوراک و یا دیگر موارد صنعتی در سطوح پیچیده استفاده می‌شود (۲۲). از جمله تکنیک‌های ویژه‌ای که در سال‌های اخیر برای کمک به تحقیق و بهره‌برداری از ساختار پروتئین توسعه داده شده است، ایجاد تغییرهای شیمیایی در ساختار پروتئین است (۲۳). اصلاح شیمیایی پروتئین یک تکنیک حل مسئله در تحقیقات و فن‌آوری است (۲۴). اصلاح شیمیایی می‌تواند به‌طور طبیعی بدون دخالت نیز به مرور زمان انجام شود (۲۵) به‌طور کلی، این واکنش‌های اصلاحاتی به‌طور عمده روی زنجیره‌های جانبی انجام می‌شود مانند اکسیداسیون، احیا، جایگزینی نوکلئوفیلی<sup>۱</sup> و الکتروفیل<sup>۲</sup>. پروتئین‌ها به‌طور عمده برای مطالعه-های روابط ساختاری یا بهبود عملکرد و یا تولید محصول جدید، اصلاح می‌شوند (۲۶). گروه‌های سولفیدریل، واکنش‌پذیرترین گروه جانبی هستند که به‌طور معمول در پروتئین‌ها یافت می‌شوند، به‌همین علت در ابتدا، اصلاح شیمیایی بر روی این گروه اتفاق می‌افتد (۲۷). آلکیلاسیون سیستئین از قدیمی‌ترین و مرسوم‌ترین روش‌های اصلاح شیمیایی است (۲۸). در اصلاح شیمیایی سیستئین پس از کاهش به‌طور کلی همه گروه‌های تیول بسته می‌شود (۲۹) که در نتیجه باعث افزایش پایداری می‌گردد (۳۰). لذا اکسیداسیون سیستئین موجود در کراتین می‌تواند منجر به تولید یک مشتق از کراتین پایدارتر و محلول در آب شود (۳۱). سولفیدولیز یک روش خفیف برای باز کردن پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین است (۳۲). که برش دی-سولفیدها توسط یون‌های سولفیت منجر به تشکیل سولفونات می‌شود (۳۳) به‌طور کلی اصلاح شیمیایی پروتئین‌ها اغلب به منظور بهبود خواص عملکردی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۴).

با توجه به این‌که پر مرغ سر شار از کراتین است و حجم بالایی از ضایعات را به خود اختصاص داده است تولید محصول با ارزش افزوده بالا می‌تواند مهم واقع شود. پروتئین کراتین در آب نامحلول بوده و استفاده از آن را برای مصارف صنعتی و دارویی

آرایشی و بهداشتی (۳) کاربرد گسترده‌ای دارند، که پایداری و ثبات این پروتئین‌ها جهت استفاده و نگهداری حائز اهمیت است (۴) با این حال، حساسیت آن‌ها به تخریب شیمیایی و فیزیکی چالش‌هایی برای دانشمندان برای شکل‌گیری داروها به‌صورت پایدار به وجود آورده است (۱). در حال حاضر علاقه به تولید پروتئین‌ها از ضایعات در حال رشد است، که علاوه بر ارزش افزوده بالا، باعث کاهش منافع محیط زیستی را نیز به-دنبال دارد (۵). تحقیقات در خصوص تولید پروتئین‌ها افزایش یافته است اما در این بین به کراتین موجود در پر مرغ توجه بسیار کمی شده است (۶). سالانه ۸/۵ میلیون تن پر مرغ به-عنوان ضایعات کشتارگاهی در سراسر جهان تولید می‌شود (۷)، پر کمابیش از ۹۰ درصد پروتئین کراتین تشکیل شده است که می‌تواند در تهیه کرم‌های آرایشی، شامپو و مو استفاده شود (۸). کراتین هیدرولیز شده، جزئی از پروتئین کراتین است که وزن مولکولی پایین‌تری دارد و دارای خواص فیزیکی مناسب‌تری جهت استفاده در فرآورده‌های صنعتی است (۹) در طی هیدرولیز شیمیایی، هر دو نوع پیوندهای کراتین (دی‌سولفید و پپتید) شکسته می‌شود (۱۰) و ساختار کراتین هیدرولیز شده و ساختار پروتئین کراتین متفاوت است (۱۱). یک خصوصیت مهم کراتین تعداد زیاد پیوندهای دی‌سولفیدی در مقایسه با سایر پروتئین‌های ساختاری است (۱۲) در نتیجه به‌علت پهنای پیوند دی‌سولفیدی و مقدار زیاد اسید آمینه‌های هیدروفوبیک کراتین در حلال‌های قطبی مثل آب حل نمی‌شود (۱۳)، لذا برای استفاده از کراتین در کاربردهای صنعتی نیاز به تهیه محلول پایدار کراتین است (۱۴). بی‌ثباتی شیمیایی به تشکیل یا تخریب پیوندهای کووالانسی در مولکول پلی‌پپتید یا پروتئین مربوط می‌شود (۱۵). این تغییرهای ساختار اولیه پروتئین را دگرگون ساخته و سطح بالایی از ساختار آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶). ناپایداری‌های فیزیکی شامل تجمع، ته‌نشینی، چسبیدن به سطح و بازشدگی پروتئین است (۱۷). ناپایداری‌های شیمیایی نظیر شکستگی پیوند دی‌سولفید، ممکن است منجر به ناپایداری‌های فیزیکی شود (۱۸). کراتین استخراجی از پر، جرم مولکولی در حدود ۱۰ کیلو دالتون دارد که به‌علت وجود مقدار زیاد سیستئین پلی‌مره می‌شود و جرم مولکولی در حدود ۳۴ الی ۴۰ کیلو دالتون را به‌وجود می‌آورد (۱۹،۶). پر مرغ کمابیش حاوی ۷-۶ درصد آمینو اسیدهای

<sup>1</sup>-Nucleophilic Substitution

<sup>2</sup>-Electrophile

غیرممکن می‌سازد، لذا پایدارسازی کراتین در محیط‌های آبی به علت تجمع و از دست دادن محتوای پروتئینی بسیار پر اهمیت است، روش‌های متعددی جهت پایدارسازی وجود دارد که در این تحقیق اصلاح شیمیایی به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز بر روی کراتین هیدولیز شده همراه با بهینه‌سازی انجام شد، تأیید گروه‌های عاملی موردنظر، افزایش حلالیت، افزایش مقاومت در برابر عوامل ناپایدار کننده و کاهش تجمع پروتئینی از مهم‌ترین ارزیابی‌های بررسی شده این پژوهش است.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق پرسفید جوجه گوشتی ضایعات کشتارگاهی طیور از شرکت اتکا، ۲- مرکاپتوتانول از سیگما، معرف المن از مرک، آنزیم آلکالاز از شرکت نووآنزیم دانمارک، یدواستیک اسید از شرکت مرک، سدیم سولفیت از مرک تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی دیگری استفاده شده، با خلوص بالا از شرکت‌های مرک، سیگما-الدریج خریداری شده است.

### تهیه محلول کراتین هیدولیز شده

استخراج کراتین از پر مرغ توسط ۲۵ میلی‌لیتر سود ۰/۲ مولار به ازای هر گرم پر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. سپس کراتین استخراج شده توسط (V/V) ۸ درصد آنزیم آلکالاز صنعتی به حجم محلول کراتین استخراجی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت در pH برابر ۸ هیدرولیز شد، افت pH با سود ۰/۳ مولار جبران شد. سپس

جدول ۱: سطح‌بندی و عوامل مؤثر در واکنش اصلاح شیمیایی کراتین هیدرولیز شده به روش آلکیلاسیون

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
یدواستیک اسید/سیستئین	۱	۲	۴
pH	۸	۹	۱۰
دما (درجه سانتی‌گراد)	۴	۲۵	۴۵
زمان (دقیقه)	۱۵	۴۵	۹۰

جدول ۲: آزمایش‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار تاگوچی جهت بهینه‌سازی روش آلکیلاسیون

شماره آزمایش	عامل			
	زمان	دما	pH	یدواستیک اسید/سیستئین
۱	۱	۲	۱	۱
۲	۲	۱	۲	۱
۳	۳	۲	۳	۱
۴	۳	۱	۱	۲
۵	۱	۳	۲	۲

محلول کراتین هیدولیز شده در مقابل آب مقطر ۲۴ ساعت دیالیز شد. درجه هیدرولیز توسط روش pH-stat (۳۵) و سایز کراتین هیدرولیز شده توسط روش SDS-Page تعیین شد (۳۶).

### اصلاح شیمیایی محلول کراتین هیدولیز شده

در این پژوهش اصلاح شیمیایی بر روی کراتین هیدرولیز شده پر مرغ به دو روش شیمیایی به شرح زیر انجام و نتایج با یکدیگر مقایسه شد.

### الف: اصلاح شیمیایی کراتین هیدولیز شده به روش آلکیلاسیون

اصلاح شیمیایی به روش آلکیلاسیون بر اساس روش crestfield انجام شد (۳۷). عوامل تأثیرگذار شامل دما، نسبت غلظت یدواستیک اسید به مقدار سیستئین موجود در کراتین، pH و زمان واکنش توسط نرم‌افزار تاگوچی (Qualitek 4) در ۴ عامل و ۳ سطح توسط ۹ آزمایش بهینه‌سازی شد (طبق جدول ۱ و ۲). بدین‌منظور در هر آزمایش از ۱۵ میلی‌لیتر محلول کراتین هیدولیز شده با غلظت معین در تمام آزمایش‌ها استفاده شد. به علت حساسیت مواد استفاده شده، واکنش در تاریکی و زیر هود شیمیایی تا رسیدن به محلول کربوکسی متیل کراتین ادامه یافت. در مدت زمان انجام واکنش pH کنترل شد و افت آن توسط محلول سود ۳ مولار جبران شد و محلول توسط هم-زن مغناطیسی یکنواخت گردید.

۲	۳	۲	۲	۶
۳	۱	۳	۲	۷
۳	۲	۲	۳	۸
۳	۳	۱	۱	۹

آزمایش از ۱۵ میلی لیتر محلول کراتین هیدولیز شده با غلظت ثابت در تمام آزمایش‌ها استفاده شد. بافر سدیم سولفیت اضافه شد و ۱ ساعت در شیکر قرار داده شد. دمای شیکر و حجم بافر سولفیت طبق جدول ۳ و ۴ تعیین شد. سپس بافر اوره-تریس با pH/۵ و ۲- مرکاپتواتانول ۰/۷ مولار اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر قرار داده شد.

### ب: اصلاح شیمیایی کراتین هیدولیز شده به روش سولفیدولیز

اصلاح شیمیایی ملایم باندهای دی‌سولفیدی به روش سولفیدولیز انجام شد (۳۸). عوامل تأثیرگذار در این روش شامل دما و نسبت حجم بافر سولفیت به سیستمین موجود در پروتئین توسط نرم‌افزار تاگوچی در ۲ عامل و ۳ سطح توسط ۹ آزمایش بهینه‌سازی شد (طبق جدول ۴ و ۳). بدین منظور در هر

جدول ۳: سطح‌بندی و عوامل مؤثر در واکنش اصلاح شیمیایی کراتین هیدولیز شده به روش سولفیدولیز

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دما (درجه سانتی‌گراد)	۴	۲۵	۳۵
حجم بافر سولفیت / سیستمین	۰/۵	۱	۲

به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز و هم‌چنین محلول کراتین هیدولیز شده به‌عنوان شاهد انجام شد.

تست‌های تأییدی فقط بر روی نمونه‌های لیوفلیز شده نقاط بهینه به دست آمده نرم‌افزار تاگوچی برای کراتین اصلاح شده

جدول ۴: آزمایش‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار تاگوچی جهت بهینه‌سازی روش سولفیدولیز

شماره آزمایش	عامل	
	دما	حجم بافر سولفیت / سیستمین
۱	۱	۱
۲	۱	۲
۳	۱	۳
۴	۲	۱
۵	۲	۲
۶	۲	۳
۷	۳	۱
۸	۳	۲
۹	۳	۳

برابر با ۱ سانتی‌متر است، E برابر است با  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  و c برابر است با غلظت تیول آزاد در نمونه.

$$c = \frac{A}{bE}$$

فرمول ۱

### کدورت سنجی

مقدار کدورت محلول کراتین اصلاح شده در هر مرحله بعد از اصلاح شیمیایی به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز توسط

### اندازه‌گیری مقدار گروه تیول آزاد

اندازه‌گیری گروه تیول آزاد توسط معرف المن انجام شد (۳۹). سپس جذب نمونه در ۴۱۲ nm خوانده شد. میزان و غلظت سولفیدولیز در هر نمونه از ضریب جذب مولی TNB با مقدار  $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ۱۴۱۵۰ با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه شد (۴۰). A برابر است با مقدار جذب در طول موج ۴۱۲ nm، b طول مسیر که

دستگاه اسپکتوفتومتر (JENWAY-model 6310-UK) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (۴۱).

#### FTIR

تست FTIR برای نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز و کراتین هیدولیز شده به عنوان نمونه اصلاح نشده به منظور تأیید گروه‌های عاملی (۴۲) توسط دستگاه FTIR (THERMO- model AVATAR-USA) در دامنه طول موج ۴۵۰ تا ۴۰۰۰ انجام گردید.

#### تعیین اندازه کراتین هیدرولیز شده

در این پژوهش برای تأیید اندازه سایز پروتئین آنالیز SDS-PAGE با ژل بالای ۵ درصد و ژل پایین ۱۴/۵ درصد استفاده شد.

#### DLS

روش پراکندگی دینامیکی نور یکی از روش‌های مناسب برای تعیین توزیع ابعاد ذرات و تعیین تجمع در محلول‌های پروتئینی است (۴۳) در این پژوهش هدف از انجام تست DLS تعیین ابعاد ذرات و مقدار پراکندگی نمونه‌ها در محلول آبی است. این آنالیز در پژوهشگاه رنگ تهران توسط دستگاه DLS (HORIBA- model SZ-10- Japan) انجام شد.

#### اندازه‌گیری حلالیت در آب

جهت بررسی مقدار حلالیت کراتین اصلاح شده در آب مقادیر ۰/۰۰۱ الی ۰/۱ از گرم کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز توزین شد در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. محلول ورنکس شد و مقدار کدورت آن در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### بررسی پایداری حلالیت کراتین اصلاح شده

کراتین اصلاح شده توسط روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز طی سه دسته آزمایش (مقاومت در برابر pH، مقاومت در برابر نیروی گریز از مرکز و مدت زمان پایداری) جهت بررسی مقاومت در برابر تشکیل توده‌های پروتئینی و ایجاد رسوب، عوامل ناپایدار کننده در محیط مانند تغییرها و نوسان‌ها pH و هم‌چنین مدت زمان یکنواختی محلول کراتینی و حفظ محتوای پروتئینی انجام شد.

تغییر pH باعث ایجاد شرایط تنش‌زا برای پروتئین می‌شود که بررسی رفتار و مقاومت پروتئین اصلاح شده در برابر این شرایط بررسی شد. نمونه کراتین هیدرولیز شده به عنوان شاهد نمونه‌های اصلاح شده (به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز) قرار داده شد. در ابتدا کدورت نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر و غلظت نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. سپس یک بازه pH انتخاب شد. در این قسمت از پژوهش بازه pH از ۳ الی ۱۰ انتخاب شد و به صورت مرحله‌ای pH نمونه‌ها کاهش داده شد، و در هر مرحله به خوبی همزده شده و کدورت نمونه‌ها دوباره در ۵۴۰ نانومتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خوانده شد. جهت بررسی پایداری، مقدار کدورت نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز به صورت روزانه تا ۳۰ روز در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

#### درصد اصلاح شیمیایی

مقدار گروه تیول آزاد در سیستمین باقی مانده از اصلاح کراتین پر به وسیله معرف المن تعیین می‌شود از این رو مقدار اصلاح شده و مقدار اصلاح نشده کراتین را به درصدی به عنوان درجه اصلاح جهت مشخص کردن مقدار باندهای دی‌سولفیدی می‌توان گزارش کرد. طبق فرمول ۲ درجه اصلاح محاسبه می‌شود (۴۴). طبق فرمول ۲ درجه اصلاح محاسبه گردید.

$$\text{فرمول ۲} \quad \frac{S_{un\ mod} - S_{mod}}{S_{un}} \times 100$$

مقدار  $S_{un\ mod}$  نشان‌دهنده مقدار اصلاح نشده برای کراتین که کمابیش ۳۵۰ میکرومول به‌ازای واحد گرم است. مقدار  $S_{mod}$  نشان‌دهنده مقدار محاسبه شده باندهای دی‌سولفیدی با استفاده از معرف المن است.

#### یافته‌ها

کراتین موجود در پر مرغ کشتارگاهی در محلول سود ۰/۲ مولار با راندمان ۶۹/۸ درصد استخراج شد. درجه هیدرولیز با استفاده از آنزیم آلکالاز ۲۱ درصد توسط روش pH-stat تعیین گردید. مقدار متوسط نتایج آزمایش‌های بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون در جدول ۵ آمده است. جدول تحلیل نتایج آنوا به دست آمده بر اساس روش تاگوچی برای

بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون در جدول ۶ آمده است.

جدول ۵: نتایج به دست آمده از آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون

شماره آزمایش	مقدار متوسط جذب <sup>۳</sup>
۱	۰/۳۰۲
۲	۰/۳۲۵
۳	۰/۱۹۱
۴	۰/۲۴۷
۵	۰/۲۰۲
۶	۰/۱۳۱
۷	۰/۲۷۱
۸	۰/۱۳۰
۹	۰/۲۰۹

جدول ۶: تحلیل نتایج آنوا آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون

ردیف	عوامل	DOF (f)	مجموع مربعات (s)	واریانس (v)	نسبت F (F)	جمع خالص (s)	درصد %
۱	نسبت یداستیک اسید/ سیستین	۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵	-	۰/۰۱	۲۶/۸۹۶
۲	pH	۲	۰/۰۱۳	۰/۰۰۶	-	۰/۰۱۳	۳۶/۷۰۲
۳	دما	۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	-	۰/۰۰۷	۲۰/۹۴۲
۴	زمان	۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	-	۰/۰۰۵	۱۵/۱۹۴
۵	کل	۸	۰/۰۳۷	-	-	-	٪۱۰۰

جدول ۷: نقاط بهینه و نتیجه قابل انتظار از آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون

ردیف	عوامل	توضیحات سطح	سطح
۱	نسبت یداستیک اسید/ سیستین	۲	۲
۲	pH	۱۰	۳
۳	دما	۴	۱
۴	زمان	۹۰	۳
۰/۲۲۵	میانگین عالی عملکرد فعلی		
۰/۰۸۶	نتیجه قابل انتظار از نقطه بهینه		

طبق جدول ۷ در شرایط بهینه دمای ۴ درجه سانتی گراد، نسبت ۲ برابر یدواستیک اسید به سیستئین موجود در پر، pH برابر با ۱۰ و زمان ۹۰ دقیقه به S-کراتین کربوکسی متیل تبدیل می شود. تأثیر عوامل تأثیرگذار در بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش آلکیلاسیون pH با ۳۶/۷۰۲ درصد بیشترین تأثیر و به ترتیب نسبت یدواستیک اسید/ سیستئین با ۲۶/۸۹۶ درصد سپس دما با ۲۰/۹۴۲ درصد و در انتها زمان واکنش

۱۵/۱۹۴ درصد در جدول ۶ عنوان شد. مقدار تیول های آزاد توسط معرف المن با روش رنگ سنجی  $10^{-5}$  مول اندازه گیری شد و طبق فرمول شماره ۲ درجه اصلاح کراتین هیدولیز شده با روش آلکیلاسیون ۷۲ درصد را نشان داد. مقدار متوسط نتایج در آزمایش های بهینه سازی به روش سولفیدولیز در جدول ۸ آمده است. نتایج آنالیز داده و آنوا به دست آمده بر اساس روش تاگوچی در جدول ۹ آمده است.

جدول ۸: نتایج به دست آمده از آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش سولفیدولیز

شماره آزمایش	مقدار متوسط جذب
۱	۰/۸۶۴
۲	۰/۷۹۴
۳	۰/۶۱۵
۴	۰/۳۸۷
۵	۰/۴۰۲
۶	۰/۲۶۱
۷	۰/۳۳۳
۸	۰/۲۷۹
۹	۰/۳

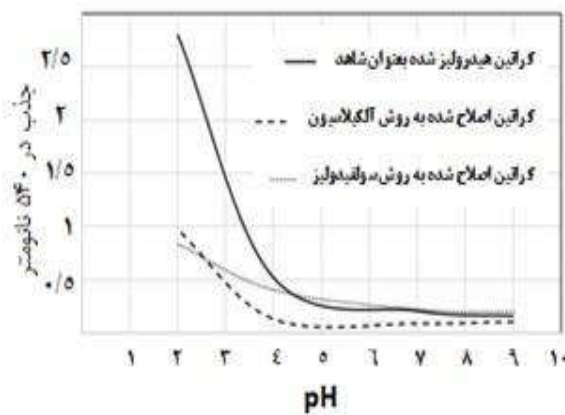
جدول ۹: تحلیل نتایج آنوا آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش سولفیدولیز

ردیف	عوامل	DOF (f)	مجموع مربعات (S)	واریانس (V)	نسبت F (F)	جمع خالص (S')	درصد %
۱	دما	۲	۰/۳۷۴	۰/۱۸۷	۰/۸۷۶	۰/۳۶۵	۸۷/۹۶۷
۲	نسبت بافر سولفیت به کراتین	۲	۰/۰۲۹	۰/۰۱۴	۳/۵۶۱	۰/۰۲۱	۵/۰۸۷
	خطا	۴	۰/۰۱۶	۰/۰۰۴			۷/۹۴۶
	کل	۸	۰/۴۲				۱۰۰

جدول ۱۰: نقاط بهینه و نتیجه قابل انتظار از آزمایش های طراحی شده توسط نرم افزار تاگوچی برای بهینه سازی اصلاح شیمیایی کراتین به روش سولفیدولیز

ردیف	عوامل	توضیحات سطح	سطح
۱	دما	۳۵	۳
۲	نسبت بافر به سیستئین	۲	۳

محاسبه شده طبق فرمول ۲ در این روش ۶۶ درصد بوده است. بررسی پایداری انجام شده بر روی کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز در مقایسه با کراتین هیدولیز شده همان طور که در نمودار ۱ نشان داد که S- سولفوسیستئین کراتین تولید شده به روش سولفیدولیز در pH برابر با ۳، ۳۳۵/۳ درصد نسبت به نمونه کراتین هیدرولیز شده به عنوان شاهد پایدارتر است. هم چنین پایداری بررسی شده S-کراتین کربوکسی متیل تولید شده در روش آلکیلاسیون در نمودار ۱ نشان داد که مقاومت در برابر رسوب دهی و پایداری حلالیت پروتئین به طوری است که در pH برابر با ۳، ۲۸۸/۶۵ درصد نسبت به نمونه شاهد خود پایدارتر است.



نمودار ۱: مقایسه پایداری انجام شده کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز با کراتین هیدرولیز شده در pH های متفاوت

هیدولیز شده به عنوان شاهد تنها ۹/۸ درصد در طی ۳۰ روز محتوای پروتئینی خود را حفظ کرده است. هم چنین این بررسی با اندازه گیری مقدار پروتئین موجود در محلول توسط معرف بیورت نیز تأیید شد.

در میان ویژگی های عملکردی پروتئین ها، حلالیت یکی از مهم ترین و اساسی ترین آن ها است که بر روی کاربرد آن در فرمولاسیون تأثیر دارد. حلالیت نمونه S- سولفوسیستئین کراتین و S-کراتین کربوکسی متیل در آب مقطر در دمای اتاق با اندازه گیری مقدار کدورت در ۵۴۰ نانومتر انجام شد که هر دو نمونه با شاهد آب مقطر سنجیده شد و نتایج طبق نمودار ستونی ۳ نشان داد که هر دو نمونه تا غلظت ۱۰۰ g/l حلالیت داشته و دارای مقدار حدودی جذب ۰/۱ بوده اند، که نشان دهنده حلالیت

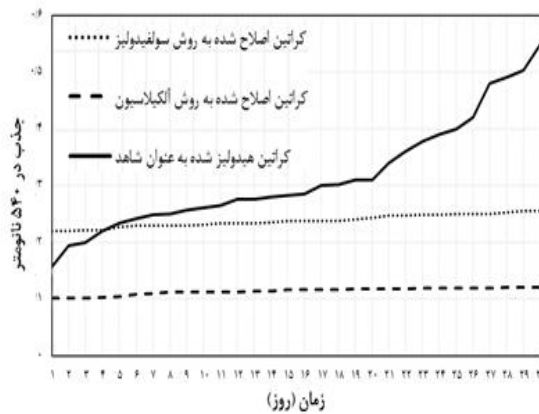
طبق جدول ۹ آنالیز نتایج توسط نرم افزار تاگوچی نشان داد که دما بیشترین تأثیر در اصلاح شیمیایی به روش سولفیدولیز را با ۸۷ درصد و نسبت بافر سدیم سولفیت به سیستم کمترین تأثیر را با ۵/۰۸۷ درصد دارد که نشان دهنده تأثیر بسزای دما در افزایش فعالیت برش توسط بافر است. همان طور که در جدول ۱۰ مشاهده می شود در اصلاح شیمیایی بر روی کراتین هیدولیز شده پر مرغ کشتارگاهی با روش سولفیدولیز نقاط بهینه داده شده توسط نرم افزار تاگوچی دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و نسبت دو برابر بافر سولفیت واکنش دهنده به مقدار سیستم موجود بوده است. در این روش طبق محاسبات مقدار تیول آزاد محاسبه شده توسط معرف المن  $10^{-1} \times 12/02$  مول بوده و درجه اصلاح

بررسی زمان پایداری با هدف به دست آوردن مدت زمانی که کراتین های اصلاح شده توانایی حفظ محتوای پروتئینی را دارند، میانگین عالی عملکرد فعلی ۰/۴۷۵ نتیجه قابل انتظار از نقطه ی بهینه ۰/۲۴۱

با بررسی مقدار کدورت با روش اندازه گیری جذب توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در ۵۴۰ نانومتر انجام شد. کراتین هیدولیز شده به عنوان معیار مقایسه قرار گرفت. نتایج در نمودار ۲ آمده است. تحلیل نمودار ۲ نشان داد که S-کراتین کربوکسی متیل تولید شده در روش آلکیلاسیون در طی مدت زمان ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد دارای ۸۱/۱۹ درصد و S- سولفوسیستئین کراتین، (کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز) دارای ۸۶/۳ درصد پایداری داشته است، در صورتی که کراتین

پراکندگی نور از ذرات و حرکت ذرات باعث نوسانات تعداد فوتون در آشکارساز می شود.

این دو ماده در آب است و محلول یکنواخت ایجاد شده است. آزمایش DLS یک روش ایده آل برای اندازه گیری اندازه ذرات معلق از ۱ نانومتر به حدود ۱۰ میکرومتر (بسته به چگالی ذرات) است.



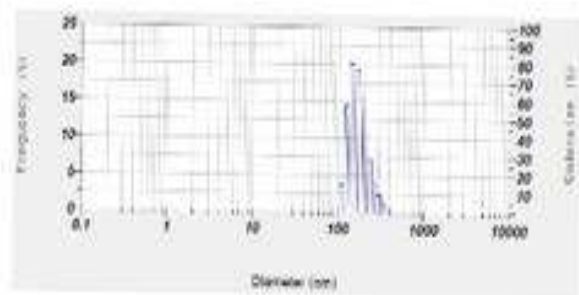
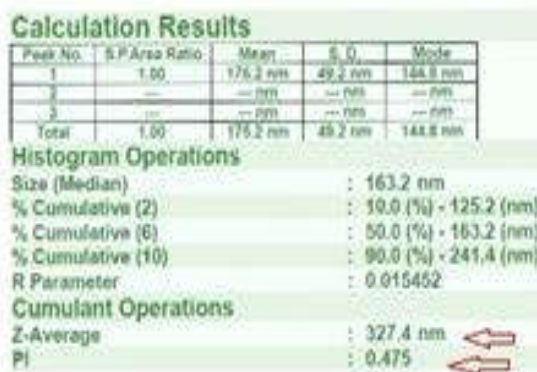
نمودار ۲: بررسی مدت زمان پایداری کراتین اصلاح شده به روش آلکیلایسیون و کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز در مقایسه با کراتین هیدولیز شده از طریق اندازه گیری مقدار کدورت ایجاد شده و خواندن جذب نمونه ها در ۵۴۰ نانومتر در طی ۳۰ روز و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

هدف از انجام تست FTIR در این پژوهش تأیید گروه های عاملی است که انتظار می رود در طی انجام واکنش ها بر روی پروتئین ها منتقل شده باشد، نتایج در نمودار ۴ نشان می دهد که پیک های شاخص در طیف FTIR پروتئین ها مربوط به پیوندهای پپتیدی می باشد. پیوندهای پپتیدی اصلی ترین واحد ساختاری در زنجیر پلی پپتیدی است. در نمونه های FTIR گرفته شده در هر سه جواب شاهد پیک  $3720 \text{ cm}^{-1}$  الی  $3764$  هستیم که نشان دهنده O-H آزاد و مربوط به آب موجود در نمونه ها است. از  $3100$  الی  $3500$  نشان دهنده پیوند N-N است که در هر سه نمونه کراتین موجود است و نشان دهنده پیوند پپتیدی است. در نمونه هیدرولیز شده طیف وسیع تری از گروه های آمینی مشخص است به صورت جزئی تر پیک  $3220 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به پیوند N-H درون مولکولی و  $3351 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به آمین نوع دوم، است. پیک تقریبی  $2900 \text{ cm}^{-1}$  در هر سه نمونه نشان دهنده پیوند C-H در آلکان ها است که در تست هیدرولیز شده این پیک تیزتر است (۴۵) ارتعاشات در پیوندهای  $C = N$  و  $C = C$  در منطقه عمومی بین  $1300 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  رخ می دهد. جذب شامل کشش و انقباض تمام پیوندهای و تعامل بین این حالت های کششی است. این محدوده در هر سه نمونه به خوبی قابل مشاهده

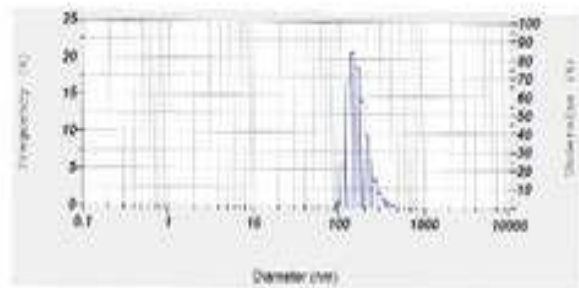
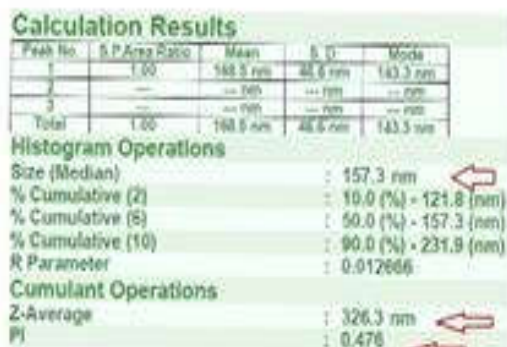
با توجه به جواب نتیجه تست DLS نمایش داده شده در نمودار شماره ۳، نمونه کراتین هیدرولیز شده محلول در سود رقیق دارای PI برابر با  $0/552$  و میانگین وزنی قطر  $2090/5$  نانومتر و اندازه متوسط ذرات  $990/3$  نانومتر است، S-کراتین کربوکسی-متیل محلول در آب مقطر دارای PI برابر با  $0/476$  و میانگین وزنی قطر  $326/3$  نانومتر و دارای اندازه متوسط ذرات  $157/3$  نانومتر است. در نمونه S-سولفوسیتئین کراتین محلول در آب مقطر دارای مقدار PI برابر با  $0/475$  و میانگین وزنی قطر  $327/4$  نانومتر و اندازه متوسط ذرات  $136/2$  نانومتر است. نتایج تست DLS نشان داد که کراتین های اصلاح شده دارای اندازه متوسط ذرات کوچکتری نسبت به نمونه کراتین هیدرولیز شده هستند. مقایسه PI نشان داد که هر دو محلول اصلاح شده دارای پراکندگی یکنواخت تری نسبت به نمونه کراتین هیدرولیز شده است. هم چنین میانگین وزنی قطر S-کراتین کربوکسی متیل و S-سولفوسیتئین کراتین تقریباً یکسان بوده و بسیار کوچک تر از نمونه کراتین هیدرولیز شده است که پراکندگی مناسب ذرات برخوردار هستند.

نمونه کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز تیزتر است. پیک  $1643\text{ cm}^{-1}$  مربوط به وجود پیوند C-N در آمیدها است. پیک  $1690\text{ cm}^{-1}$  در نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلسیون و همچنین نمونه کراتین اصلاح شده سولفیدولیز مشاهده می شود که مربوط به پیوندهای C=O موجود در آمیدها است که در

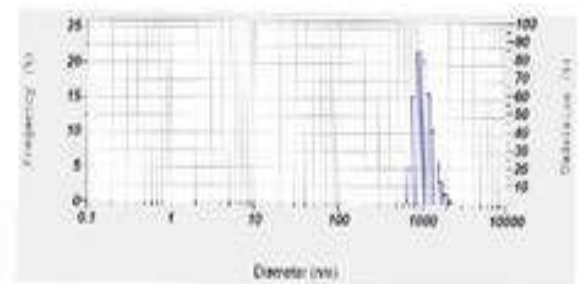
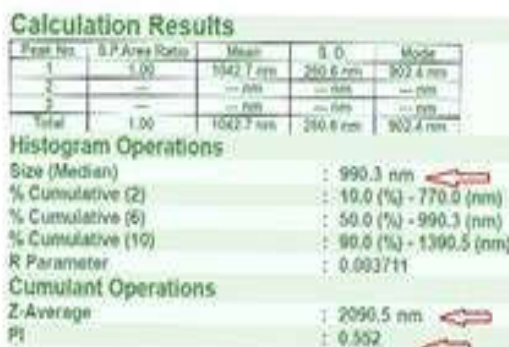
نمونه کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز تیزتر است. پیک  $1643\text{ cm}^{-1}$  مربوط به وجود پیوند C-N در آمیدها است. پیک  $1690\text{ cm}^{-1}$  در نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلسیون و همچنین نمونه کراتین اصلاح شده سولفیدولیز مشاهده می شود که مربوط به پیوندهای C=O موجود در آمیدها است که در



نمونه کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز

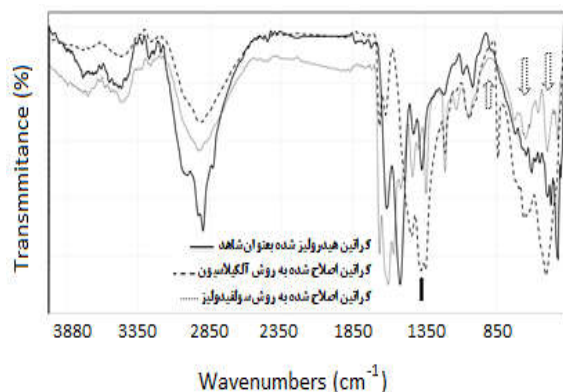


نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلسیون



نمونه کراتین هیدرولیز شده

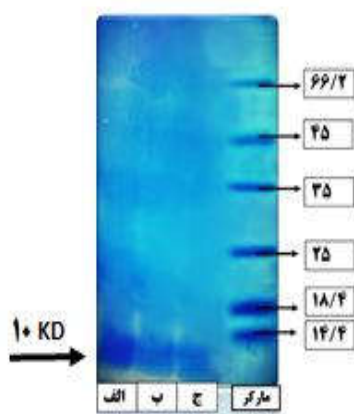
نمودار ۳: نتایج DLS کراتین اصلاح شده به روش آلکیلسیون، سولفیدولیز و کراتین هیدرولیز شده



نمودار ۴: نتایج آنالیز FTIR کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز در مقایسه با کراتین هیدولیز شده

و  $540-500 \text{ cm}^{-1}$  پیوند S-S دچار هم‌پوشانی شده و پیک تیزتر از نمونه کراتین هیدرولیز شده و کراتین اصلاح شده با روش سولفیدولیز است. در پیک‌های  $1067 \text{ cm}^{-1}$  گروه S=O و در  $158 \text{ cm}^{-1}$  گروه سولفات در نمونه اصلاح شده به روش سولفیدولیز به‌طور کامل مشهود است و در  $676$  نیز وجود یون سولفات مشخص است در  $451 \text{ cm}^{-1}$  آریل سولفیدها هم‌چنین در  $751 \text{ cm}^{-1}$  S-O و C=C دارای هم‌پوشانی است (نقاط مشخص شده توسط فلش با نقطه‌چین‌های ریز) از این‌رو اصلاح گروه‌های دی‌سولفیدی در کراتین با روش سولفیدولیز نیز انجام شده و گروه‌های عاملی در پیک FTIR به‌طور کامل مشخص است (۴۷،۴۶).

پیوند C=O نیز گواه این ادعا است که در اصلاح شیمیایی کراتین هیدرولیز شده به روش آلکیلاسیون گروه کربوکسیک اسید به-درستی جایگزین شده و باعث بهبود شرایط کراتین شده است. در کراتین هیدرولیز شده و کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز نیز پیک‌های گروه کربوکسی نیز موجود است اما با قله‌های کوتاه که به علت وجود اسیدهای آمینه موجود در توالی پروتئین است. پیک  $705-570$  حاکی از وجود C-S و در  $1030-1060 \text{ cm}^{-1}$  وجود S=O و  $1050-1200 \text{ cm}^{-1}$  همگی در کراتین هیدرولیز شده موجود است، هم‌چنین وجود  $450-550 \text{ cm}^{-1}$  وجود پیوندهای دی‌سولفیدی است. که در نمونه هیدرولیز شده به‌خوبی قابل مشاهده است. در پیک  $531 \text{ cm}^{-1}$  وجود پیوند C-I



شکل ۱: ژل الکتروفورز ۱۴/۵ درصد انجام شده برای سه نمونه کراتین اصلاح شده به روش آلکیلاسیون (ج)، کراتین اصلاح شده به روش سولفیدولیز (الف) و کراتین هیدولیز شده (ب)

هیدرولیز شده یک اسمیر با بازه زیر  $5000$  دالتون را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده هیدولیزاسیون صورت گرفته است. هم-

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ژل الکتروفورز ۱۴/۵ درصد انجام شده نشان داد که نمونه کراتین استخراجی دارای

سولفیدولیز نیز دارای چنین اسمیر با بازه ۵۰۰۰ دالتون هستند، که پروتئین کراتین و سائز آن را تأیید می‌کند.

## بحث

اصلاح شیمیایی با استفاده از کربوکسی‌هالیدها از دیرباز مورد توجه بوده‌است. ید بهترین گروه ترک کننده در واکنش‌های جانیشینی است و روش آلکیلاسیون با یدواستیک‌اسید باعث انتقال بار منفی، و تولید S-کراتین کربوکسی متیل می‌شود که در محیط‌های اسید دارای پایداری بهتری نسبت به نمونه کراتین هیدرولیز شده به‌عنوان شاهد است. نتایج تاگوچی نشان داد که هرچه واکنش آلکیلاسیون در pH محیط بازی به سمت باز قوی انجام شود احتمال راندمان کیفیت بالاتر محصول تولید شده وجود دارد، اما با توجه به این که محیط‌های بازی قوی احتمال تخریب اسید آمینه‌ها و هیدولیز شیمیایی را افزایش می‌دهد بنابراین در حداکثر pH ممکن واکنش آلکیلاسیون انجام شد. Schrooye و همکاران در سال ۲۰۰۰ کراتین را توسط اوره و ۲- مرکاپتواتانول استخراج و اصلاح شیمیایی را با روش آلکیلاسیون توسط سه ماده یدواستامید، یدواستیک اسید و برموسوکسینیک اسید بررسی و مقایسه کردند و توانستند برای تهیه فیلم با محلول اوره ۸ مولار، EDTA، تریس و ۲- مرکاپتواتانول به اصلاح ۸۰ درصد برای اصلاح با یدواستیک‌اسید و یداستامید و ۴۰ درصد اصلاح با برموسوکسینیک‌اسید به دست آوردند (۳۱). هم‌چنین Schrooyen و همکاران در سال ۲۰۰۱ کراتین استخراج شده توسط اوره و ۲- مرکاپتواتانول را که توسط یدواستیک اسید اصلاح شیمیایی کرده بودند به علت عدم پایداری از سدیم دودسیل‌سولفات جهت برقراری پایداری استفاده کردند (۶). هم‌چنین Crestfield و همکاران در سال ۱۹۶۳ اصلاح شیمیایی و تولید پروتئین کربوکسی متیلاسیون شده را بررسی کردند (۳۷). در این تحقیق با توجه به روش کم هزینه‌تر استخراج و هم‌چنین هیدرولیز پروتئین روش اصلاح شیمیایی ملایم‌تر و کامل‌تر انجام شد و اصلاح شیمیایی پروتئین جهت تولید کربوکسی متیل کراتین در محیطی با قدرت یونی پایین‌تری صورت گرفت. کراتین دارای پیوندهای دی‌سولفیدی است که در اصلاح شیمیایی با روش سولفیدولیز باعث کاهش پیوندهای دی‌سولفیدی و سیستمین‌های موجود در کراتین به S- سولفوسیتئین تبدیل می‌شود که در محیط‌های خنثی و متمایل

به محیط اسیدی ضعیف بیش‌ترین پایداری را دارد. Rajabinejad و همکاران در سال ۲۰۱۸ سولفیدولیز را تنها برای استخراج کراتین از پشم توسط اوره و سدیم متابی سولفیت همراه با روش اکسایشی و کاهشی بررسی کردند و توانستند به ۳۲ درصد راندمان استخراج برسند اما پایداری را بررسی نشده است (۴۴). روش سولفیدولیز برای اصلاح باندهای دی‌سولفیدی و افزایش پایداری تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بود در این تحقیق در مقایسه با روش آلکیلاسیون شرایط کمابیش برابری را از خود نشان داد. Ikkai و همکاران در سال ۲۰۰۱ کراتین کربوکسی متیل شده را در تیوگلیکولیک‌اسید حل کرده و همراه با محلول اوره و پتاس به صورت محلول درآورده و جهت بررسی توالی ساختمان دوم CD و SLS/DLS آن‌ها بررسی شد (۴۸) اما در این تحقیق بررسی تست فقط جهت بررسی پراکندگی ذرات و به‌عنوان معیاری برای میزان تجمع و حلالیت استفاده شد.

## نتیجه‌گیری

داروها و محصولات جدید مبتنی بر پروتئین در طول دهه آینده هزاره جدید به سرعت در حال افزایش است. علاوه بر صنعت دارو و مباحث درمانی پروتئین‌ها در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی کاربرد گسترده‌ای دارند. پایداری و ثبات این پروتئین‌ها جهت استفاده و نگهداری حائز اهمیت است. کراتین نوعی پروتئین ساختاری است که استفاده بالایی در صنایع غذایی و آرایشی بهداشتی دارد که در آب نامحلول بوده و ناپایدار است. وزن کراتین در استخراج قلیایی توسط سدیم‌هیدروکسید حدود ۱۰/۵ کیلودالتون است که جهت دستیابی به سائز پایین‌تر از هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم صنعتی الکالاز انجام شد. کراتین هیدرولیز شده وزنی کم‌تر از ۵۰۰۰ دالتون دارد اما تمایل بالا به تجمع و تشکیل رسوب از مشکلات کراتین هیدرولیز شده است. از این رو اصلاح شیمیایی به‌عنوان روشی برای بهبود عملکرد کراتین هیدولیز شده استفاده شد که توسط دو روش آلکیلاسیون و سولفیدولیز مورد بررسی قرار گرفت، که روش آلکیلاسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۲ برابر یدواستیک‌اسید به مقدار سیستمین موجود، در pH برابر ۱۰ و زمان ۹۰ دقیقه انجام شد و اصلاح شیمیایی با روش سولفیدولیز در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و مقدار دو برابر بافر سولفیت به مقدار سیستمین محلول انجام شد. اصلاح شیمیایی یک تغییر دائمی است اما اصلاح

شیمیایی انجام شده بر روی وزن مولکولی تأثیر نداشته و SDS-Page نشان داد وزن مولکولی کراتین هیدرولیز شده، S-کراتین کربوکسی متیل و S- سولفوسیسستین کراتین با هم برابرند. نمونه کراتین اصلاح شده با روش آلکیلاسیون دارای درجه اصلاح ۷۲ درصد و در روش سولفیدولیز با درجه اصلاح ۶۶ درصد انجام شد. هم‌چنین بررسی پایداری نشان داد که S-کراتین کربوکسی متیل در pH برابر با ۳، ۲۸۸/۶۵ درصد نسبت به نمونه کراتین هیدولیز شده و S- سولفوسیسستین کراتین در pH برابر با ۳، ۳۳۵/۳ درصد نسبت به نمونه کراتین هیدولیز شده پایدارتر است. هم‌چنین S-کراتین کربوکسی متیل ۸۱/۱۹ درصد و S- سولفوسیسستین کراتین ۸۶/۳ درصد در طی ۳۰ روز محتوای پروتئینی خود را حفظ کرده و دارای حلالیت بیش‌تر بوده‌اند. با توجه به نتایج DLS پراکندگی ذرات در دو روش سولفیدولیز و آلکیلاسیون به ترتیب ۰/۴۷۵ و ۰/۴۷۶، دارای اندازه متوسط ذرات به ترتیب ۱۳۶/۲ و ۱۵۷/۳ نانومتر است در مقابل کراتین هیدولیز شده با پراکندگی ذرات ۰/۵۵۲ و اندازه متوسط ۹۹۰/۳ نانومتر. کم‌تر بودن پراکندگی ذرات نشان‌دهنده مهار فرآیند آگریگاسیون و تجمع ذرات پروتئین در نمونه‌های اصلاح شده است. نتایج FTIR نشان‌دهنده وجود گروه‌های عاملی قابل انتظار در هر دو روش اصلاح شیمیایی است. هم‌چنین بررسی حلالیت حاکی از حلالیت S-کراتین کربوکسی متیل و S- سولفوسیسستین کراتین در آب تا غلظت ۱۰۰g/l در دمای محیط است. پیشنهاد می‌شود که بر روی کراتین پایدار شده تست‌های حساسیت انسانی به‌منظور استفاده در مواد آرایشی بهداشتی انجام شود.

## سپاسگزاری

نویسندگان از کلیه همکاران و مسئول آزمایشگاه بیوتکنولوژی که در انجام این تحقیق همکاری کردند و هم‌چنین از پژوهشگاه رنگ تهران، جهت انجام تست‌های تکمیلی این پژوهش کمال تشکر را دارند.

1. Jacob S, Shirwaikar A, Srinivasan K, Alex J, Prabu S, Mahalaxmi R, et al. Stability of proteins in aqueous solution and solid state. *Indian J. Pharm. Sci.* 2006 68(2).
2. e Silva ACS, Silveira JN. Correlation between the degree of hydrolysis and the peptide profile of whey protein concentrate hydrolysates: effect of the enzyme type and reaction time. *Am J Food Technol.* 2013 8(1):1-16.
3. Mokrejš P, Hut'ta M, Pavlačková J, Egner P. Preparation of keratin hydrolysate from chicken feathers and its application in cosmetics. *JoVE.* 2017 (129):e56254.
4. Gromiha MM. *Protein bioinformatics: from sequence to function.* 1<sup>nd</sup> ed. academic press; 2010.
5. Dhillon GS. *Protein byproducts: transformation from environmental burden into value-added products.* 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press; 2017.
6. Schrooyen PM, Dijkstra PJ, Oberthür RC, Bantjes A, Feijen J. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. *J Colloid and Interface Sci.* 2001 240(1):30-9.
7. Laba W, Zarowska B, Chorazyk D, Pudlo A, Piegza M, Kancelista A, Kopec W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. *AMB Expres.* 2018 8(1):9.
8. Kamarudin NB, Sharma S, Gupta A, Kee CG, Chik SMSBT, Gupta R. Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. *3 Biotech.* 2017 7(2):127.
9. Staroń P, Banach M, Kowalski Z, Staroń A. Hydrolysis of keratin materials derived from poultry industry. *PECO.* 2014 8(2).
10. Krejci O, Mokrejs P, Sukop S, editors. Preparation and characterization of keratin hydrolysates. *Mathematical Methods and Techniques in Engineering and Environmentyal Science: Proceedings of the 13<sup>th</sup> WSEAS International Conference on Mathematical and Computational Methods in Science and Engineering.* 2011.
11. Navone L, Speight R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLOS ONE.* 2018 13(8):e0202608.
12. Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J.Anat.* 2009 214(4):516-59.
13. Sinkiewicz I, Śliwińska A, Staroszczyk H, Kołodziejska I. Alternative methods of preparation of soluble keratin from chicken feathers. *Waste and biomass valorization.* 2017 8(4):1043-8.
14. Karthikeyan R, Balaji S, Sehgal P. Industrial applications of keratins—A review. *J SCI IND RES INDIA.* 2007 6(9):710-715.
15. Shortle D. Denatured states of proteins and their roles in folding and stability. *COSB.* 1993 3(1):66-74.
16. Tanford C. Protein denaturation. *Adv protein chem.* 1968.24(1). p. 121-282.
17. Zapadka KL, Becher FJ, Gomes Dos Santos A, Jackson SE. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus.* 2017 7(6):20170030.

18. Hovgaard L, Frokjaer S, van de Weert M. Pharmaceutical formulation development of peptides and proteins: CRC Press; 2012.
19. Fraser R, MacRae T, Parry D, Suzuki E. The structure of feather keratin. *Polymer*. 197 12(1):35-56.
20. Arai Km, Takahashi R, Yokote Y, Akahane K. Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. *Eur J Biochem*. 1983 32(3):501-7.
21. Lee B, Vasmatzis G. Stabilization of protein structures. *COSB*. 1997 8(4):423-8.
22. Umeda K, Nadachi Y, Sakai K, Nogami Y, Sudo M. Water-soluble keratin derivative and use thereof. *Google Patents*. 2005.
23. Franks F. Protein biotechnology: isolation, characterization, and stabilization. The Humana Press Inc. 1993.
24. Spicer CD, Davis BG. Selective chemical protein modification. *Nat commun*. 2014 5(1):1-14.
25. Schrooyen PM, Dijkstra PJ, Oberthür RC, Bantjes A, Feijen J. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *J. Agric. food chem*. 2001 49(1):221-30.
26. Boutureira O, Bernardes GJ. Advances in chemical protein modification. *J. Chem. Rev*. 2015 115(5):2174-95.
27. Trivedi MV, Laurence JS, Siahaan TJ. The role of thiols and disulfides on protein stability. *COSB*. 2009 10(6):614-25.
28. Hirs CH. (20) Reduction and S-carboxymethylation of proteins. In *Methods in enzymology*. 3<sup>nd</sup> ed. Academic Press 1967. p. 199-203.
29. Ćimović JM, Stanimirović BD, Mandić LM. The role of the thiol group in protein modification with methylglyoxal. *JSCS*. 2009 74(8-9):867-83.
30. Chalker JM, Bernardes GJ, Lin YA, Davis BG. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *ACES*. 2009 4(5):630-40.
31. Schrooyen PM, Dijkstra PJ, Oberthür RC, Bantjes A, Feijen J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. *J. Agric. food chem*. 2000 8;48(9):4326-34.
32. Wynn R, Richards FM. (33) Chemical modification of protein thiols: Formation of mixed disulfides. *Methods in Enzymology*. 1<sup>nd</sup> ed. Academic Press. 1995 1;25(1):351-6.
33. Cole RD. (22) Sulfitolysis. In *Methods in Enzymology*. Academic Press. 1967 (11), p. 206-208).
34. Work E, Work TS. Chemical modification of proteins. Elsevier; 1976.
35. Rothenbuhler E, Kinsella J. The pH-Stat method for assessing protein digestibility: an evaluation. *J. Agric. Food chem*. 1985 33(3),433-438.
37. Crestfield AM, Moore S, Stein WH. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *JBC*. 1963 238(2):622-7.
38. Walker JM, editor. The protein protocols handbook. Springer Science & Business Media; 1996.

39. Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B. Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Anal. biochem.* 1979 94(1):75-81.
40. Habeeb AF. (37) Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods in enzymology*. Academic Press. 1972. 25, p. 457-464.
41. Buchner J, Kiefhaber T, editors. *Protein folding handbook*. Weinheim: Wiley-VCH; 2005.
42. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *BBA.* 2007 1;1767(9):1073-101.
43. Lorber B, Fischer F, Bailly M, Roy H, Kern D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *BAMBE*. 2012 40(6):372-82.
44. Rajabinejad H, Zoccola M, Patrucco A, Montarsolo A, Rovero G, Tonin C. Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods. *SAGE Journal.* 2018 8(21):2415-24.
45. Prayitno P, Rahmawati D, Griyanitasari G. Sheep wool-derived hydrolyzed keratin from tannery waste of the tanning industry using perhydrol. *MKKP.* 2017 33(2):73-8.
46. Sharma S, Gupta A, Chik SM, Kee CY, Podder PK, Subramaniam M, Thuraisingam J. Study of different treatment methods on chicken feather biomass. *IIUM Engineering Journal.* 2017 18(2):47-55.
47. Khosa MA, Wu J, Ullah A. Chemical modification, characterization, and application of chicken feathers as novel biosorbents. *Rsc Advances.* 2013 3(43):20800-10.
48. Ikkai F, Naito S. Dynamic light scattering and circular dichroism studies on heat-induced gelation of hard-keratin protein aqueous solutions. *Biomacromolecules.* 2002 3(3):482-7.

