سنتز نانوذره کراتین از ضایعات پر مرغ

حکیمه نادریان[1] دکتر منصور مشرقی [2]

کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران،h.naderian7474@gmail.com

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

کراتین به‌عنوان یک بیو پلیمر طبیعی به علت داشتن پیوندهای متقابل دی سولفیدی، فعل‌وانفعالات آب‌گریز مرتبط با بار الکتریکی منفی و وجود پیوندهای هیدروژنی در ساختار مکانیکی قوی خود، در چند دهۀ اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پرهای مرغ که به‌عنوان ضایعات اصلی تولیدی از مرغداری‌ها و کشتارگاه‌ها روزانه به میزان زیادی تولید می‌شوند دارای محتوای پروتئین کراتین بالایی هستند و یکی از فراوان‌ترین منابع تأمین این پروتئین محسوب می‌شوند. پیشرفت در زمینه استخراج، خالص‌سازی و شناسایی خصوصیات پروتئین‌هایی کراتین از پرهای مرغ طی قرن گذشته منجر به ورود این پروتئین در فناوری نانو و تولید مواد زیستی مبتنی بر پایۀ کراتین شده است. در مطالعه حاضر نانوذرات کراتین از پر مرغ سنتز شد. ساختار و ویژگی مورفولوژیکی نانوذرات کراتین و کراتین با استفاده از مشخصه‌یابی‌های FESEM، FTIR,XRD و Biuret test مورد بررسی قرار گرفت. کریستالوگرافی اشعه ایکس اوج کریستالی را در ۳۷,۵ و ۲۰ درجه نشان داد که به ترتیب نشان‌دهنده وجود نانوذرات کراتین و کراتین است. اندازه بلوری نانوذرات کراتین ۷۵,٦ نانومتر به دست آمد. در آنالیز FTIR حضور آمید I،II،III نیز تأیید شد. هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات کراتین حاصل از ضایعات پر مرغ است که با استفاده از گلوتارآلدهید به عنوان عامل اتصال متقابل به دست می‌آید. نانوذرات کراتین دارای خواص فیزیکی و شیمیایی و ویژگی‌های منحصربه‌فرد هستند و می‌توانند مسیرهای جدیدی از کاربرد در زمینه‌های پزشکی و سایر زمینه‌ها را فراهم کنند.

کلیدواژه: نانوذرات کراتین، گلوتارآلدهید، ضایعات پر مرغ، آنالیز داده‌ها

مقدمه

نانوذرات ذراتی انعطاف‌پذیر هستند که نسبت سطح به حجم بالا از ویژگی آن‌ها محسوب می‌شود. پردازش بسیاری از نانوذرات پروتئینی آسان است و می‌توان برای به دست آوردن مشخصات مطلوبی مانند اندازه، مورفولوژی و وزن آن‌ها را اصلاح کرد (۱). نانو کراتین دارای ویژگی‌های خاصی مانند نسبت سطح به حجم بالا، وجود بسیاری از گروه‌های عملکردی، تجزیه بیولوژیکی و فلورسانس درون‌زا، زیست سازگاری بالا است که این خصوصیات پتانسیل زیاد نانوذرات کراتین را برای بسیاری از برنامه‌های کاربردی فراهم می‌کند تاکنون مطالعات کمی در مورد نانو پروتئین‌ها انجام شده است (۲). نانوذرات مبتنی بر کراتین می‌توانند به‌عنوان حامل‌های داروی ضد سرطان مؤثر عمل کنند که دارای درجه‌ای از توانایی هدف‌گیری تومور و آزادسازی کنترل شده دارو هستند (۳،٤). به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط پنگچنگ لیوا و همکارانش انجام شد داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین از طریق پیوند هیدرازون حساس به اسید با کراتین متصل شد. نانوذرات کراتین کانژوگه

شده یا دارو یک ویژگی وابسته به pH قابل توجهی را نشان داد و ٪ ۷۸ دوکسوروبیسین را تحت یک محیط ریز تومور اسیدی منتشر کرد که نتایج حاصل نانوذرات کراتین را به‌عنوان نامزد خوبی برای سیستم‌های حامل دارویی معرفی کرد (۵). پیوندهای دی سولفید و پیوندهای هیدروژنی به نانوذرات کراتین این قابلیت را می‌دهند تا داروهایی با وزن مولکولی بالا را به محل موردنظر خود برسانند. به دلیل اینکه کراتین دارای بار منفی است و به مولکول‌های دارای بار مثبت اجازه می‌دهد تا برای انتقال مؤثرتر به نانوذره بچسبند. توانایی هدف‌گیری نانوذرات مبتنی بر کراتین به حساسیت pH مربوط می‌شود (۳،٤،٦). نانوذرات مبتنی بر کراتین می‌توانند به تغییر PH در محیط پاسخ دهند تا محتوای دارویی آنها مطابق با انتشار آزاد کنترل شود. به دلیل پایداری ذاتی کراتین در آب، یک پلیمر پشتیبانی مطلوب برای کامپوزیت‌های نانوذرات مصنوعی است (٦). در یک بررسی دیگر نانوذرات نقره که با کراتین پوشانده شده‌اند، در محیط‌های آبی بهبود یافته‌اند (۷). کراتین برای حمایت از چسبندگی سلول و تقویت تکثیر سلولی کارآمد و می‌تواند به‌عنوان ماتریس خارج سلولی مصنوعی عمل کند (٤،۸). در مطالعهٔ دیگری نانوذرات طلایی که با کراتین پوشانده شده‌اند سازگاری زیست‌محیطی را با فعالیت ضدباکتریایی بهبودیافته‌ای نشان می‌دهند (۹). به این دلیل کراتین یک انتخاب ایده‌آل برای سیستم تحویل دارو است که باید بیشتر برای اهداف تحویل دارو بررسی شود. پرها به‌عنوان فراوان‌ترین زباله‌ها از صنعت طیور به مقدار زیاد در دسترس هستند مسئلهٔ دفع یا بازیافت این مواد همیشه یک چالش بزرگ بوده است (۱۰). پرهای مرغ که در محیط اطراف دور ریخته می‌شوند باعث آلودگی می‌شوند (۱۱). فرایند دفع پرها مانند سوزاندن یا دفن کردن گران است و صرفه اقتصادی ندارد، همچنین دفع کنترل نشده پرها از نظر محیط زیست قابل قبول نیست زیرا باعث آلودگی خاک و آب‌وهوا می‌شود و همچنین گازهای گلخانه‌ای از قبیل آمونیاک، کربن‌دی‌اکسید و هیدروژن سولفید آزاد می کند (۱۲ ، ۱۳) و بیماری های مختلف انسانی (از قبیل کلرز ، وبا ...)را ایجاد می کند (١٤).در مقابل، نگرانی‌های زیست محیطی مطالعات را به سمت جایگزینی مواد مصنوعی با انواع مواد طبیعی متمایل می کند (۱۲). پرهای مرغ به عنوان یک محصول جانبی کم ارزش به مقدار کم برای خوراک دام و کود استفاده می‌شود زیرا کمبود اسیدهای آمینه ضروری از قبیل متیونین، لیزین، هیستیدین و تریپتوفان را در این دو کاربرد تامین می‌کند (۱۵، ۱٦،۱۷). اما با توجه به خصوصیات بی‌نظیر این پروتئین می‌تواند برای بسیاری از کاربردهای پزشکی از جمله سیستم‌های تحویل دارویی، مهندسی بافت، ترمیم زخم، پوست و اعصاب محیطی در قالب فیلم‌ها، داربست‌ها، هیدروژل‌ها و ...استفاده شود (۱۸،۱۹). سه نوع مختلف کراتین وجود دارد: γ-keratin[۱]، B-keratin[۲]، α-keratin[۳]. a-keratin حاوی رشته‌های میانی است که در اسکلت سلولی نقش دارند و عمدتا در بافت‌های نرم یافت می شوند. B-keratin همچنین دارای رشته‌های میانی است، اما در بافت‌های سخت مانند پر، فلس و ناخن یافت می‌شود. ۷-کراتین در عناصر ساختاری اسکلت سلولی نقش ندارد (۱،۲۰). پرها از سه بخش اصلی تشکیل شده اند: محور مرکزی (rachis[٤]، calamus[٥] و barbs / barbules[٦]) که عمدتا حاوی بتا کراتین (۱۰-

---

۱- گاماکراتین

۲- بتاکراتین

3- آلفاکراتین

٤- راشی

٥- کالاموس

٦- باربول

۳۰ kDa) و برخی از ساختارهای آلفا مارپیچ است. مقدار کمی آلفا-کراتین در ایجاد پر کمک می‌کند (۲۱). اثر متقابل نواحی ورق بتا در پرها از طریق پیوندهای آمیدی دیمرهایی را ایجاد می‌کند که بیشتر به تدریج با یکدیگر ارتباط برقرار می‌کنند و پیوندهای دی سولفید کووالانسی رشته‌های بتا بسیار سخت را ایجاد می‌کنند(۲۲). پرهای مرغ از ۹۱٪ پروتئین، ۸٪ رطوبت و ۱٪ لیپید تشکیل شده است (۱). β- کراتین ترکیب اصلی موجود در پر مرغ است (۲۳). کراتین دارای نقطه ذوب بالاتر از دمای ۲۱۵ درجه سانتیگراد است (۲٤). این پروتئین در حلال‌های قطبی مانند آب، اسیدهای و بازهای ضعیف و همچنین در حلال‌های آپولاری نامحلول است در حالی که از نظر شیمیایی فعال است زیرا سیستین می‌تواند کاهش ، اکسید و هیدرولیز شود (۲۵،۲٦). پیشرفت‌های اخیر در استخراج، خالص‌سازی و خصوصیات پروتئین‌های کراتین منجر به توسعه مواد زیستی امیدوار کننده مبتنی بر کراتین شده است (۲۷). برای تهیه نانوذرات کراتین، پودر کراتین به‌دست آمده حاصل از پر مرغ را می‌توان از دو روش اتیلن گلیکول با پردازشگر اولتراسونیک و گلوتار آلدهید و اتانول استفاده کرد (۲۸،۲۹). در مطالعه حاضر ابتدا با استفاده از ضایعات پر مرغ پروتئین کراتین با روش هیدرولیز کاهنده استخراج شد و در مرحله بعد نانوذرات کراتین با استفاده از گلوتارآلدهید به عنوان اتصال دهنده سنتز شد و برای بررسی خصوصیات پروتئین کراتین و نانوذرات کراتین آنالیزهای FESEM ,FTIR, Biuret test،XRD مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

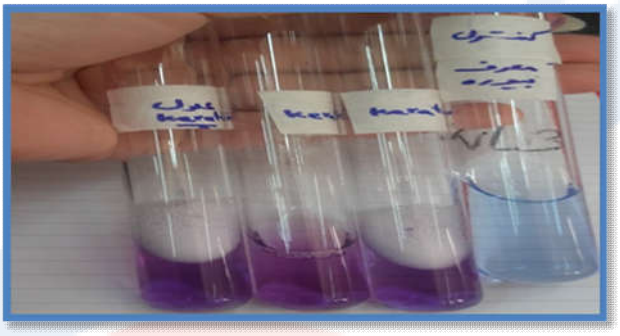
مواد و روش‌ها

پرهای مرغ از مرغداری زرین واقع در شهرستان فردوس استان خراسان جنوبی جمع‌آوری شد. سولفید سدیم، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک‌اسید، اتر نفت و ستریمونیوم بروماید (CTAB)و کیسه دیالیز خریداری شد. پرها در چند مرحله با آب داغ و مواد شوینده شسته شدند و در آون با دمای ٤۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت تمیز و کم آب شدند چربی زدایی پرها با استفاده از اتر نفت به مدت ۱۲ ساعت و پس از آن شستشو با آب مقطر دیونیزه (dH_2O) انجام شد. در مرحله بعد مدت ۳ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند تا آلودگی‌ها و آلودگی‌های میکروبی موجود در پر از بین برود. پرها در دمای محیط خشک شدند و به قطعات کوچک آسیاب شدند به مدت ٤۸ ساعت و برای مراحل بعد بسته‌بندی و در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۳۰). پرهای تمیز، خشک و بریده شده در یک محلول آبی ۵٪ وزنی سدیم هیدروکسید و محلول M ۰,۱ سدیم سولفید در دمای ٤۰ درجه سانتیگراد و طی ۳ ساعت هیدرولیز شد. پس از نهایی شدن فرایند، محلول کراتین با استفاده از کاغذ واتمن فیلتر شد به‌منظور جداکردن قطعات نامحلول پرها، دیالیز در دمای محیط بیش از ٤۸ ساعت انجام شد (۳۱). پس از دیالیز، اسیدکلریدریک (2N) به محلول کراتین اضافه شد تا کراتین در pH 4.2 رسوب کند. کراتین رسوب شده سانتریفیوژ شد، چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد تا رسوب به pH خنثی برسد. لیوفیلیزاسیون در طول ۲٤ ساعت با استفاده از دستگاه فریز درایر انجام شد و نمونه‌ها کاملاً خشک شدند و برای مرحله بعد ذخیره شدند.۱۰۰ میلی‌گرم کراتین لیوفلیزه شده در ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه معلق شد. ۸ میلی‌لیتر اتانول مطلق ۹۹٪ تحت هم زدن مداوم به آن افزوده شد. ۱ میکرولیتر گلوتارآلدئید ۸٪ به آن برای تشکیل نانوذرات کراتین اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت روی همزن مغناطیسی هم زده شد. نانوذرات با سانتریفیوژ در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری شدند. نانوذره کراتین تهیه شده لیوفیلیزه و ذخیره شد (۳۲،۳۰).

نتایج و بحث

تست تأییدی کراتین:

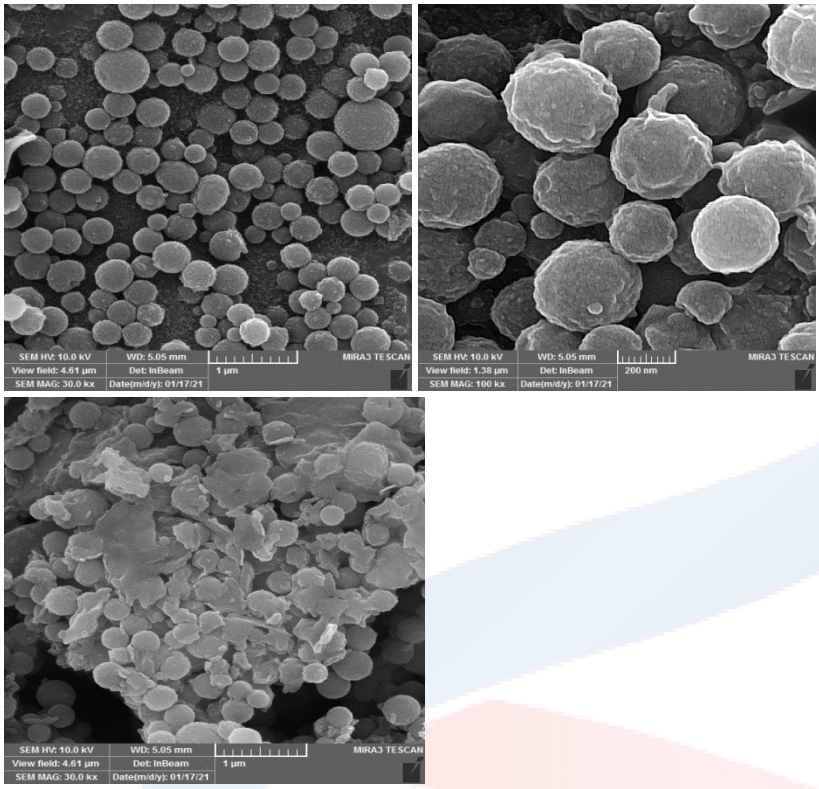
تأیید وجود پروتئین در عصاره، با استفاده از روش Biuret (شکل ۱) تخمین زده شد (۳۶). محلول کاهنده بدون حضور پروتئین کراتین به‌عنوان محلول استاندارد استفاده شد. تغییر رنگ محلول حاوی کراتین با اضافه کردن معرف بیورت از آبی به بنفش حضور پروتئین را تأیید کرد.



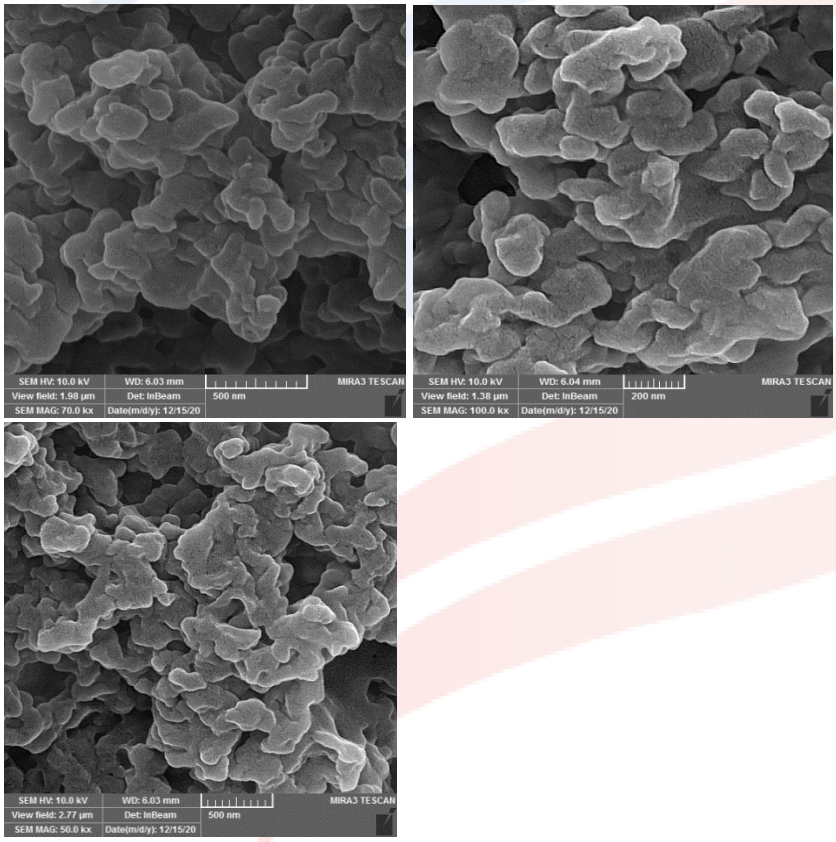
شکل ۱:تست بیورت

مورفولوژی ذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی **(FESEM)**

شکل نانوذرات کراتین و پروتئین کراتین با تجزیه و تحلیل FESEM مشخص شد (شکل ۲،۳). اندازه نانوذرات کراتین ۷۸ نانومتر بود.



شکل ۱ :(FESEM) نانوذرات کراتین پرمرغ

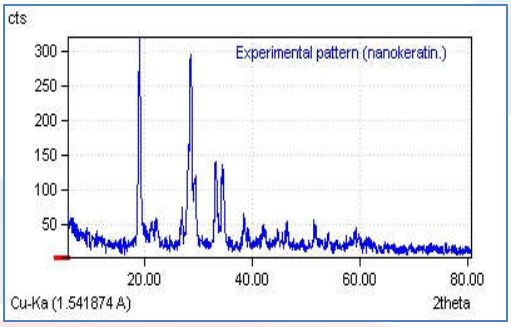


شکل ۲ : (FESEM) پروتئین کراتین پرمرغ

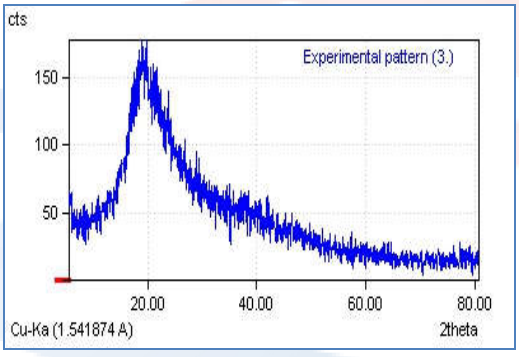
پراش اشعه ایکس (XRD) :

پراش اشعه ایکس نانوذرات کراتین (b) یک پیک قوی در ۳۷,۵ درجه را نشان داد (شکل ۲) که نشان‌دهنده وجود نانوذرات کراتین است. اندازه بلوری نانوذرات کراتین ۷۵,٦ نانومتر بود. در پروتئین کراتین (a) یک پیک قوی در ۲۰ درجه نشان داده شد که نشان‌دهنده وجود کراتین است.

a



b

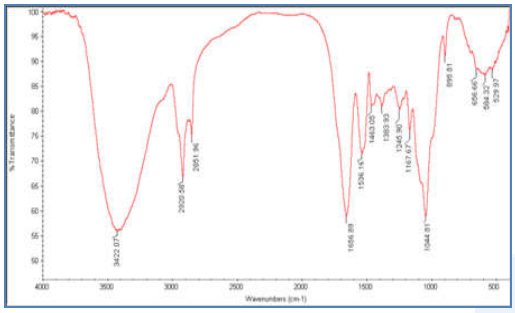


شکل ۳ : (XRD) aپروتئین کراتین، b نانوذرات کراتین

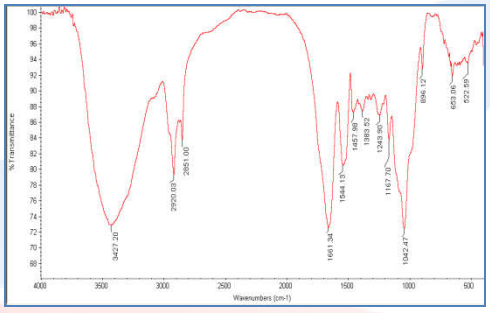
طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

ریزساختار و خصوصیات شیمیایی ریز ذرات با استفاده از طیف‌سنجی FTIR مورد بررسی قرار گرفت (۳۴،33). این آنالیز به تشخیص تغییرات ترکیب شیمیایی پپتیدها کمک می‌کند. حضور آمید I،II،III در محدوده 1634cmو-1578 1460cmو1235cm در پروتئین کراتین (a) و نانوذرات کراتین (b) تأیید شد.

a



b



شکل ٤ : (FTIR) a پروتئین کراتین ، b نانوذره کراتین

نانوذرات کراتین از زیست‌توده پر مرغ سنتز و مشخص شد. این مطالعه یک روش پایدار برای حذف زیست‌توده عظیم زباله‌های پر مرغ که به طور متوسط توسط صنعت طیور روزانه و به مقدار زیاد تولید و به‌صورت معمول دفن یا سوزانده می‌شوند را پیشنهاد می‌دهد. استفاده از پر مرغ منجر به مدیریت پسماند در صنعت طیور می‌شود و درنتیجه آن میزان آلودگی‌های حاصل از دفن و سوزاندن این ضایعات حذف می‌شود. این مطالعه فرصتی برای تبدیل ضایعات حاصل از پر مرغ را به مواد با ارزشی مثل پروتئین کراتین و نانوذرات کراتین ایجاد کرده است کلیه نتایج حاصل با مطالعات قبلی مطابقت دارد. زیست‌توده پر به‌راحتی در دسترس است به دلیل ویژگی‌های استثنایی خود، یعنی سازگاری بیولوژیکی عالی، تجزیه بیولوژیکی، منابع تجدیدپذیر فراوان و ظرفیت اتصال فوق‌العاده به داروهای مختلف، علاقه روزافزونی به‌ویژه در زمینه کاربردهای پزشکی پیدا کرده‌اند.

Synthesis of keratin nanoparticles from poultry waste

Hakimeh Naderian[1], Mansour Mashreghi [2]

Master of Microbial Biotechnology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
h.naderian7474@gmail.com

Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Keratin is a natural biopolymer that has attracted much attention in recent decades due to its disulfide cross-links, hydrophobic interactions associated with negative electric charge, and the presence of hydrogen bonds in its strong mechanical structure. As the main waste produced from poultry farms and slaughterhouses, they are produced in large quantities daily. They have a high keratin protein content and are considered one of the most abundant sources of this protein. Over the past century, this protein has led to the introduction of nanotechnology and the production of keratin-based biomaterials. In the present study, keratin nanoparticles were synthesized from chicken feathers. The structure and morphological properties of keratin and keratin nanoparticles were investigated using FESEM, FTIR, XRD, and Biuret test characterizations. X-ray diffraction pattern showed a crystalline peak at 37.5 and 20 ° C, indicating keratin and keratin nanoparticles, respectively. The crystal size of keratin nanoparticles was 75.6 nm. The presence of amides I, II, and III was also confirmed in the FTIR analysis. This study aimed to synthesize keratin nanoparticles from chicken waste, obtained by using glutaraldehyde as a cross-linking agent. Keratin nanoparticles have physical and chemical properties. They are unique and can provide new directions of application in medical and other fields.

Keywords: keratin Nanoparticles, Glutaraldehyde, Poultry Waste, Data Analysis

منابع:

1- DeFrates, K., Markiewicz, T., Gallo, P., Rack, A., Weyhmiller, A., Jarmusik, B., & Hu, X. (2018). Protein polymer-based nanoparticles: fabrication and medical applications. International journal of molecular sciences, 19(6), 1717.

۲- **Zhang, Y., Zhang, N., Wang, Q., Wang, P., & Yu, Y. (2020).** A facile and eco-friendly approach for preparation of microkeratin and nanokeratin by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. Ultrasonics Sonochemistry, 68, 105201.

3- **Zhi, X., Wang, Y., Li, P., Yuan, J., & Shen, J. (2015**). Preparation of keratin/chlorhexidine complex nanoparticles for long-term and dual stimuli-responsive release. RSC advances, 5(100), 82334-82341.

4-**Li, Y., Zhi, X., Lin, J., You, X., & Yuan, J. (2017).** Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release. Materials Science and Engineering: C, 73, 189-197.

5- **Liu, P., Wu, Q., Li, Y., Li, P., Yuan, J., Meng, X., & Xiao, Y. (2019).** DOX-Conjugated keratin nanoparticles for pH-sensitive drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 181, 1012-1018.

6- **Xu, H., Shi, Z., Reddy, N., & Yang, Y. (2014).** Intrinsically water-stable keratin nanoparticles and their in vivo biodistribution for targeted delivery. Journal of agricultural and food chemistry, 62(37), 9145-9150.

7- **Reichl, S. (2009).** Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. Biomaterials, 30(36), 6854-6866**.**

8- **Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008).** The human keratins: biology and pathology. Histochemistry and cell biology, 129(6), 705**.**

9- **Tran, C. D., Prosenc, F., & Franko, M. (2018)**. Facile synthesis, structure, biocompatibility and antimicrobial property of gold nanoparticle composites from cellulose and keratin. Journal of colloid and interface science, 510, 237-245.

10- **Acda, M. N. (2010).** Waste chicken feather as reinforcement in cement-bonded composites. Philippine Journal of Science, 139(2), 161-166**.**

11-**Poole, A. J., & Church, J. S. (2015).** The effects of physical and chemical treatments on Na2S produced feather keratin films. International journal of biological macromolecules, 73, 99-108**.**

12-**Fan, X. (2008).** Value-added products from chicken feather fibers and protein (Doctoral dissertation).

13-**Xu, S., Reuter, T., Gilroyed, B. H., Tymensen, L., Hao, Y., Hao, X., ... & McAllister, T. A. (2013)**. Microbial communities and greenhouse gas emissions associated with the biodegradation of specified risk material in compost. Waste management, 33(6), 1372-1380.

14-**Endo, R., Kamei, K., Iida, I., & Kawahara, Y. (2008).** Dimensional stability of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin. Journal of Archaeological Science, 35(5), 1240-1246.

15- **Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., & Al-Zarban, S. (1998).** A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. Bioresource technology, 66(1), 1-11.

16- **Sudalaiyandi, G., (2012).**Characterizing the cleaning process of chicken feathers. Master of Engineering thesis, University of Waikato, Hamilton, New Zealand ‹‹1-95.

17- **Dalev, P., Ivanov, I., & Liubomirova, A. (1997).** Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. Journal of the Science of Food and Agriculture, 73(2), 242-244.

18- **Kamath, K. R., & Park, K. (1993).** Biodegradable hydrogels in drug delivery. Advanced drug delivery reviews, 11(1-2), 59-84.

۱9- **Tan, H., & Marra, K. G. (2010**). Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. Materials, 3(3), 1746-1767.

20-**Sharma, S., & Gupta, A. (2016).** Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. Brazilian Archives of Biology and Technology, 59.

21-**Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2016).** Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. Progress in Materials Science, 76, 229-318**.**

22- **Barati, D., Kader, S., Pajoum Shariati, S. R., Moeinzadeh, S., Sawyer, R. H., & Jabbari, E. (2017).** Synthesis and characterization of photo-cross-linkable keratin hydrogels for stem cell encapsulation. Biomacromolecules, 18(2), 398-412**.**

23- **Molloy, P. L., Powell, B. C., Gregg, K., Barone, E. D., & Rogers, G. E. (1982**). Organisation of feather keratin genes in the chick genome. Nucleic acids research, 10(19), 6007-6021.

24- **Senoz, E., Wool, R. P., McChalicher, C. W., & Hong, C. K. (2012**). Physical and chemical changes in feather keratin during pyrolysis. Polymer Degradation and Stability, 97(3), 297-307**.**

25-**Akahane, K., Murozono, S., & Murayama, K. (1977).** Soluble Proteins from Fowl Feather Keratin: I. Fractionation and Properties. The Journal of Biochemistry, 81(1), 11-18.

26- **Endo, R., Kamei, K., Iida, I., & Kawahara, Y. (2008).** Dimensional stability of waterlogged wood treated with hydrolyzed feather keratin. Journal of Archaeological Science, 35(5), 1240-1246**.**

27- **Varesano, A., Vineis, C., Tonetti, C., Ramírez, D. O. S., & Mazzuchetti, G. (2014).** Chemical and physical modifications of electrospun keratin nanofibers induced by heating treatments. Journal of Applied Polymer Science, 131(15).

28- **Xu, H., Shi, Z., Reddy, N., & Yang, Y. (2014**). Intrinsically water-stable keratin nanoparticles and their in vivo biodistribution for targeted delivery. Journal of agricultural and food chemistry, 62(37), 9145-9150.

29-**Mercy R. (2013)**، Invirto evaluation of anti oxidant, antimicrobial, anticancer activities and characterization of Brassica oliracea. var. borteytis. synthesised silver nanoparticles. International journal of pharmaceutical and pharmaceutical sciences Vol 5(4), pp(1-13).

30- **Nanthavanan, P., ARUNGANDHI, K., Sunmathi, D., & Niranjana, J. (2019).** Biological synthesis of keratin nanoparticles from dove feather (Columba livia) and its applications. Asian J Pharm Clin Res, 12(10), 142-146.

31- **Wrześniewska-Tosik, K., & Adamiec, J. (2007).** Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 15(1), 60.

32- **Kamarudin, N. B., Sharma, S., Gupta, A., Kee, C. G., Chik, S. M. S. B. T., & Gupta, R. (2017).** Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. 3 Biotech, 7(2), 1-9.

33-**Sharma, S., Gupta, A., Chik, S. M. S. T., Kee, C. Y. G., Podder, P. K., Subramaniam, M., & Thuraisingam, J. (2017)**. Study of different treatment methods on chicken feather biomass. IIUM Engineering Journal, 18(2), 47-55.

34- **Zhang, Y., Zhao, W., & Yang, R. (2015).** Steam flash explosion assisted dissolution of keratin from feathers. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 3(9), 2036-2042**.**