

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE QUERATINOLÍTICA  
PRODUZIDA POR LINHAGEM PROBIÓTICA DE *Bacillus subtilis***

PATRÍCIA ALINE GRÖHS FERRAREZE

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Julho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUERATINASE PRODUZIDA  
POR LINHAGEM PROBIÓTICA DE *Bacillus subtilis***

PATRÍCIA ALINE GRÖHS FERRAREZE  
Bióloga – Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Julho de 2015

PATRICIA ALINE GRÖHS FERRAREZE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNISINOS

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
Para obtenção do Grau de

## MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

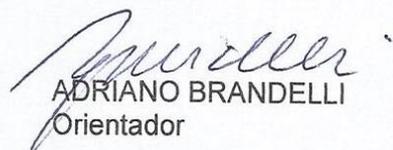
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

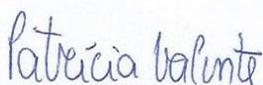
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

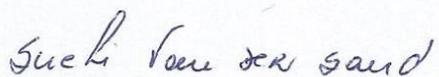
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: / / 2015  
Pela Banca Examinadora

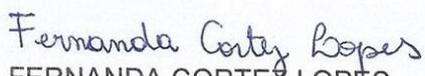
Homologado em: 02 / 09 / 2015  
Por:

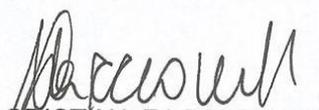
  
ADRIANO BRANDELLI  
Orientador

  
PATRICIA VALENTE  
Coordenadora do PPGMAA

  
SUELI TERESINHA VAN DER SAND  
PPGMAA/UFRGS

  
PLINHO FRANCISCO HERTZ  
PPGCTA

  
FERNANDA CORTEZ LOPES  
PUCRS

  
MARIA CRISTINA FACCIONI HEUSER  
Diretora do ICBS - UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, pelo apoio incondicional, amor e incentivo.

Ao prof. Dr. Adriano Brandelli por ter me aceitado como sua orientanda.

A minha orientadora não-oficial Ana Paula Folmer Corrêa, por ter me auxiliado a tornar este trabalho possível.

Aos meus colegas do laboratório 218 pela amizade e colaboração.

A CAPES, pela imprescindível bolsa de estudos.

## **Purificação e caracterização de protease queratinolítica produzida por linhagem probiótica de *Bacillus subtilis*<sup>1</sup>**

**Autor:** Patrícia Aline Gröhs Ferrareze

**Orientador:** Adriano Brandelli

### **RESUMO**

A hidrólise enzimática de penas residuais da indústria avícola constitui uma alternativa ao descarte irregular e uma fonte rica em aminoácidos para a produção de rações animais. A presença de queratinases em linhagens bacterianas probióticas, pode, concomitantemente, permitir um melhor aproveitamento de rações contendo queratina, devido a possibilidade de suplementação da dieta de animais monogástricos com tais microrganismos. Igualmente, proteases queratinolíticas possuem ampla utilização na indústria. Neste contexto, uma protease queratinolítica da linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis* foi purificada através de cromatografia líquida (Sephadex G-75 e DEAE Sepharose) e caracterizada por ensaio de proteólise em azocaseína com diversos interferentes, revelando uma serinoprotease com, aproximadamente, 31 kDa e atividade ótima a 60 °C em pH neutro e alcalino. Embora a enzima não seja termoestável, constatou-se que sua atividade é alterada na presença de íons manganês, apresentando estimulação em temperatura de 37 °C e aumento da termotolerância à 55°C. O crescimento do microrganismo em substratos queratinosos demonstrou eficiência para degradação de farinha de pena e penas brancas seguido por menor degradação de penas melânicas. Sendo constituído exclusivamente de  $\alpha$ -queratina, o cabelo humano não sofreu proteólise. A enzima pode ser aplicada na indústria para a degradação de materiais recalcitrantes bem como a produção de ração animal. A efetividade do microrganismo *in vivo* para aumentar a digestibilidade da farinha de pena aliada a função probiótica, demanda mais estudos.

**Palavras-chave:** queratinase, probiótico, degradação, purificação, *Bacillus subtilis*.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (91 p.) Julho, 2015.

## **Purification and characterization of keratinolytic protease produced by *Bacillus subtilis* probiotic strain<sup>1</sup>**

**Author:** Patrícia Aline Gröhs Ferrareze

**Orientation:** Adriano Brandelli

### **ABSTRACT**

Enzymatic hydrolysis of waste feathers constitute an alternative to irregular disposal and a rich source of aminoacids for animal feed production. The presence of keratinases in probiotic bacterial strains may, concomitantly, allow better use of keratin-based feeds, due to the possibility of diet supplementation with beneficial microorganisms. In this context, a keratinolytic protease of *Bacillus subtilis* FTC01PR01 was purified by liquid chromatography (Sephadex G-75 and DEAE Sepharose) and characterized by azocasein proteolysis assay, revealing a serine protease with, approximately 31 kDa, and optimal activity at 60 ° C on neutral and alkaline pH. Although the enzyme was not thermostable, it's activity was altered in presence of manganese ions, with stimulation at temperature of 37 °C and increased thermal tolerance at 55 °C. Microorganism growth on keratin substrates demonstrated efficiency for feather meal and white feathers degradation, followed by less degradation of melanized feathers. As a source of pure  $\alpha$ -keratin, human hair was not degraded. The enzyme may be applied in industry for recalcitrant materials degradation and animal feed production. The effectiveness of the microorganism to increase the feather meal digestibility; ally to the probiotic function, demand further studies.

Keywords: keratinase, probiotic, degradation, purification, *Bacillus subtilis*.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (91 p.) Julho, 2015.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3 REVISO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1 <i>Bacillus</i> .....	5
3.2 <i>Bacillus</i> probiticos .....	6
3.3 Queratina .....	9
3.4 Proteases .....	11
3.5 Classificação das proteases .....	13
3.6 Queratinases e suas aplicações .....	17
3.7 Microrganismos queratinolíticos .....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Avaliação do potencial queratinolítico .....	23
4.2. Padronização do pr-inóculo para os cultivos submersos .....	23
4.3 Degradação de substratos queratinosos .....	24
4.4 Ensaio de atividade enzimática .....	25
4.5 Produção da enzima .....	25
4.6 Precipitação proteica com sulfato de amônio .....	26
4.7 Purificação da enzima .....	27
4.7.1 Cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-75) .....	27
4.7.2 Cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose) .....	27
4.7.3 Cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose) .....	28
4.8 Eletroforese de proteínas .....	28
4.8.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	28
4.8.2 Zimograma .....	29
4.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis .....	29
4.10 Caracterização da queratinase purificada .....	30
4.10.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática .....	30
4.10.2 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática .....	30
4.10.3 Estabilidade térmica .....	31
4.10.4 Efeito de detergente sobre a atividade enzimática .....	31
4.10.5 Efeito de sais sobre a atividade enzimática .....	32
4.10.6 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática .....	32
4.10.7 Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade enzimática .....	32
4.10.8 Efeito do íon manganês sobre a estabilidade térmica da enzima .....	33
4.11 Análise estatística .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSO</b> .....	34
5.1 Avaliação do potencial queratinolítico .....	34
5.2 Degradação de substratos queratinosos .....	34
5.3 Precipitação proteica com sulfato de amônio .....	41
5.4 Purificação da enzima .....	43
5.4.1 Cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-75) .....	43

5.4.2 Cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose).....	44
5.4.3 Cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose).....	46
5.5 Eletroforese de proteínas.....	47
5.5.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
5.5.2 Zimograma.....	50
5.6 Determinação da concentração de proteínas solúveis.....	51
5.7 Caracterização da queratinase purificada.....	52
5.7.1 Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática e termoestabilidade.....	52
5.7.2 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática.....	54
5.7.3 Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática.....	55
5.7.4 Efeito de sais sobre a atividade enzimática.....	57
5.7.5 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática.....	59
5.7.6 Efeito de inibidores de protease sobre a atividade enzimática.....	61
5.7.7 Efeito do íon manganês sobre a estabilidade térmica da enzima.....	63
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Peptídeos de interesse industrial naturalmente produzidos por linhagens variadas da espécie <i>Bacillus subtilis</i> .....	6
TABELA 2 Produtos comercializados contendo linhagens probióticas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	9
TABELA 3 Enzimas de aplicação industrial expressas com <i>Bacillus subtilis</i> .....	13
TABELA 4 Classes de queratinases.....	16
TABELA 5 Funções associadas a utilização de queratinases na indústria.....	19
TABELA 6 Microrganismos produtores de queratinases e condições de cultivo utilizadas.....	22
TABELA 7 Tabela de purificação da queratinase da linhagem probiótica FTC01PR01 de <i>Bacillus subtilis</i> .....	53

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Quantificação da atividade enzimática (U/mL) em diferentes substratos: farinha de pena, pena branca, pena melânica e cabelo durante 24, 48, 72 e 96 h de cultivo a 37 °C.....	36
FIGURA 2 Quantificação de proteínas solúveis em diferentes substratos (farinha de pena, pena branca, pena melânica e cabelo) durante o período de cultivo (24, 48, 72 e 96 h) a 37 °C.....	37
FIGURA 3 Crescimento e degradação de substratos queratinosos em CFP por (A) 24 e (B) 96 h.....	39
FIGURA 4 Crescimento e degradação de substratos queratinosos em CPB por (A) 24 e (B) 96 h.....	39
FIGURA 5 Crescimento e degradação de substratos queratinosos em CPM por (A) 24 e (B) 96 h.....	40
FIGURA 6 Crescimento e degradação de substratos queratinosos CC por (A) 24 e (B) 96 h.....	40
FIGURA 7 Substrato queratinoso: pena branca. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 92,30% do substrato degradado.....	40
FIGURA 8 Substrato queratinoso: pena melânica. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 60% do substrato degradado.....	41
FIGURA 9 Substrato queratinoso: cabelo. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 98,5% do substrato intacto.....	41
FIGURA 10 Quantificação da atividade enzimática relativa (U/mL) do extrato bruto após precipitação proteica com sulfato de amônio em diferentes faixas de saturação.....	42
FIGURA 11 Cromatograma da purificação em coluna de gel-filtração Sephadex G-75.....	44
FIGURA 12 Cromatograma da purificação em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose.....	46
FIGURA 13 SDS-PAGE do perfil proteico em CFP: (A) marcador de peso molecular; (B) extrato bruto; (C) precipitação com sulfato de amônio; (D) purificação em G-75; (E) purificação em DEAE.....	49
FIGURA 14 Zimograma do perfil proteico em CFP: (A) extrato bruto; (B) precipitação com sulfato de amônio; (C) purificação em G-75; (D) purificação em DEAE.....	50

FIGURA 15 Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% a temperatura de maior atividade (U/mL).....	53
FIGURA 16 Gráfico da estabilidade térmica da queratinase frente a incubação a 37 e 55 °C. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) sem incubação prévia da enzima.....	54
FIGURA 17 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% o pH de maior atividade (U/mL).....	55
FIGURA 18 Efeito de detergentes iônicos (SDS) e não iônicos (Tween-20/Triton X-100) em concentração de 1% sobre a atividade proteolítica da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.....	57
FIGURA 19 Gráfico demonstrativo do efeito de diferentes sais (5 mM) sobre a atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.....	59
FIGURA 20 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.....	61
FIGURA 21 Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.....	62
FIGURA 22 Efeito do íon manganês sobre a meia-vida enzimática em incubação a 55 °C.....	64

## LISTA DE ABREVIATÖES

BSA: soroalbumina bovina  
CC: caldo cabelo  
CFP: caldo farinha de pena  
CPB: caldo pena branca  
CPM: caldo pena melânica  
DEAE: dietilaminoetanol  
DMSO: dimetilsulfóxido  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético  
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida  
PMSF: fenilmetilsulfonilfluorido  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SP: sulfopropil  
TCA: ácido tricloroacético  
TRIS: hidroximetilaminoetano  
TSA: agar triptona de soja

## 1 INTRODUÇÃO

A queratina, um dos biopolímeros mais abundantes encontrados na natureza, está presente em estruturas como a pele, penas, pelos, escamas e unhas, constituindo uma barreira mecânica, estrutural e térmica para o organismo. Por ser uma proteína fibrosa, de conformação tridimensional, rica em ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, apresenta resistência estrutural à clivagem por enzimas comuns, tais como a tripsina, a pepsina e a papaína. A estabilidade mecânica é conferida também pelo empacotamento peptídico em  $\alpha$ -hélice ou estrutura  $\beta$ -pregueada, originando as  $\alpha$  e  $\beta$ -queratinas. As  $\alpha$  e  $\beta$ -queratinas não divergem apenas pelo empacotamento proteico e sequência de aminoácidos, mas nos mecanismos que levam a proteína a sua conformação final; como similaridade, ambas mantêm a presença de cisteína na formação das fibras, como principal aminoácido e responsável pela insolubilidade característica. Os aminoácidos essenciais treonina, valina, metionina, isoleucina, fenilalanina e lisina também fazem parte da estrutura protéica da queratina.

Nos processos naturais de decomposição da matéria orgânica de origem animal, a reciclagem de nutrientes, a partir da degradação de penas – principal fonte de queratina – é conferida a bactérias e fungos. Estes organismos

produzem proteases capazes de clivar as ligações peptídicas da proteína fibrosa, utilizando-a como substrato de crescimento. As proteases que exercem tal função proteolítica podem ser específicas, sendo denominadas queratinases, ou então, uma série de enzimas cuja atuação conjunta possibilita o uso das penas a partir do rompimento das ligações dissulfeto, principais responsáveis pela estabilidade estrutural e resistência a proteólise.

As queratinases são, em sua maioria, enzimas extracelulares, entretanto há formas intracelulares e aderidas à membrana. A maior parte das queratinases estudadas pertence às classes das serino e metaloproteases; geralmente com atividade em pH neutro a alcalino e em temperaturas médias a altas. Dentre os microrganismos produtores, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, com uma grande variedade de espécies queratinolíticas.

Cada vez mais, as queratinases apresentam uma gama maior de utilizações biotecnológicas; da mesma forma, têm crescido o mercado de enzimas, especialmente proteases, devido a sua especificidade e eficiência catalítica. Embora as aplicações comerciais de proteases queratinolíticas tenham inicialmente alcançado a indústria cosmética e farmacêutica, na produção de produtos para a pele e cabelos ( $\alpha$ -queratina); os hidrolisados de queratina, a partir das penas ( $\beta$ -queratina) residuais de aviários, constituem uma alternativa ao descarte irregular das penas e uma fonte proteica rica em aminoácidos para rações animais. Outra função refere-se ao uso depilatório em couros, substituindo o sulfeto de sódio, um composto tóxico, utilizado por curtumes, que causa sérios danos ao meio ambiente.

A utilização do gênero *Bacillus* como fonte de cepas probióticas remonta a pouco mais de cinquenta anos, estando presentes como suplemento alimentar para a dieta humana e promotores de crescimento na dieta animal. Inúmeros estudos demonstram a eficácia de organismos probióticos no combate a infecções pela colonização da microbiota entérica e inibição do crescimento de patógenos; bem como, pela estimulação do sistema imunológico humoral e celular do hospedeiro.

Neste sentido, este trabalho teve por objetivo a purificação e caracterização de uma protease queratinolítica expressa pela linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis*; com potencialidade para uso industrial na hidrólise de queratina e outros substratos proteicos.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Purificar e caracterizar uma protease queratinolítica produzida pela linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis*.

### Objetivos específicos

- Avaliar o potencial queratinolítico da linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis* analisando a degradação de diferentes substratos queratinosos.
- Produzir a queratinase com a queratina como fonte única de carbono, nitrogênio e energia para o microrganismo.
- Purificar a queratinase com técnicas de cromatografia líquida de gel filtração e troca iônica.
- Caracterizar a atividade enzimática para determinação de temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e efeito de sais, detergentes, solventes e inibidores sobre a enzima.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende um grande e heterogêneo grupo de bastonetes Gram-positivos, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e com uma vasta gama de características fisiológicas que possibilitam a expressão extracelular de metabólitos de interesse em escala industrial (Sansinenea & Ortiz, 2011; Lippolis et al., 2013). A ampla variedade metabólica garante, para este gênero, a capacidade de degradar diferentes tipos de substratos, crescendo em uma larga gama de nutrientes (Parrado et al., 2014).

A produção de metabólitos secundários diversos, como lipopeptídeos, polipeptídeos, macrolactonas, ácidos graxos, policetídeos, lipoamidas e isocumarinas é traduzida em inúmeras funções biológicas, as quais desempenham funções antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, etc. (Mondol et al., 2013). Estima-se que 60% das enzimas comercialmente disponíveis sejam produzidas por espécies de *Bacillus* (Westers et al., 2004).

Além de organismo GRAS (“*generally recognized as safe*”), elevada taxa de crescimento e produção e secreção de numerosas proteínas (Tabela 1); *Bacillus subtilis* é um dos microrganismos mais bem estudados, molecular,

bioquímica e geneticamente; mantendo-se como o organismo modelo entre os Gram-positivos e hospedeiro eficiente para a expressão de proteases e lipases (Manabe et al, 2011; Sansinenea & Ortiz, 2011; Vojcic et al., 2012).

**TABELA 1** Peptídeos de interesse industrial naturalmente produzidos por linhagens variadas da espécie *Bacillus subtilis*

<b>Metabólito</b>	<b>Função</b>	<b>Estrutura</b>
Bacilibactina	Sideróforo	Peptídeo
Bacilisina	Antibacteriano, antifúngico	Peptídeo
Bacilomicina	Surfactante, antibiótico	Lipopeptídeo
Bacitracina	Antibiótico	Peptídeo
Bacircina	Hemotóxico, citotóxico	Lipoheptapeptídeo cíclico
Ericina	Antibacteriano	Peptídeo
Fengicina	Surfactante, antibiótico	Lipopeptídeo
Iturina	Surfactante, antibiótico	Lipopeptídeo
Isohalobacillina	Surfactante, antitumoral	Lipopeptídeo
Mersacidina	Antibacteriano	Peptídeo
Micobacilina	Antibiótico	Peptídeo
Micosubtilina	Hemolítico, fungicida	Lipoheptapeptídeo cíclico
Sublancina	Antibacteriano	Peptídeo
Subtilina	Antibacteriano	Peptídeo
Subtilisina	Peptidase	Peptídeo
Subtilolisina	Antibacteriano	Peptídeo
Surfactina	Surfactante, antibiótico	Lipopeptídeo

**FONTE:** NORINE database (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/traitement.jsp>) MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=sp000127;type=peptidase>) e Sansinenea & Ortiz, 2011

### 3.2 *Bacillus* probióticos

Conceitualmente, probióticos são culturas simples ou mistas viáveis de microrganismos (especialmente lactobacilos e bifidobactérias, componentes da microbiota entérica normal de humanos e animais) que, quando administrados, afetam benéficamente o hospedeiro: (1) diretamente, pela prevenção de infecções e combate aos agentes patógenos; ou (2) indiretamente, pela regulação do equilíbrio da microbiota entérica e aumento da resposta imune

do hospedeiro (Lee et al., 2010; Maragkoudakis et al., 2010). Microrganismos probióticos têm sido utilizados de forma alternativa ao uso de antibióticos como supressores de microrganismos indesejáveis. O uso em animais e seres humanos, assim como sua eficiência na regulação e proteção da microbiota nativa tem sido amplamente estudados (Lee et al., 2010). A proposição do uso de microrganismos probióticos como suplemento alimentar na dieta animal opondo-se aos antibióticos promotores de crescimento remonta a menos de trinta anos; tendo como um dos principais fatores, senão o principal, o surgimento de cepas resistentes em novos e antigos patógenos (Canganella et al., 1996).

De fato, microrganismos probióticos podem causar alterações significativas na microbiota entérica, seja pelo consumo profilático ou terapêutico. Os mecanismos utilizados para a colonização e regulação do trato gastrointestinal variam desde a (a) produção de ácido lático (o qual acidifica o pH estomacal, dificultando a permanência de microrganismos patógenos pela sensibilidade dos mesmos a acidez ou pela aumentada permeabilidade da membrana externa de Gram-negativos); (b) produção de peptídeos antimicrobianos – bacteriocinas - ; (c) competição por sítios de ligação nas células epiteliais (impedindo a ligação de espécies patogênicas); (d) indução ao aumento da produção de substâncias antimicrobianas e citoprotetoras - como as defensinas - pelo organismos hospedeiro; e até mesmo (e) funções imunomodulatórias de reparo a danos provocados a barreira intestinal (Wohlgemuth et al., 2010).

A utilização do gênero *Bacillus* como fonte de cepas probióticas remonta a pouco mais de cinquenta anos, estando presentes como suplemento alimentar para a dieta humana e promotores de crescimento na dieta animal (Tabela 2). Algumas espécies, tais como *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus licheniformis*, mais amplamente estudadas, demonstraram cientificamente as vantagens do uso deste grupo em relação a gêneros comumente utilizados na indústria de probióticos, como *Lactobacillus* sp.: a resistência do endósporo celular garante não só, melhores condições de armazenamento – uso de temperatura ambiente e possibilidade de dessecação – como também, a sobrevivência no pH gástrico, permitindo que microrganismos viáveis sigam pelo sistema digestório (Duc et al., 2004; Cutting, 2011).

Segundo Lee e colaboradores (2010), a utilização de *Bacillus subtilis* como complemento alimentar na dieta de aves, levou a efeitos inibitórios significativos no crescimento de microrganismos patogênicos como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*, melhorando a imunidade humoral e celular das respostas imunológicas no epitélio intestinal.

**TABELA 2** Produtos comercializados contendo linhagens probióticas de *Bacillus subtilis*.

<b>Produto</b>		<b>Uso</b>
Bibactyl	Tediphar Corporation, Vietnã	Humano
Bio-Kult®	Protexin Health Care – Reino Unido	Humano
Biobaby	ILdong Pharm, Coreia	Humano
Biosporin®	Biofarm, Ucrânia	Humano
Biosubtyl DL	IVAC, Vietnã	Humano
ILDong Biovita	ILDong Pharm, Coreia	Humano
Lactipan-Plus	Istituto Biochimico Italiano SpA, Itália	Humano
Medilac-Vita	Hanmi Pharmaceutical, China	Humano
Nature's First Food	Nature's First Law, EUA	Humano
Pastybio	Pasteur Institute of Ho Chi Minh City, Vietnã	Humano
Primal Defense™	Garden of Life, EUA	Humano
BioGrow®	Provita Eurotech Ltd., Reino Unido	Veterinário <sup>1</sup>
BioPlus®	Christian Hansen Hoersholm, Dinamarca	Veterinário <sup>2</sup>
Bao-Zyme-Aqua	Sino-Aqua Corp., Taiwan	Aquacultura
BioStart®	Microbial Solutions, África do Sul/ Advanced Microbial Systems, EUA	Aquacultura

<sup>1</sup> Aves domésticas, bezerros e porcos; <sup>2</sup>leitões, galinhas e perus. **FONTE:** Hong et al., 2005; Cutting, 2011.

### 3.3 Queratina

As queratinas pertencem a família de proteínas de filamento intermediário (FI), sendo uma classe de proteínas fibrosas constituídas por 18 diferentes aminoácidos, os quais formam cadeias polipeptídicas com massa molecular de 40 a 70 kDa em  $\alpha$ -queratinas e de 10 a 20 kDa em  $\beta$ -queratinas (Saucedo-Rivalcoba et al., 2011). A molécula proteica é formada por três domínios distintos: o domínio central, de conformação  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -pregueada ( $\beta$ -queratina); e os domínios N (amino) e C (carboxi) terminais, os quais compõem a matriz, uma região cujas muitas e variadas alterações estão associadas ao desenvolvimento de diferentes apêndices em aves e répteis (Fraser & Parry, 2011).

A estrutura altamente empacotada em  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -pregueada ( $\beta$ -queratina) e o superrenovelamento da cadeia polipeptídica, favorecidos pela grande quantidade de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, conferem resistência mecânica à clivagem por enzimas comuns, tais como a tripsina, a pepsina e a papaína. A insolubilidade característica, resulta da presença do aminoácido sulfurado cisteína na formação das fibras, podendo esta, representar de 7 a 20% do total de resíduos. Queratinas leves (extrato córneo) e rígidas (penas e pelos) são assim denominadas devido a proporção de cisteína, e a consequente formação de pontes dissulfeto; queratinas leves apresentam até 2% de cisteína, ao passo que queratinas rígidas podem passar de 10%, alcançando 22% em estruturas duras como chifres e unhas (Onifade, 1998; Riffel, 2006; Kornikowicz-Kowalska & Bohacz, 2011). Embora convergentes em função, as  $\alpha$  e  $\beta$ -queratinas acumulam inúmeras diferenças moleculares, ao ponto que as  $\alpha$ -queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores e as  $\beta$ -queratinas são exclusivas para répteis e aves (Riffel, 2006).

A estrutura da  $\alpha$ -queratina é consequência da composição de aminoácidos de sua conformação primária; as regiões terminais são mais ricas em resíduos de cisteína do que a região central, na qual se apresentam sequências repetidas de sete aminoácidos (*a, b, c, d, e, f, g*), onde as posições *a* e *d* são ocupadas geralmente por resíduos apolares. A associação destes resíduos permite um arranjo superespiralado das cadeias em paralelo uma sobre as outras, as quais formam uma estrutura filamentar. Os domínios N e C terminal

facilitam a agregação dos monômeros para a formação do filamento de queratina (Jones et al., 1997).

A estrutura primária da  $\beta$ -queratina constitui-se como longa sequência de polipeptídeos que alternam resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Desta forma, as glicinas situam-se na parte superior do plano da folha  $\beta$ -pregueada enquanto os demais resíduos permanecem sob o plano; permitindo aos pares de folhas pregueadas um empacotamento perfeito (Riffel, 2006). Embora com poucos resíduos de cisteína, a  $\beta$ -queratina possui alto teor de serina, glicina, prolina e alanina. (Korniłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011).

Classificadas como um grupo externo, devido a presença das configurações alfa e beta em sua composição, as penas das aves constituem-se de, aproximadamente 2/3 de  $\alpha$ -queratina e 1/3 de  $\beta$ -queratina; apresentando menor quantidade de cisteínas (8%), ainda que uma queratina rígida. Como consequência da variação estrutural, são leves e resistentes (Korniłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011).

### **3.4 Proteases**

As proteases constituem um grupo de enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, atuando na regulação da atividade catalítica através da proteólise de precursores inativos (zimogênios) para ativação da proteína funcional; da clivagem de ligações peptídicas, levando a um rearranjo conformacional, da remoção de peptídeos inibitórios de funções fisiológicas e da hidrólise de grandes moléculas para absorção. O equilíbrio entre proteases e

seus inibidores mantêm as funções normais do organismo. Nos microrganismos, as proteases extracelulares desempenham um importante papel na degradação do substrato em fonte nutricional utilizável pelo metabolismo da célula e no processo de patogênese (Phillips & Fletterick, 1992).

O mercado mundial de enzimas movimenta, anualmente, mais de US\$ 3 bilhões, dos quais, 60% composto pelo comércio de proteases (Vazquez & Cormack, 2006; Jisha et al., 2013). As proteases são aplicadas nas mais diversas funções, estando presentes na indústria química, têxtil, farmacêutica, alimentar; no tratamento de efluentes, biorremediação e controle biológico. Além da facilidade de produção de enzimas em microrganismos como fungos e bactérias (Tabela 3), seu uso destaca-se especialmente pela alta especificidade das mesmas com cada substrato e a seletividade para cada ligação molecular, aliada a eficiência catalítica e a baixa quantidade de metabólitos secundários indesejáveis (Bon et al., 2008). Estima-se que as proteases correspondam a aproximadamente 2% do genoma humano e de 1 a 5% do genoma de organismos infecciosos (Shen & Chou, 2009); 10% das enzimas incluídas na lista do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular são proteases (Riffel, 2006).

Segundo Jisha e colaboradores (2013), 89% das proteases comercializadas são destinadas à indústria de detergentes, e uma grande parte deste mercado pertence às proteases alcalinas do gênero *Bacillus*.

**TABELA 3** Enzimas de aplicação industrial expressas com *Bacillus subtilis*

<b>Enzima</b>	<b>Microrganismo de origem</b>
$\alpha$ -Acetolactato descarboxilase	<i>Bacillus</i> sp.
$\alpha$ -Amilase	<i>Bacillus</i> sp.
Ariesterase	<i>Mycobacterium</i> sp.
Amilase maltogênica	<i>Bacillus</i> sp.
Celulase	<i>Bacillus</i> sp.
Glicosiltransferase	<i>Rhodothermus</i> sp.
Glicanase	<i>Bacillus</i> sp.
Glicanotransferase	<i>Thermus</i> sp.
Glutaminase	<i>Bacillus subtilis</i>
Hemicelulase	<i>Bacillus subtilis</i>
Pectato liase	<i>Bacillus subtilis</i>
Pentosanase	<i>Bacillus</i> sp.
Protease	<i>Bacillus</i> sp.
Pululanase	<i>Bacillus</i> sp.
Sulfidril oxidase	<i>Saccharomyces</i> sp.
Xilanase	<i>Bacillus</i> sp.

**FONTE:** AMFEP 2014 (Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products). Disponível em: <<http://www.amfep.org/content/list-enzymes>>

### 3.5 Classificação das proteases

Funcionalmente, as proteases podem ser classificadas de acordo com (1) a região de clivagem na cadeia peptídica e (2) a natureza química do sítio catalítico. Consoante à região hidrolisada, as proteases são denominadas *endopeptidases* (hidrolisam ligações dentro da cadeia peptídica) ou *exopeptidases* (hidrolisam as extremidades C ou N terminais da cadeia) (Bon et al., 2008). Conforme o sítio catalítico, as proteases podem ser classificadas tradicionalmente como serino, aspartil, cisteína e metalo proteases, existindo ainda outros grupos como glutâmico, asparagina e treonina proteases.

Mais de um terço das enzimas proteolíticas conhecidas são serinoproteases (Tabela 4), sendo agrupadas em 13 clãs e 40 famílias; geralmente endopeptidases. As serinoproteases contém um resíduo de serina

em seu sítio ativo, a qual realiza um ataque nucleofílico na ligação carbonil do peptídeo, formando uma acil-enzima intermediária (Di Cera, 2009). A tríade catalítica característica do grupo formada por *aspartato – histidina – serina*, em alguns casos pode ser substituído por uma díade de serina com lisina ou histidina ou mesmo de uma serina acompanhada por um par de histidinas; uma última família encontrada, das serino-carboxil peptidases possui um resíduo de glutamina substituindo a histidina e formando uma nova tríade Glu – Asp – Ser (Page & Di Cera, 2008). As serinoproteases são irreversivelmente inibidas pelos compostos 3,4-dicloroisocumarina (DCI), diisopropilfluorofosfato (DFP), 3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF); os quais formam ligações covalentes com a enzima. (Riffel, 2006).

As aspartil proteases (proteases ácidas) dependem de um ou dois resíduos conservados de ácido aspártico para catálise; os quais situam-se dentro do motivo Asp – X – Gly (X pode ser serina ou treonina). As aspartil proteases são inibidas por pepstatina e apresentam maior atividade em pH ácido; são divididas em 6 clãs e 14 famílias (Simões & Faro, 2004; Riffel, 2006).

As cisteína proteases são peptidases de 21 a 30 kDa dependentes da presença de uma díade de cisteína (Cys) e histidina (His) no sítio ativo para atividade catalítica. Estas proteases, ativas apenas em condições redutoras, devido a elevada tendência do grupo tiol a oxidação, atuam geralmente em pH neutro embora algumas tenham sido encontradas ativas no pH ácido dos lisossomos (Grzonka et al., 2001). Possuem inibição por agentes sulfidríla como p-cloromercurilbenzoato (PCMB) e iodoacetamida. São classificadas em 20 famílias (Riffel, 2006).

As metaloproteases são as peptidases que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos, necessitando de um ou dois íons metálicos divalentes ( $Zn^{2+}$  em sua maioria e ocasionalmente  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ ) em seus sítios ativos para a catálise (Wu & Chen, 2011; Cerdà-Costa & Gomis-Ruth, 2014). São distribuídas em aproximadamente 60 famílias, possuindo ação de endopeptidase, exopeptidase ou ambas. O agrupamento em clãs é determinado pelos aminoácidos que compõem o sítio de ligação ao íon, mais comumente histidinas, aspartatos e glutamatos (Cerdà-Costa & Gomis-Ruth, 2014). Metaloproteases extracelulares de mamíferos (metaloproteases de matriz) desempenham sua função no processo de resposta celular ao microambiente através da degradação proteolítica e ativação da superfície celular pela modulação de interações *célula – célula* e *célula – matriz* (Baker et al., 2002); bactérias heterotróficas secretam metaloproteases extracelulares para a degradação de proteínas ambientais e nutrição (Wu & Chen, 2011). Estas proteases são inibidas por agentes quelantes como o ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido etileno glicol tetra acético (EGTA) e 1,10 orto fenantrolina (OP) (Riffel, 2006).

**TABELA 4** Classes de queratinases

<b>Classe</b>	<b>Massa molecular</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Referência</b>
Serino	66 kDa	<i>Bacillus halodurans</i> PPKS-2	Prakash et al., 2010
Serino	65 kDa	<i>Bacillus pumilus</i>	Kumar et al., 2008
Serino	58 kDa	<i>Bacillus licheniformis</i> ER-15	Tiwary & Gupta, 2010
Serino	45 kDa	<i>Bacillus pumilus</i> KS12	Rajput et al., 2010
Serino	35 kDa	<i>Bacillus licheniformis</i> FK-14	Suntornsuk et al., 2005
Serino-metalo	34 kDa	<i>Bacillus pumilus</i> A1	Fakhfakh-Zouari et al., 2010
Metalo	32 kDa	<i>Bacillus subtilis</i> NRC 3	Tork et al., 2013
Serino	30,5 kDa	<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	Cai et al., 2008
Serino	30,2 kDa	<i>Bacillus subtilis</i> P13	Pillai & Archana, 2008
Serino	240 kDa	<i>Kocuria rósea</i>	Bernal et al., 2006
Metalo	148 kDa	<i>Lysobacter</i> sp. NCIMB 9497	Allpress et al., 2002
Serino	76 kDa	<i>Meiothermus</i> sp. I40	Kuo et al., 2012
Metalo	64 kDa	<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Riffel et al., 2007
Metalo	60 kDa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Farag & Hassan, 2004
Serino-metalo	48 kDa	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BBE11-1	Fang et al., 2013
Serino-metalo	44 kDa	<i>Streptomyces</i> sp.	Tatieni et al., 2008
Serino	36 kDa	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BBE11-1	Fang et al., 2013
Serino	33 kDa	<i>Paecilomyces marquandii</i>	Gradisar et al., 2005
Serino	33 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KS-1	Sharma e Gupta, 2010
Serino	30 kDa	<i>Doratomyces microsporium</i>	Gradisar et al., 2005

**FONTE:** Elaborado pela autora.

### 3.6 Queratinases e suas aplicações

A utilização de queratinases em processos industriais fundamenta-se como uma ferramenta biotecnológica na prospecção de modelos eficientes de degradação para os resíduos gerados no ramo agroindustrial, com o posterior aproveitamento dos hidrolisados (Tabela 5).

Tradicionalmente, os processos de descarte das penas (as quais representam até 10% do peso das aves e são compostas 90% por queratina) incluem incineração, a qual desprende elevados níveis de CO<sub>2</sub>; e o depósito em aterros, onde a degradação anaeróbia da queratina resulta na produção de substâncias tóxicas, tais como sulfeto do hidrogênio e amônia. A hidrólise enzimática de penas residuais de aviários, constitui uma alternativa ao descarte irregular das penas e uma fonte rica em aminoácidos para a produção de ração animal (Brandelli, 2007). Além de barata, a farinha de pena contém maior quantidade de cisteína, valina e treonina, quando comparada ao farelo de soja; podendo substituí-lo em 7% da dieta animal (Gupta & Ramnani, 2006).

Sabe-se que os métodos usuais de fabricação da farinha de pena para ração animal acabam por destruir os aminoácidos essenciais (como metionina, lisina e triptofano) durante o tratamento térmico e moagem; conseqüentemente, rações com maior digestibilidade apresentam menor potencial nutritivo (Bon et al., 2006; Brandelli, 2007; Daroit, 2011). Contrariamente, a fermentação por microrganismos queratinolíticos aumenta os níveis dos aminoácidos essenciais arginina, lisina e metionina (Gupta & Ramnani, 2006). Atualmente, a Bioresource International Incorporation comercializa duas linhas de proteases queratinolíticas: a Versazyme<sup>®</sup>, para aumentar a digestibilidade proteica de

rações animais e a Valkerase<sup>®</sup>, que atua no processamento de penas para fabricação de farinha de pena como fonte de proteínas e peptídeos.

Outra função das queratinases refere-se ao uso depilatório em couros, substituindo o sulfeto de sódio, um composto altamente tóxico (responsável por até 80% dos poluentes emitidos em curtumes), que gera, por sua vez, o gás sulfídrico. Muitas queratinases não possuem ação catalítica em substratos como o colágeno, portanto, não danificam o couro durante o processo de depilação enzimática; assim como, não produzem metabólitos poluentes (Riffel, 2006; Bon et al., 2008; Brandelli, 2007).

Segundo Paul e colaboradores (2014), as queratinases, devido a sua capacidade hidrolítica em substratos recalcitrantes (como a queratina), tem sido utilizadas pela indústria como uma alternativa aos produtos químicos a fim de melhorar eficiência e custo-benefício de sistemas e processos. Neste contexto, as queratinases alcalinas ocupam 40% do mercado mundial de enzimas (Paul et al., 2014). Enzimas termoestáveis até 40 °C, alcalinas e compatíveis com a composição de detergentes são o principal interesse desta indústria (Anwar & Saleemuddin, 1998). Ao contrário de outras funções, a fabricação de detergentes não exige a queratinase purificada, baixando o custo da produção (Paul et al., 2014).

Os produtos resultantes da queratina hidrolisada também têm se mostrado úteis para a produção de fertilizantes, para as indústrias cosmética/farmacêutica (tratamento e regeneração epitelial), biomédica (descontaminação de equipamentos) e têxtil (modificação de fibras), dentre outras (Gupta & Ramnani, 2006; Daroit, 2011).

**TABELA 5** Funções associadas a utilização de queratinases na indústria

<b>Função</b>	<b>Organismo produtor/enzima</b>	<b>Referência</b>
Aplicação em detergentes	<i>Brevibacillus sp. strain AS-S10-II</i>	Rai & Mukherjee, 2011
Depilação de couro caprino	<i>Brevibacillus sp. strain AS-S10-II</i>	Rai & Mukherjee, 2011
Degradação de príons	<i>Streptomyces galbus var. achromogenes</i> 695-206	Tsiroulnikov et al., 2004
Degradação de resíduos queratinosos	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> AD-11	Gegeckas et al., 2015
Hidrólise de lã para remoção de metais do solo	Protease alcalina ( <i>Bacillus sp.</i> ) Esperase 8.0 I (Novo Nordisk A/S)	Evangelou et al., 2008.
Hidrólise de pelos/penas para obtenção de aminoácidos	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> AD-11	Gegeckas et al., 2015
Hidrólise de penas para obtenção de compostos antioxidantes	<i>Chryseobacterium sp. kr6</i>	Fontoura et al., 2014
Hidrólise de penas para obtenção de compostos bioativos contra fungos fitopatogênicos	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 6B	Bose et al., 2014.
Hidrólise de penas para obtenção de compostos inibidores da enzima conversora de Angiotensina I	<i>Chryseobacterium sp. kr6</i>	Fontoura et al., 2014
Hidrólise de penas para obtenção de compostos inibidores da dipeptidil peptidase IV	<i>Chryseobacterium sp. kr6</i>	Fontoura et al., 2014
Hidrólise de penas para produção de biohidrogênio	<i>Bacillus licheniformis</i> KK1 e <i>Thermococcus litoralis</i>	Bálint et al., 2005.
Hidrólise de penas para produção de nitrogênio orgânico	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 6B	Bose et al., 2014.
Permeabilização da estrutura ungueal para remédios tópicos	<i>Paecilomyces marquandii</i> MZKI B-639	Mohorcic et al., 2007
Pesticida contra o nematódeo <i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Bacillus sp. 50-3</i>	Yue et al., 2011
Remoção da cutícula das fibras da lã	<i>Pseudomonas sp.</i>	Cai et al., 2011.
Suplementação alimentar de frangos	<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Wang et al., 2008

**FONTE:** Elaborado pela autora.

### 3.7 Microrganismos queratinolíticos

Nos processos naturais de decomposição da matéria orgânica de origem animal, a ciclagem de nutrientes – especialmente carbono, nitrogênio e enxofre – a partir da degradação de estruturas queratinosas, como penas e pelos, é conferida a bactérias e fungos. Estes microrganismos produzem proteases capazes de clivar as ligações peptídicas da proteína fibrosa, utilizando-a como substrato de crescimento. As enzimas que exercem esta função podem ser específicas, sendo então denominadas queratinases; ou a degradação se dá pela atuação conjunta de proteases e dissulfeto redutases, as quais rompem as ligações dissulfeto das cadeias cisteídicas, principais responsáveis pela estabilidade estrutural e resistência a proteólise (Riffel, 2006; Prakash et al., 2010).

As queratinases são, em sua maioria, enzimas extracelulares, entretanto há formas intracelulares e aderidas à membrana. A maior parte das queratinases estudadas pertence à classe das serino e metaloproteases. Estas proteases podem ser descritas em uma larga gama de ambientes, atuando em pH ácidos a alcalinos (5,0 a 13,0) e temperaturas médias a extremas (30 a 100 °C); com uma massa molecular de 18 a 240 kDa (Brandelli et al., 2010; Gupta & Ramnani, 2006; Riffel, 2006).

Consoante a capacidade de degradar o substrato, os microrganismos podem ser classificados em (a) queratinolíticos verdadeiros, os quais degradam e solubilizam toda a estrutura da queratina rígida; e (b) potencialmente queratinolíticos, os quais, devido à grande propriedade proteolítica, agem na

conversão de proteínas não queratinosas presentes na composição de cabelos, penas etc., bem como na degradação da queratina mole. Nesse contexto, fatores como a perda de massa do substrato, liberação de peptídeos, aminoácidos, amônia, sulfato, grupos sulfidríla e alcalinização são indicadores da queratinólise; a perda de massa, é, todavia, o indicador mais confiável, uma vez que outras proteases microbianas não obtêm tal resultado (Korniłłowicz-Kowalska & Bohacz, 2011).

A produção de queratinases é afetada por fatores nutricionais e ambientais, de acordo com o metabolismo de cada organismo. Regulada especialmente através da indução pelo substrato, a secreção de queratinases pode sofrer repressão catabólica por fontes de carbono de fácil assimilação, bem como responder a presença de diferentes fontes proteicas (Anbu et al., 2007).

Dentre os diversos grupos bacterianos com representantes queratinolíticos (Tabela 6), destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* – com uma grande variedade de espécies – seguidos por exemplares de *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Chryseobacterium*, *Kocurya*, *Microbiospora* e *Fervidobacterium* (Brandelli et al., 2010). Entre os gêneros fúngicos podem ser citados *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Chrysosporium*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Microsporum*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichophyton* e *Urocladium*; entretanto, o valor comercial é comprometido devido a patogenicidade dos dermatofíticos (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010).

**TABELA 6** Microrganismos produtores de queratinases e condições de cultivo utilizadas

<b>Espécie</b>	<b>Condições de cultivo</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus cereus</i> Wu2	37 °C/ 96 h/ Penas 10 g/L	Lo et al., 2012
<i>Bacillus halodurans</i> PPKS-2	37 °C/ 48 h/ Farinha de soja 0,5%	Prakash et al., 2010
<i>Bacillus licheniformis</i>	50 °C/ 96 h/ Pena moída 10 g/L	Lin et al., 1992
<i>Bacillus licheniformis</i> ER-15	37 °C/ 48 h/ Penas 0,5%	Tiwary & Gupta, 2010
<i>Bacillus pumilus</i> KS12	37 °C/ 24 h/ Penas 0,5%	Rajput & Gupta, 2013
<i>Bacillus pumilus</i>	35 °C/ 216 h/ Pelo bovino 10 g/L	Kumar et al., 2008
<i>Bacillus</i> sp. P45	30 °C/ 96 h/ Farinha de pena 10 g/L	Daroit et al., 2011
<i>Bacillus</i> sp. P7	30 °C/ 96 h/ Farinha de pena 10 g/L	Corrêa et al., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	28 °C/ 24 h/ Penas 10 g/L	Cai et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i> NRC 3	37 °C/ 24 h/ Penas 5 g/L	Tork et al., 2013
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	37 °C/ 168 h/ Penas 10 g/L	Sahoo et al., 2012
<i>Aspergillus oryzae</i>	30 °C/ 120 h/ Penas 10 g/L	Farag & Hassan, 2004
<i>Clostridium sporogenes</i> bv. <i>pennavorans</i>	42 °C/ 168 h/ Penas 10 g/L	Ionata et al., 2008
<i>Chryseobacterium</i> L99	30 °C/ 30 h/ Penas 40 g/L	Lv et al., 2010
<i>Doratomyces microsporus</i>	30 °C/ 96 h/ Farinha de soja 5 g/L	Gradisar et al., 2005
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	70 °C/ 48 h/ Penas 8 g/L	Nam et al., 2002
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> AD-11	60 °C/ 96 h/ Lã 0,1%	Gegeckas et al., 2015
<i>Kocuria rósea</i>	40 °C/ Penas 20 g/L	Bernal et al., 2006
<i>Lysobacter</i> sp. NCIMB 9497	25 °C/ 336 h/ Pó de queratina 2%	Allpress et al., 2002
<i>Meiothermus</i> sp. I40	55 °C/ 28 h/ Pó de pena 0,8 g/L	Kuo et al., 2012
<i>Paecilomyces marquandii</i>	30 °C/ 120 h/ Farinha de soja 5 g/L	Gradisar et al., 2005
<i>Paenibacillus woosongensis</i> TKB2	30 °C/ Penas 0,75%	Paul et al., 2013
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	23 °C/ 48-96 h/ Lã 10 g/L	Fang et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. 2M21	28 °C/ 132 h/ Penas 5 g/L	Demir et al., 2015
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	30 °C/ 168 h/ Penas 0,1%	Syed et al., 2009

**FONTE:** Elaborado pela autora.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Avaliação do potencial queratinolítico**

Para este estudo foi avaliada a linhagem FTC01PR01 de *Bacillus subtilis* pertencente a coleção de microrganismos probióticos para nutrição animal da empresa Fatec (Fatec Indústria de Nutrição e Saúde Animal Ltda).

A manutenção da linhagem em laboratório foi realizada em placas de agar triptona de soja (TSA) incubadas por 24 h a 37 °C para crescimento e posteriormente armazenadas em geladeira e renovadas a cada 15 dias.

A avaliação de potencial queratinolítico deu-se por inoculação de colônias recentes (TSA, 24 h, 37 °C) em meio de cultura agar farinha de pena (NaCl 0,5 g/L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L<sup>-1</sup>, farinha de pena 1%, agar 1,5%), consoante desenvolvido por Correa (2009); o qual foi mantido a 37 °C por 48 h.

### **4.2 Padronização do pré-inóculo para os cultivos submersos**

Os pré-inóculos para os cultivos submersos foram feitos inoculando-se a bactéria em placas de agar triptona de soja (TSA) por 24 h a 37 °C. Após esse tempo, algumas colônias foram suspensas em solução salina estéril até atingirem uma leitura de 0,4 UA em espectrofotômetro a 600 nm (UV Mini 1240

– Shimadzu). Os meios de cultivo foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo com absorvância de 0,4 UA (600 nm) para cada 100 mL de meio de cultura.

### **4.3 Degradação de substratos queratinosos**

A degradação de substratos queratinosos foi testada pela proteólise da queratina e crescimento, em frascos Erlenmeyer com 100 mL dos meios: caldo farinha de pena (NaCl 0,5 g/L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L<sup>-1</sup>, farinha de pena 1%), caldo pena – branca/melanizada - (NaCl 0,5 g/L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L<sup>-1</sup>, pena 1%) e caldo cabelo (NaCl 0,5 g/L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L<sup>-1</sup>, cabelo humano 1%) a 37 °C por 96 h em incubadora com agitação (125 x g). A farinha de pena utilizada como substrato foi obtida da empresa Santista (RS/Brasil) e foi produzida por processamento de cocção sob pressão e moagem. As penas brancas e melânicas são provenientes de aves urbanas e o cabelo humano utilizado como fonte de α-queratina foi obtido por doação.

O procedimento deu-se por coleta, a cada 24 h, de 2 mL do caldo de cultura, o qual foi centrifugado (10000 x g por 5 min) e separado o sobrenadante para os testes posteriores. Após 10 dias de cultivo o caldo foi filtrado para separação da massa insolúvel e a massa não degradada; após secagem em estufa a 37 °C por 1 h, o material foi pesado em balança (Shimadzu AX200) para quantificação da biomassa residual.

A análise da produção enzimática e proteínas solúveis nos diferentes substratos foi realizado por ensaio com azocaseína e quantificação de proteínas conforme descrito nos itens 4.4 e 4.9 em triplicata.

#### **4.4 Ensaio de atividade enzimática**

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato, conforme descrito por Correa (2009). A reação iniciou-se misturando-se 100 µL da enzima/sobrenadante de cultivo com 100 µL de tampão Tris-HCl (0,5 M pH 8,0) e 100 µL do substrato azocaseína (10 mg/mL). Essa mistura, posteriormente incubada por 30 min a 37 °C teve a reação interrompida pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a 10000 x g por 5 min, 800 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de NaOH 1,8 M. A leitura da amostra foi determinada em espectrofotômetro (UV Mini 1240 – Shimadzu) no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. O teste de proteólise para cada amostra testada foi realizado em triplicata.

#### **4.5 Produção da enzima**

A produção de queratinase foi conduzida por cultivo do microrganismo em frascos Erlenmeyer com 500 mL do meio de cultura caldo farinha de pena (NaCl 0,5 g/L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L<sup>-1</sup>, farinha de pena 1%), durante 96 h, em incubadora com agitação (125 x g), na temperatura de 37 °C. Decorrido o tempo necessário, alíquotas foram centrifugadas (10000 x g por 5 min) para separação da biomassa celular e substâncias insolúveis.

#### **4.6 Precipitação proteica com sulfato de amônio**

A cepa probiótica de *B. subtilis* FTC01PR01 cultivada nas condições necessárias à produção da enzima, com o volume do cultivo de 500 mL, teve seu sobrenadante retirado após centrifugação (10000 x g por 5 min) e precipitado com 390 g/L de sulfato de amônio. Tal quantidade de sal corresponde a faixa ótima de saturação para precipitação da enzima, entre 0 e 60%. Para determinação da faixa ótima de saturação, foram realizados pré-testes de precipitação levando-se em consideração as faixas de saturação de 0 a 20, 20 a 40, 40 a 60, 60 a 80 e 80 a 100% e o volume de sobrenadante sujeito à precipitação (Scopes, 1994). Para a avaliação da presença de enzimas após cada etapa fez-se ensaios de atividade enzimática com azocaseína conforme descrito no item 4.4 em triplicata.

Após a adição do sulfato de amônio para saturação de 0 a 60%, a suspensão formada foi mantida por 1 h sob agitação e, após, mais 24 h em repouso sob refrigeração. Finalmente, a suspensão foi centrifugada (10000 x g por 15 min), e o precipitado ressuspense em tampão Tris-HCl (0,5 M pH 8,0).

Para confirmação da atividade enzimática após a precipitação proteica foi realizado teste enzimático (triplicata) com azocaseína conforme descrito no item 4.4

## **4.7 Purificação da enzima**

### **4.7.1 Cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-75)**

A suspensão resultante da etapa de precipitação foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-75) em volume de 1 mL por processo de purificação. A coluna (41,49 x 0,8 cm), com fluxo de 0,16 mL/minuto, foi eluída com tampão Tris-HCl (0,5 M; pH 8,0), sendo coletadas 50 frações de 1 mL cada. Para cada fração foram realizados o ensaio enzimático (conforme o item 4.4) e a estimativa da concentração de proteínas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro a 280 nm. A relação resultante entre a concentração de proteínas e a atividade enzimática foi expressa graficamente por uma cromatograma produzido pelo software Excel.

### **4.7.2 Cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose)**

As frações identificadas com maior atividade proteolítica após análise do cromatograma foram reunidas e aplicadas, em alíquotas de 2,5 ml, em coluna (8,7 x 0,65 cm) de cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose) com fluxo de 0,6 mL/minuto, sendo coletadas 60 frações de 1 mL cada. A amostra foi eluída com 10 mL de tampão Tris-HCl (0,5 M pH 8,0) e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M (10 mL para cada concentração: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 M). A absorbância a 280 nm e a atividade enzimática (U/mL) das frações coletadas (1 mL) foram determinadas.

### **4.7.3 Cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose)**

As frações reunidas da cromatografia de troca aniônica foram aplicadas em coluna (10,5 x 0,65 cm) de cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose) com fluxo de 0,6 mL/minuto, sendo coletadas 60 frações de 1mL cada. A amostra foi eluída com tampão Tris-HCl (0,5 M pH 8,0) e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. A absorvância a 280 nm e a atividade enzimática (U/mL) das frações coletadas foram determinadas.

## **4.8 Eletroforese de proteínas**

### **4.8.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida**

O padrão protéico de cada fase (cultivo, precipitação, purificação em G-75, purificação em DEAE-Sepharose) foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo as condições padrão estabelecidas por Laemmli (1970).

Alíquotas com 40 µg de proteína foram adicionados ao tampão de amostra (para o volume final de 25 µL), o qual foi preparado com 1 mL de tampão Tris-HCl (0,5 M; pH 8,6); 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de solução de SDS (100 g/L); 0,4 mL de β-mercaptoetanol; 0,4 mL de solução de azul de bromofenol (10 g/L); e 3,8 mL de água destilada. Esta mistura foi incubada a 100 °C por 5 min e, a seguir, aplicada em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (150 V e 25 mA), e a observação de bandas possibilitada após coloração do gel com nitrato de

prata. Para avaliação da massa molecular foi aplicado no gel o marcador Mark12™ Unstained Protein Standard (Life Technologies), que apresenta proteínas na faixa de 2.5 a 200 kDa.

#### **4.8.2 Zimograma**

A zimografia se desenvolveu em gel de poliacrilamida 16% copolimerizado com gelatina (1 mg/mL), conforme desenvolvido por Daroit (2011). As amostras de cada fase (extrato bruto, precipitação, G-75, DEAE) foram diluídas em mesmo tampão de amostra e quantidade do item 3.8.1, exceto pela exclusão do agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol) e desnaturação por calor. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com tampão Tris-HCl (0,05 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 2,5% por 30 min e então, incubado com Tris-HCl (0,05 mM pH 8,0) contendo 0,5% de  $\text{NaN}_3$  a 37 °C durante 12 h. Em seguida, o gel foi fixado com metanol 50% contendo 10% de ácido acético e corado com Comassie Blue. As bandas descoradas no gel indicam a presença da atividade de enzimas proteolíticas.

#### **4.9 Determinação da concentração de proteínas solúveis**

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel das amostras de cada fase (cultivo, precipitação, purificação em G-75 e purificação em DEAE-Sepharose) foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, consoante método descrito por Lowry et al. (1951). Neste processo, trabalha-se com dois reagentes: o reagente combinado (RC), preparado com 0,5 mL de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5%, 0,5 mL de tartarato de Na/K 1% e solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%) em NaOH 0,1M até o

volume de 50 mL; e o reagente de Folin-Ciocalteu (FC), diluído (1:1) com água destilada.

Para a reação misturou-se 100  $\mu$ L de amostra a 2,5 mL de RC, deixando 10 min a temperatura de 37 °C. Adicionou-se 300  $\mu$ L do reagente de FC diluído, deixando a temperatura ambiente por mais 30 min. As determinações de proteína solúvel de cada ponto foram realizadas em triplicata e medida a absorbância a 750 nm em espectrofotômetro (UV Mini 1240 – Shimadzu). A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

#### **4.10 Caracterização da queratinase purificada**

##### **4.10.1 Determinação da temperatura ótima para a atividade enzimática**

Para determinação da temperatura ótima de atividade enzimática, utilizou-se a metodologia já descrita no item 4.4, variando-se apenas as temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas foram 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Determinam-se as atividades relativas considerando-se como 100% a temperatura com maior atividade enzimática. O teste foi realizado em triplicata para cada temperatura.

##### **4.10.2 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática**

O ensaio para determinação do pH ótimo da atividade enzimática foi realizado da mesma maneira descrita no item 4.4, substituindo-se apenas o

tampão utilizado pelos tampões acetato 0,2 M (pH 4,0 e 5,0), fosfato 0,2 M (pH 6,0 e 7,0), TRIS-HCl 0,5 M (pH 8,0 e 9,0) e carbonato 0,2 M (pH 10,0 e 11,0). Determinaram-se as atividades relativas considerando-se como 100% o pH no qual foi observada a maior atividade enzimática. O teste foi realizado em triplicata para cada pH.

#### **4.10.3 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se a enzima purificada (em triplicatas) por 0, 15, 30, 45, 60 e 90 min em temperaturas de 37 e 55 °C. Após este período de pré-incubação, foi realizado o ensaio enzimático empregando o substrato azocaseína e utilizando as condições ótimas de temperatura e pH estabelecidas para a enzima (item 4.4). A atividade residual da enzima nestes testes é expressa como porcentagem da atividade enzimática apresentada no tempo zero (controle).

#### **4.10.4 Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática**

O efeito de diferentes detergentes sobre a atividade enzimática foi avaliado através da pré-incubação da enzima (em triplicatas) com o respectivo detergente por 10 min em temperatura ambiente. Os detergentes testados foram os seguintes: SDS, Triton X-100 e Tween-20, em concentração de 1%. Após este período, o ensaio enzimático foi realizado (item 4.4).

#### **4.10.5 Efeito de sais sobre a atividade enzimática**

Ensaio realizado método similar ao anteriormente descrito, exceto pela adição de sais em concentração de 5mM no meio reacional. Os sais testados para a queratinase purificada foram: CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KCl, LaCl<sub>3</sub>, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, NaCl, SrCl<sub>2</sub> e ZnSO<sub>4</sub>. O teste foi realizado em triplicata para cada sal.

#### **4.10.6 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática**

O efeito de solventes foi avaliado de forma similar ao ensaio já descrito, exceto pela adição de solventes em concentração de determinadas concentrações ao meio reacional. A pré-incubação foi realizada por 10 min à temperatura ambiente e os solventes utilizados: DMSO (1%), isopropanol (1%) e β-mercaptoetanol (5mM). O teste foi realizado em triplicata para cada tratamento.

#### **4.10.7 Efeito de inibidores de protease sobre a atividade enzimática**

O efeito de inibidores enzimáticos deu-se utilizando método similar aos itens anteriores exceto pela utilização de inibidores nas concentrações indicadas no meio reacional. Após a pré-incubação da enzima (em triplicata) com inibidor por 10 min a temperatura ambiente realizou-se o ensaio proteolítico. Os inibidores utilizados foram: EDTA (5 mM) e PMSF (2 mM). O controle foi realizado através da realização da atividade enzimática sem a adição de inibidores.

#### **4.10.8 Efeito do íon manganês sobre a estabilidade térmica da enzima**

O ensaio para avaliar o efeito do íon manganês sobre a estabilidade térmica foi realizado utilizando-se o sal  $MnSO_4$  em concentração de 5mM. Para o teste, triplicatas da enzima foram pré-incubada a 55 °C em presença ou ausência do sal, entre 30 e 60 min. Após, procedeu-se o teste com azocaseína (conforme item 4.4); determinou-se como 100% a atividade da enzima não pré-incubada.

#### **3.11 Análise estatística**

Para avaliação dos dados obtidos foram utilizados Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey, desenvolvidos com o programa estatístico Assistat versão 7.7.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Avaliação do potencial queratinolítico**

A utilização do gênero *Bacillus* como fonte de organismos probióticos para bacterioterapia ou bacterioprevenção tem sido fundamentada pela inúmera quantidade de artigos e fármacos registrados para este fim (Green et al., 1999; Duc et al., 2004; Cutting, 2011). No entanto, apesar do gênero ser comumente utilizado pela indústria de proteases, ainda não há relatos sobre linhagens probióticas de *Bacillus* que apresentem potencialidade para a produção de queratinases, sabendo que, tais proteases podem suplementar a dieta de animais monogástricos para aumentar a digestibilidade de proteínas (Daroit, 2011).

O crescimento em agar farinha de pena, oportunizado pela degradação enzimática da queratina foi comprovado após 24 h pela presença visível de colônias do microrganismo; com isso, foram realizados os testes de degradação de substratos queratinosos.

### **5.2 Degradação de substratos queratinosos**

O tempo médio necessário para crescimento do microrganismo e produção de queratinases costuma variar entre 24 (Tork et al., 2013) e 168 h

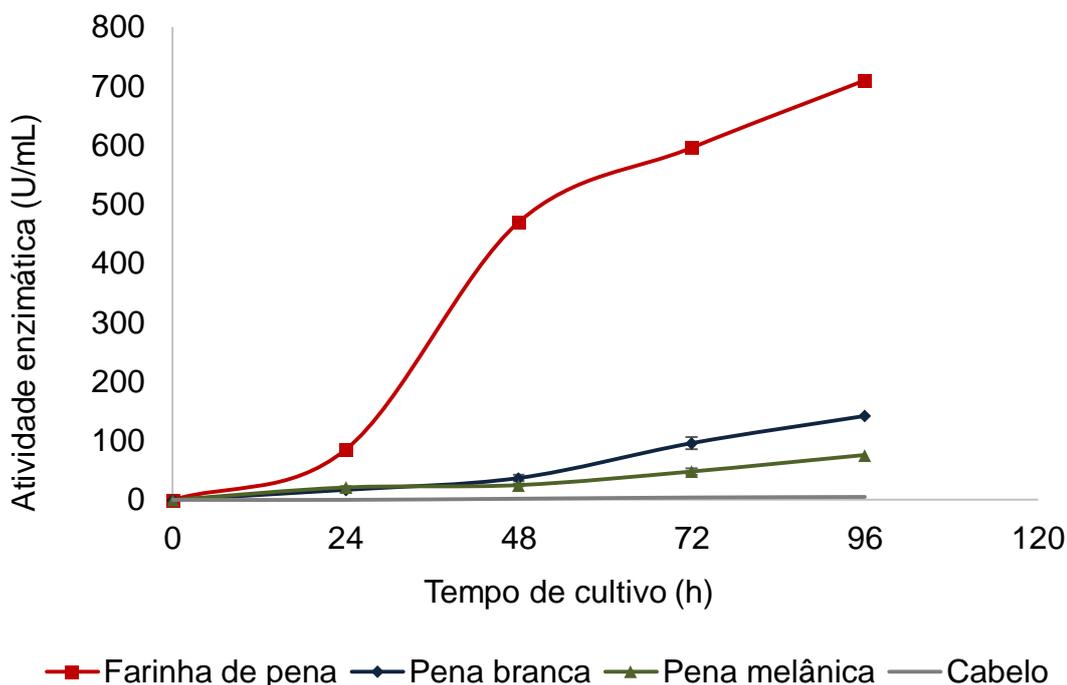
(Mousavi et al., 2013) em linhagens de *Bacillus* e demais produtores como *Streptomyces* e *Microbacterium* (Daroit, 2011); podendo alcançar 5 semanas de cultivo em alguns fungos (Anbu et al., 2006). Ressalta-se que, intimamente ligado ao tempo de cultivo, está a concentração e o tipo de substrato queratinoso; fontes nativas de  $\alpha$ -queratina demandam, geralmente, mais de 5 dias (Kumar et al., 2008; Balaji et al., 2008); enquanto a farinha de pena pode requerer menos de 24 h (Casarin et al., 2008).

A composição do meio de cultura exerce papel crucial para a determinação das enzimas extracelulares produzidas pela célula; portanto, a adição de complementos nutricionais como peptídeos hidrolisados e carboidratos pode induzir repressão catabólica. A presença de queratina como fonte única de carbono e nitrogênio estimula, em microrganismos competentes para tal, a secreção de queratinases no meio extracelular (Daroit, 2011; Jeevana-Lakshmi et al., 2013).

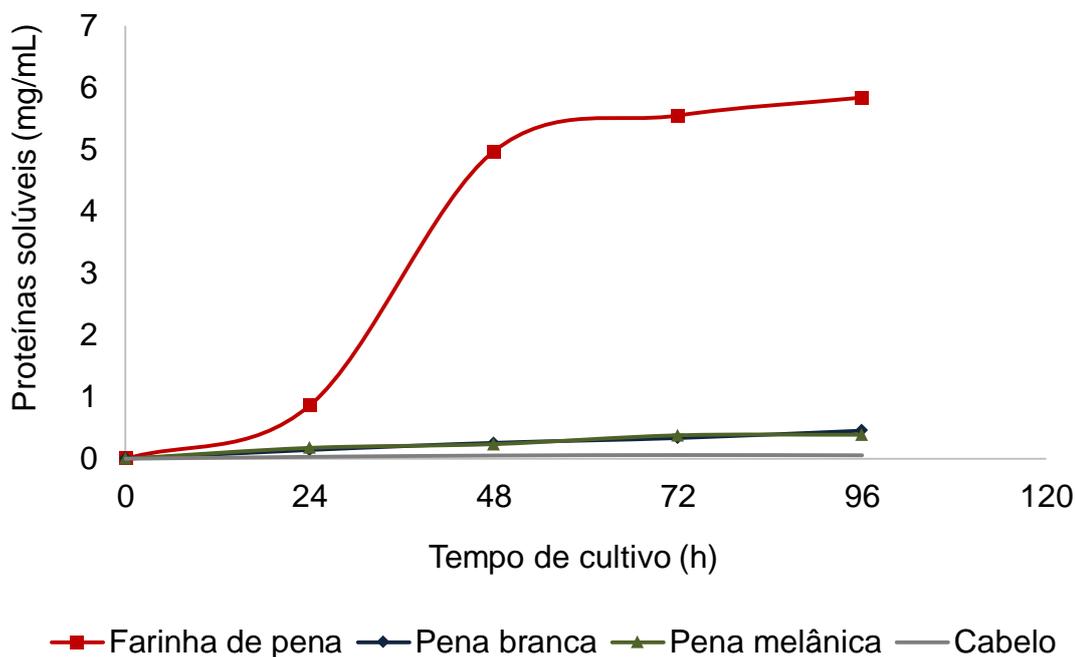
Adigüzel e colaboradores (2009), em um estudo que avaliou a produção sequencial de colagenases, elastases e queratinases por duas linhagens de *Bacillus cereus*, concluíram que, a secreção de proteases depende diretamente da disponibilidade de peptídeos (e não da presença de queratina), não apresentando repressão por fontes adicionais de carbono, como a maltose, a qual, aliás, afetou positivamente a formação de biomassa. Cai & Zheng (2009), contrariamente, observaram efeito negativo da glicose e maltose sobre a produção de proteases em *B. subtilis*. A utilização de complementos, como açúcares e peptona, torna-se então, opcional e dependente do metabolismo de cada microrganismo, podendo surtir efeito estimulante ou inibitório; da mesma

forma, diferentes fontes proteicas, como a farinha de soja, podem induzir a liberação de proteases queratinolíticas no meio de cultura de forma indireta, tal qual a queratina, pela limitação do nitrogênio disponível (Adigüzel, 2009).

Os ensaios com azocaseína permitiram verificar existência e funcionalidade das enzimas secretadas no extrato bruto. Considerando-se que a produção máxima de proteases ocorra na fase estacionária devido ao estresse nutricional e que um longo período de incubação durante uma fase estacionária prolongada possa elevar a produção enzimática (Gupta et al., 2003), a determinação do tempo de cultivo foi testada entre 24 e 96 h.



**FIGURA 1** Quantificação da atividade enzimática (U/mL) em diferentes substratos: farinha de pena, pena branca, pena melânica e cabelo durante 24, 48, 72 e 96 h de cultivo a 37 °C.



**FIGURA 2** Quantificação de proteínas solúveis produzidas em diferentes substratos (farinha de pena, pena branca, pena melânica e cabelo) durante o período de cultivo (24, 48, 72 e 96 h) a 37 °C.

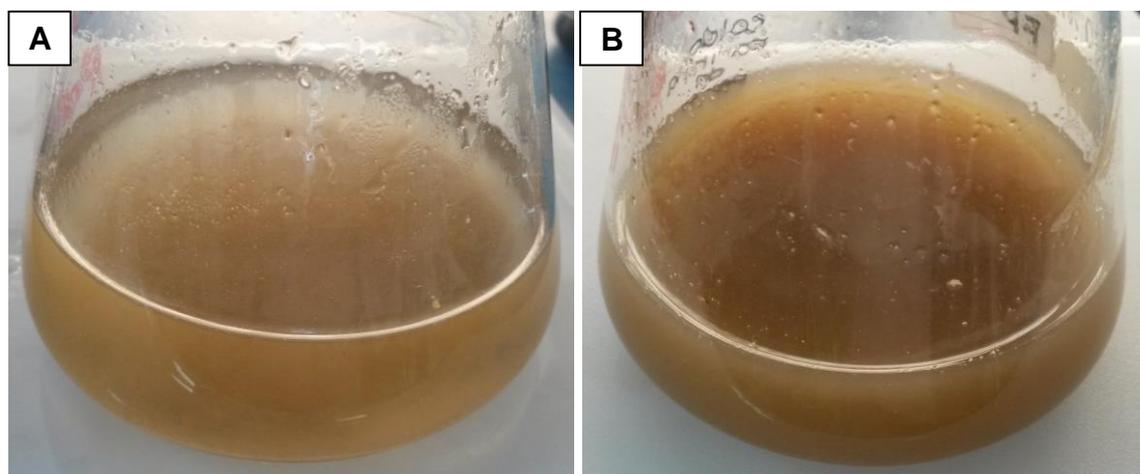
Conforme visto nas Figuras 1 e 2, tanto a atividade enzimática quanto a liberação de proteínas solúveis atingiram médias, ao menos, cinco vezes maiores na farinha de pena em comparação aos demais substratos, evidenciando a maior disponibilidade do resíduo. O pico de produção, encontrado no quarto dia de cultivo, superior a 700 U/mL, sinaliza um eficiente sistema para degradação; especialmente quando avaliado o nível de solubilização proteica (medida de degradação do substrato queratinoso) (Corrêa, 2009).

A degradação dos substratos pode ser visualizada nas Figuras 3-9. No caso das penas brancas, observa-se pela turbidez do meio e desintegração das penas (Figuras 4 e 7). Os valores de atividade proteolítica foram

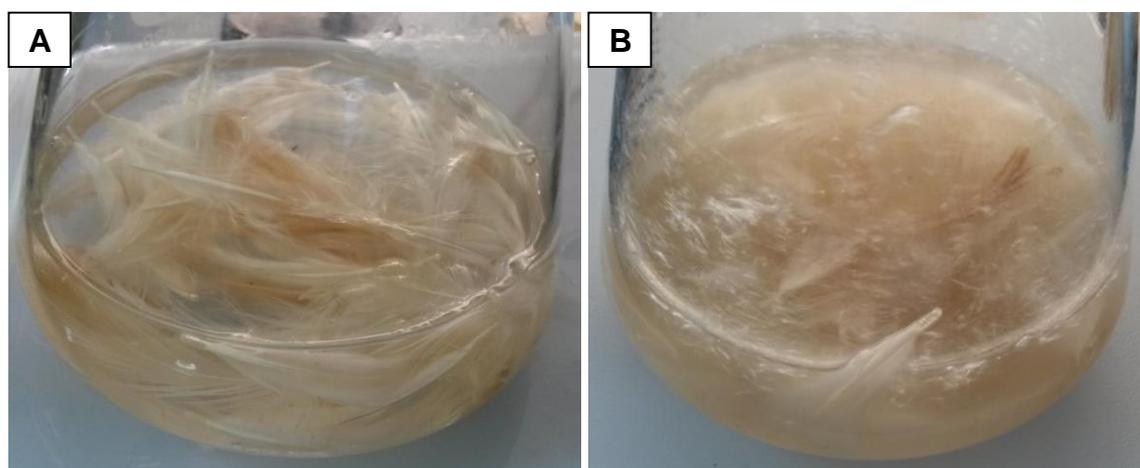
semelhantes a outros *Bacillus* queratinolíticos, como por exemplo, as linhagens 1270 e 1273 de *B. subtilis* e *B. licheniformis* 1274 (Mazotto et al., 2011) as quais apresentaram resultados próximos a 200 U/mL após 7 dias de cultivo. A variação de atividade enzimática encontrada nos meios com penas brancas e melanizadas, especialmente em 72 e 96 h de cultivo (valores com significante diferença estatística, Tabela 8 - apêndice), pode ser explicada pela maior resistência destas últimas a queratinólise por microrganismos. Consoante demonstrado por Gunderson e colaboradores (2008), em um estudo com uma cepa queratinolítica de *B. licheniformis*, penas não melanizadas são mais rapidamente degradadas do que penas melanizadas; pigmentos de coloração, como a melanina, aumentam a resistência da queratina à degradação bacteriana e a abrasão física. De igual forma, substratos pré-tratados, como a farinha de pena (cozida e moída) são mais facilmente hidrolisados do que substratos brutos, como penas e cabelos. Observa-se que, apesar da cultura com penas brancas demonstrar maior taxa proteolítica, a solubilização de proteínas manteve níveis estatisticamente iguais para ambos os meios (Tabela 9 – apêndice).

O cabelo humano, pela sua estrutura rígida, rica em  $\alpha$ -queratina, apresentou resultados próximos a zero para a atividade enzimática e proteínas solúveis (Figuras 1 e 2). Isto significa que, assim como outros microrganismos, esta linhagem de *B. subtilis* não consegue degradar a  $\alpha$ -queratina, mostrando-se inadequada para a utilização em processos de depilação do couro bovino e não patogênica para estruturas queratinosas de mamíferos, compostas, exclusivamente de  $\alpha$ -queratina.

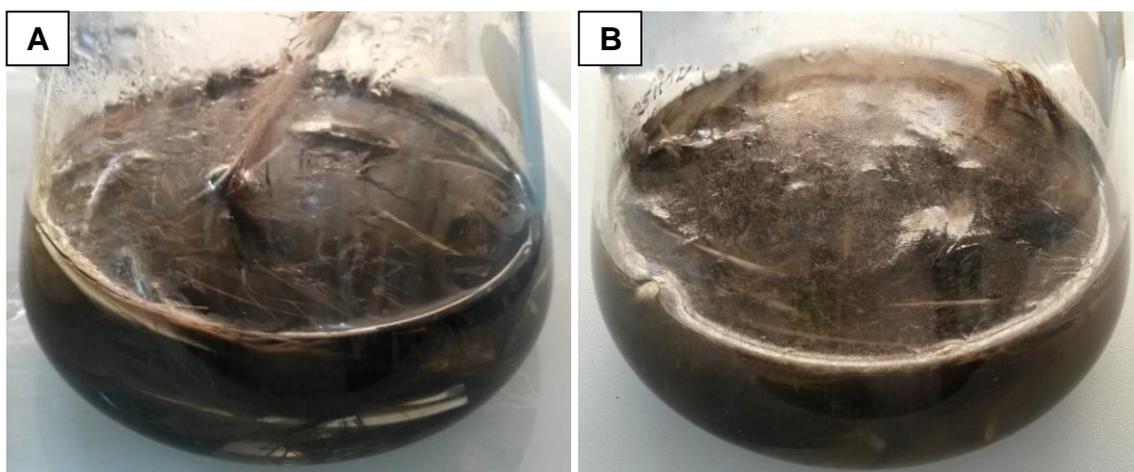
Após 10 dias de cultivo, o substrato residual da degradação foi quantificado por filtração e pesagem. Excetuando-se a farinha de pena, a qual foi totalmente consumida, o cultivo com penas brancas apresentou a melhor taxa de utilização, com 92,30% do substrato degradado (Figura 7). A cultura de penas melanizadas obteve valor menor: 60% de pena degradada (Figura 8); o cabelo não foi significativamente afetado, com 98,5% do substrato intacto (Figura 9).



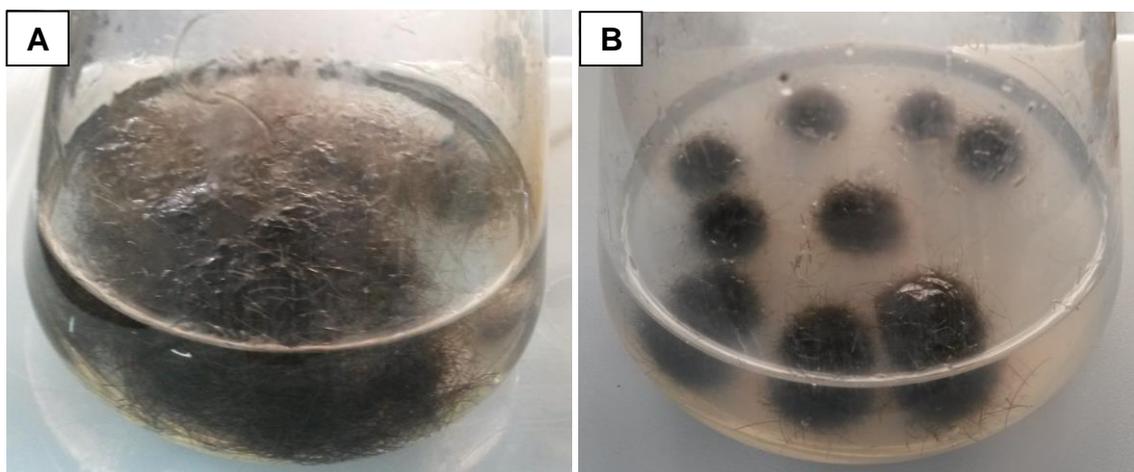
**FIGURA 3** Degradação do substrato queratinoso em caldo farinha de pena (CFP) por (A) 24 e (B) 96 h.



**FIGURA 4** Degradação do substrato queratinoso em caldo pena branca (CPB) por (A) 24 e (B) 96 h.



**FIGURA 5** Degradação do substrato queratinoso em caldo pena melânica (CPM) por (A) 24 e (B) 96 h.



**FIGURA 6** Degradação do substrato queratinoso em caldo cabelo (CC) por (A) 24 e (B) 96 h.



**FIGURA 7** Substrato queratinoso: pena branca. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 92,30% do substrato degradado.



**FIGURA 8** Substrato queratinoso: pena melânica. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 60% do substrato degradado.

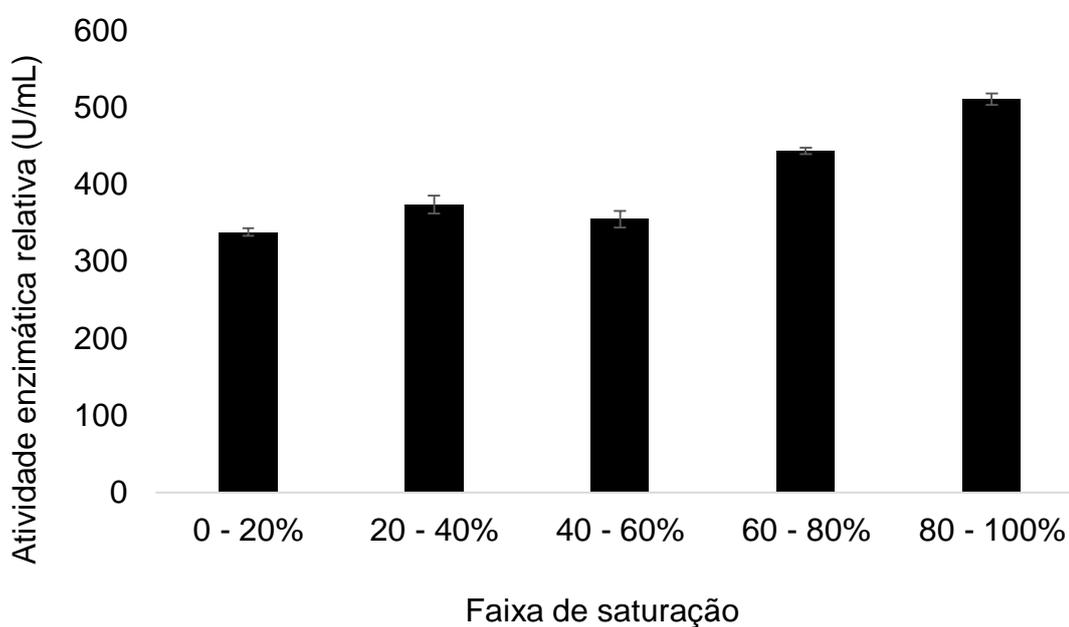


**FIGURA 9** Substrato queratinoso: cabelo humano. (A) Antes e (B) após 10 dias de cultivo; 98,5% do substrato intacto.

### 5.3 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação salina com sulfato de amônio permitiu restringir a variedade de proteínas e pequenos peptídeos resultantes da queratinólise ainda presentes do extrato bruto. Quanto maior, mais hidrofóbica ou menos polarizada for uma proteína, mais rápida é a sua precipitação (Queiroz et al., 2001). Assim,

como pode ser observado na Figura 10, houve precipitação já na primeira faixa de saturação, sendo observada atividade enzimática em todas as faixas testadas. Selecionou-se então, uma faixa de precipitação abrangente, de 0 – 60%, mantendo-se a atividade com baixa quantidade de sal; a concentração de proteínas resultante da precipitação aumentou para 1130 U/mL.



**FIGURA 10** Quantificação da atividade enzimática relativa (U/mL) do extrato bruto após precipitação proteica com sulfato de amônio em diferentes faixas de saturação.

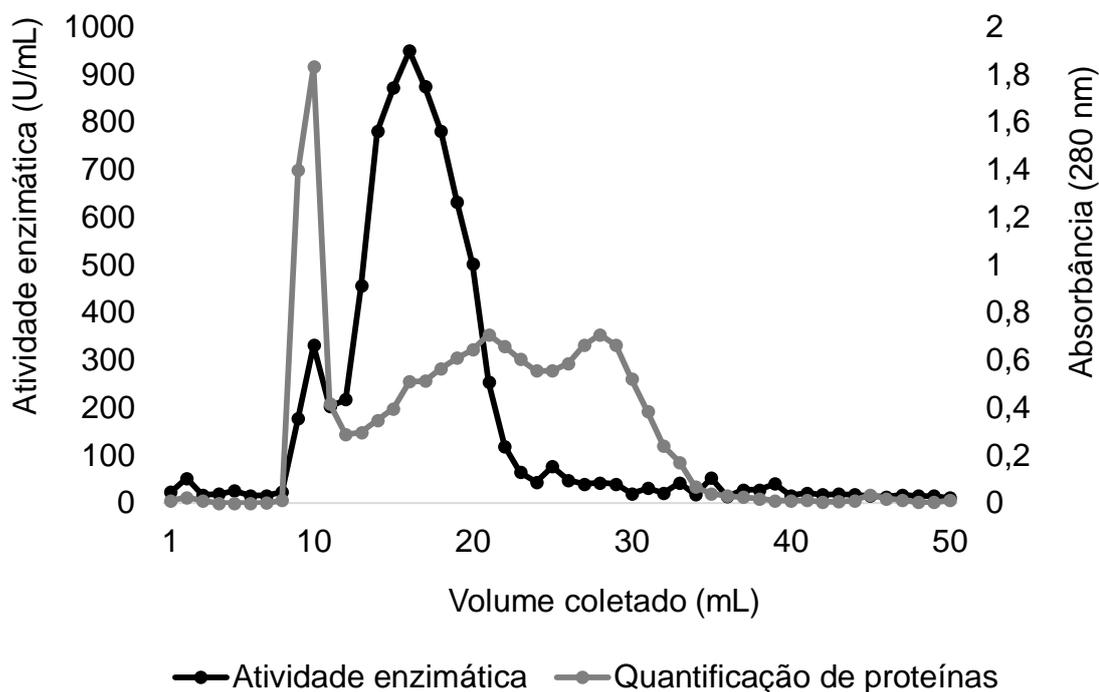
## 5.4 Purificação da enzima

### 5.4.1 Cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-75)

A cromatografia de gel-filtração tem como princípio a separação de proteínas exclusivamente com base no tamanho molecular. A matriz porosa, a qual constitui a coluna de purificação, apresenta diferentes graus de acesso, permitindo a passagem (por entre os poros) de moléculas que pertençam a uma determinada faixa de resolução; logo, moléculas maiores são excluídas da matriz e muito menores não sofrem separação. Assim, as proteínas são eluídas da coluna em ordem decrescente de tamanho (Hagel, 2001).

O cromatograma apresenta, não somente, uma análise gráfica de cada amostra purificada, como também, em quais alíquotas a enzima de interesse deve estar eluída; e, mantendo-se as mesmas condições em cada processo de cromatografia, dificilmente o resultado esperado torna-se divergente. A formação dos picos de concentração proteica e atividade enzimática em tempos diferentes possibilitou a obtenção de amostras mais purificadas, devido a eluição precoce de proteínas contaminantes (Figura 11).

A matriz de gel-filtração utilizada, Sephadex G-75 separa proteínas entre 3 e 80 kDa. Queratinases de *Bacillus variam*, em média, de 30 a 40 kDa; proteínas da queratina de pena possuem 10,4 kDa, compondo a estrutura de forma homogênea (Kornilowicz-Kowalska & Bohacz, 2011).



**FIGURA 11** Cromatograma da purificação em coluna de gel-filtração Sephadex G-75.

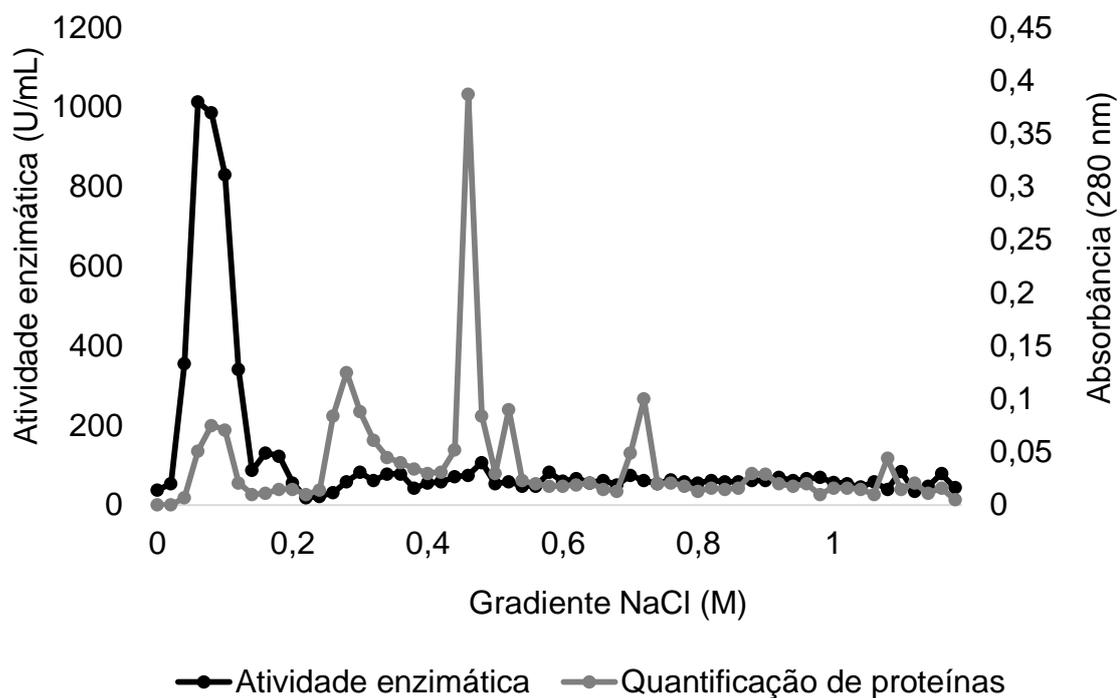
#### 5.4.2 Cromatografia líquida de troca aniônica (DEAE – Sepharose)

A cromatografia de troca iônica, como uma cromatografia de adsorção, depende de interações entre os diferentes tipos de moléculas da fase móvel e moléculas da fase estacionária; no caso de trocas iônicas, a separação dá-se pela ligação reversível de moléculas do soluto a grupos iônicos de carga oposta immobilizados no gel. A DEAE Sepharose (coluna de troca aniônica) constitui-se de uma matriz de polissacarídeo (agarose) ligada de forma covalente a cargas catiônicas (dietilaminoetanol – DEAE). Nesse contexto, peptídeos de carga elétrica negativa ligam-se aos grupos catiônicos da resina ao passo que são imediatamente eluídas as moléculas de carga positiva no denominado

“volume morto”. Peptídeos de carga negativa são posteriormente eluídos pelas concentrações crescentes de NaCl.

Consoante a gel filtração, os picos do cromatograma da purificação de troca aniônica foram gerados em diferentes tempos (Figura 12). Pode-se observar que, além da baixa concentração de proteínas (resultado de todo o processo de purificação), a eluição da enzima deu-se no volume morto; peptídeos ainda presentes na amostra foram eluídos com 0,4 M de NaCl.

Segundo Gupta e colaboradores (2003), proteases alcalinas são, geralmente, carregadas positivamente, portanto, não se ligariam a trocadores aniônicos, e requerem, como melhor opção, purificação em colunas catiônicas. Poderia-se sugerir, a partir dos dados obtidos, que a queratinase purificada possua carga positiva; entretanto, os resultados da SP-Sepharose contrariam tal hipótese.



**FIGURA 12** Cromatograma da purificação em coluna de troca aniônica DEAE-Sepharose.

#### 5.4.3 Cromatografia líquida de troca catiônica (SP – Sepharose)

Como explicado anteriormente, a cromatografia de troca catiônica, é também, uma cromatografia baseada na ligação reversível de grupos iônicos de carga oposta entre as moléculas do soluto e da matriz. Neste caso, o polissacarídeo é ligado covalentemente a cargas aniônicas (sulfopropil – SP). Por conseguinte, peptídeos com cargas negativas são eluídos no volume morto e peptídeos de carga positiva permanecem unidos ao gel até posterior eluição com NaCl.

A utilização de colunas de troca catiônica é menos recorrente em pesquisas com queratinases (Fakhfakh-Zouari et al., 2010); gel-filtração e purificação de troca aniônica são os principais métodos cromatográficos da

maior parte dos trabalhos publicados (Kumar et al., 2008; Cai et al., 2008; Rajput et al., 2010). Embora não seja comum ou viável o uso das duas técnicas (troca aniônica e catiônica), neste estudo, tal opção deu-se como meio de triagem após a eluição da enzima em volume morto da DEAE. Constatado igual resultado para a SP-Sepharose (eluição inicial da enzima em volume morto), aliado a purificação total obtida no processo anterior, manteve-se a DEAE-Sepharose como método padrão.

Lin e colaboradores (1992), demonstraram, a partir de uma eletroforese bidimensional, o ponto isoelétrico da queratinase de *B. licheniformis*; estimado o pI em 7,25 (próximo ao pH ótimo de atividade 7,5) verificou-se que a queratinase analisada era quase neutra. Nesse contexto, pôde-se concluir que a protease somente se ligaria aos trocadores aniônicos da coluna catiônica em pH ácido (inferior a 6,8). De igual forma ao ocorrido, a queratinase deste estudo, embora não determinado o pI, tem, possivelmente, carga elétrica próxima a neutralidade quando purificada em tampão de pH 8,0; não havendo, portanto, ligação aos trocadores aniônicos e catiônicos das cromatografias utilizadas.

## **5.5 Eletroforese de proteínas**

### **5.5.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A queratinase purificada da linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis* apresentou massa molecular semelhante à maioria das queratinases do gênero, com, aproximadamente, 31kDa. Convergente as

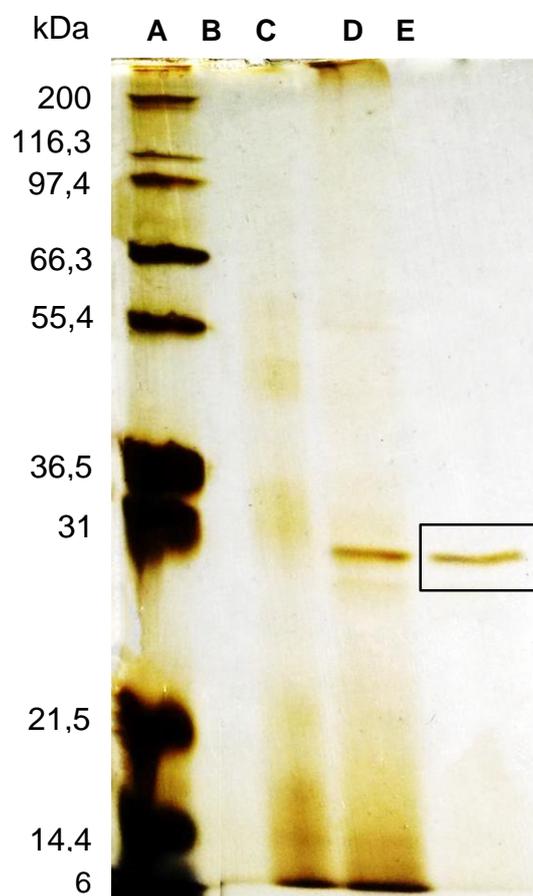
subtilisinas, as queratinases de *Bacillus* mantêm-se, em sua maioria, na faixa de 20 a 45 kDa. Proteínas diméricas, como a queratinase de *Bacillus licheniformis* ER-15 (Tiwary & Gupta, 2010), com 58 kDa (duas unidades: 28 e 30 kDa), são incomuns. Dentre as proteínas monoméricas, assemelham-se as queratinases de *Bacillus subtilis* KD-N2 (Cai et al., 2008): 30,5 kDa; *Bacillus subtilis* NRC 3 (Tork et al., 2013): 32 kDa; *Bacillus licheniformis* RPK (Fakhfakh et al., 2009): 32 kDa; *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Lin et al., 1992): 33 kDa; *Bacillus pumilus* A1 (Fakhfakh-Zouari et al., 2010): 34 kDa e *Bacillus licheniformis* FK14 (Suntornsuk et al., 2005): 35 kDa. Outras espécies, como *Chryseobacterium*, *Streptomyces*, *Fervidobacterium* e *Kocuria*, variam de 20 a 240 kDa (Brandelli et al., 2010).

Alguns trabalhos têm identificado, em purificações parciais, a presença de enzimas similares a dissulfeto redutases (*disulfite reductase-like protein*), as quais facilitam a proteólise pela quebra das ligações cisteídicas. Tais enzimas, de baixa – ou nenhuma – atividade queratinolítica, atuam em conjunto com a protease, efetivando a degradação da queratina (Yamamura et al., 2002). São exemplos a queratinase-I (30 kDa) de *Bacillus halodurans* PPKS-2 (Prakash et al., 2010) e a proteína tipo dissulfeto redutase (15 kDa) de *Stenotrophomonas* sp (Yamamura et al., 2002).

Conforme visualizado no gel (Figura 13) não foram observadas bandas para o extrato bruto (provavelmente devido a problemas de amostra/procedimento/concentração proteica); a amostra da precipitação apresentou algumas bandas difusas, dentre as quais proteínas de baixo peso molecular, tal qual os peptídeos hidrolisados de farinha de pena (10,4 kDa). A purificação em G-75 concentrou a queratinase, fato demonstrado pela banda

intensa próxima aos 31 kDa; no entanto, não houve diminuição significativa dos contaminantes, representados, ao menos, por duas bandas abaixo de 14,4 kDa e uma acima de 55,4 kDa.

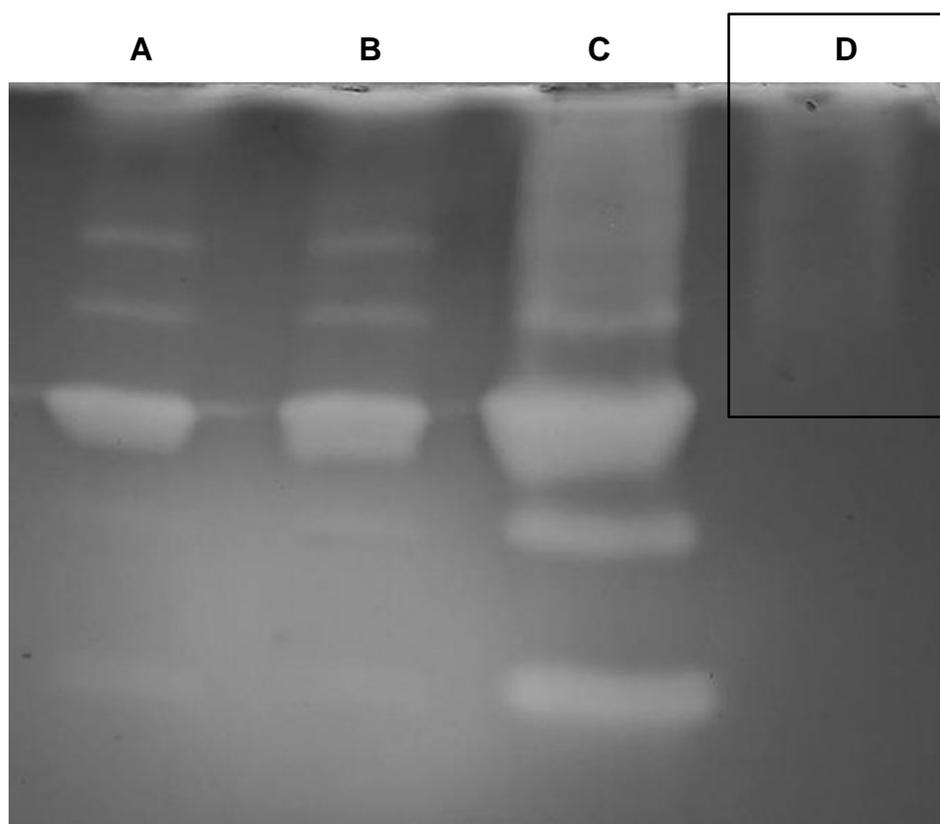
A purificação em coluna de troca iônica restringiu ao máximo as proteínas em solução, restando apenas a queratinase concentrada.



**FIGURA 13** SDS-PAGE do perfil proteico em CFP: (A) marcador de peso molecular; (B) extrato bruto; (C) precipitação com sulfato de amônio; (D) purificação em G-75; (E) purificação em DEAE.

### 5.5.2 Zimografia

O zimograma (Figura 14), no qual foram visualizadas as proteases ativas, pela degradação da gelatina copolimerizada, apresentou, para a enzima purificada em DEAE uma pequena área difusa de degradação na parte superior do gel. A amostra obtida pela purificação em G-75 demonstrou, dentre todas, atividade enzimática mais intensa, resultado dos processos de concentração proteica; o extrato bruto e a purificação com sulfato de amônio demonstraram perfis semelhantes de atividade enzimática.



**FIGURA 14** Zimograma do perfil proteico em CFP: (A) extrato bruto; (B) precipitação com sulfato de amônio; (C) purificação em G-75; (D) purificação em DEAE.

### 5.6 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A determinação da concentração de proteínas solúveis com o reagente de Folin-Ciocalteu produziu uma curva padrão de BSA com  $R^2 = 0,9922$ . A partir da equação gerada pelo gráfico resultante ( $y = 5,3332x + 0,0163$ ) quantificou-se a concentração proteica de cada fase. Amostras do extrato bruto e precipitação foram diluídas em 1/10 e 1/20, respectivamente, devido a grande concentração proteica.

**TABELA 7** Tabela de purificação da queratinase da linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis*.

	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade total (U)</b>	<b>Atividade específica (U/mg)</b>	<b>Fator de purificação</b>
<b>Extrato bruto</b>	1922	35100	182.6	1.0
<b>Precipitação com Sulfato de Amônio</b>	75.5	2260	299.3	1.6
<b>Sephadex G-75</b>	11.4	1728	1515.8	8.3
<b>DEAE Sepharose</b>	4.9	1574	3213.1	17.6

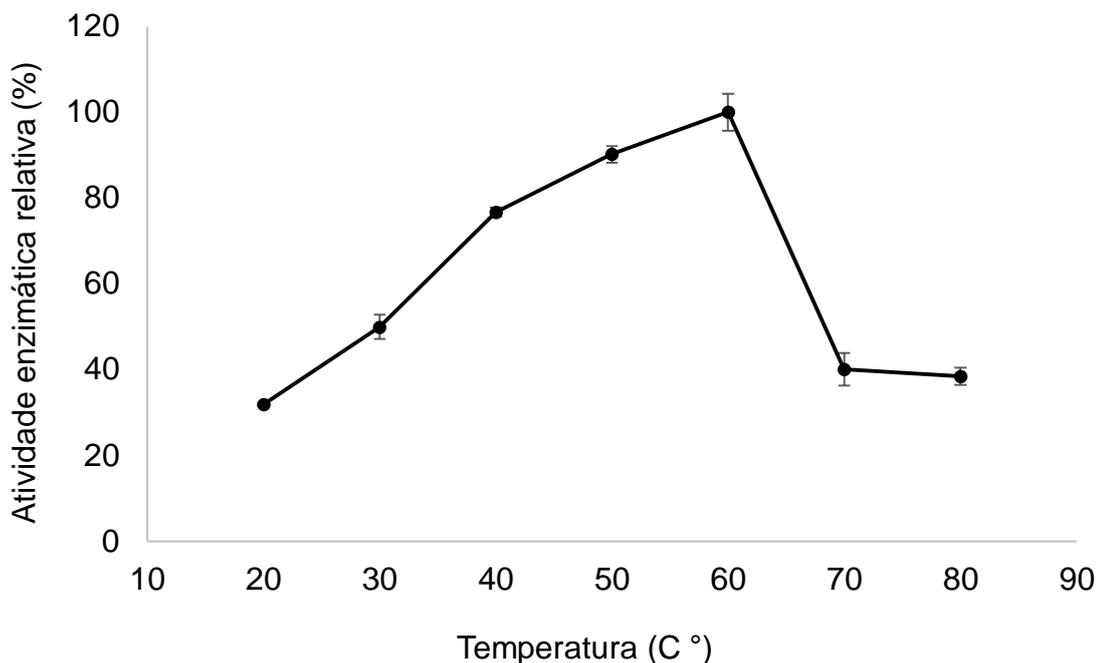
## 5.7 Caracterização da queratinase purificada

### 5.7.1 Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática e termoestabilidade.

Temperatura e estabilidade térmica são fatores cruciais para a atividade enzimática; quanto mais elevada a temperatura, maior é a energia livre, e é essa energia que rompe as ligações intramoleculares que mantêm a proteína em sua estrutura terciária. Mudanças conformacionais alteram o sítio catalítico para além da sua capacidade de acomodar as moléculas do substrato, inativando a enzima.

Proteases comerciais, assim como proteases tipo subtilisina, possuem, em geral, propriedade alcalinas e termoestáveis, características necessárias a diversas aplicações, entre elas, o uso em detergentes. Entretanto, a procura por enzimas ativas em temperaturas mais baixas, ou que apresentem termolabilidade como mecanismo regulatório, tem despertado interesse de outros ramos da indústria (Gupta et al., 2003).

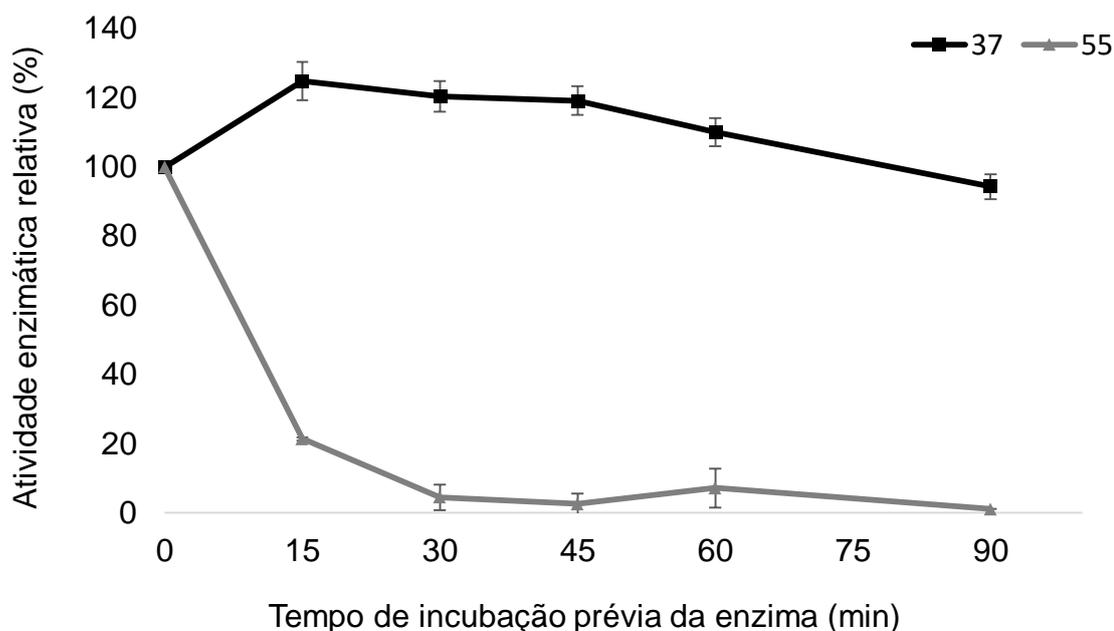
A queratinase purificada de *B. subtilis*, assim como outras proteases do gênero (Cai et al., 2008; Fakhfakh-Zouari et al., 2010; Rajput et al., 2010), apresentou temperatura ótima em torno de 60 °C (Figura 15), com perda substancial de atividade em temperatura superior (Tabela 10 – apêndice).



**FIGURA 15** Determinação da temperatura ótima para atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% a temperatura de maior atividade (U/mL).

Em ensaio de estabilidade térmica a 37 e 55 °C (Figura 16), a enzima demonstrou baixa termoestabilidade, perdendo 80% de sua atividade após incubação por 15 min a 55 °C. Embora tenha apresentado 60 °C como temperatura ótima, falta à enzima termoestabilidade para manter-se funcional em tempos maiores e termotolerância para com temperaturas mais elevadas. No ensaio a 37 °C, houve melhora (+ 20%) da proteólise até 45 min de incubação, decaindo após 1 h para próximo do valor inicial (100%); a enzima permaneceu estável até 1,5 h de incubação (Tabela 11 – apêndice). Estabilidade e atividade (80%) em temperaturas moderadas (40 °C) são potencialmente úteis em processos de conversão de biomassa para produção de ração animal a partir

de substratos queratinosos e demais aplicações que não demandem alto consumo energético.



**FIGURA 16** Gráfico da estabilidade térmica da queratinase frente a incubação a 37 e 55 °C. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) sem incubação prévia da enzima.

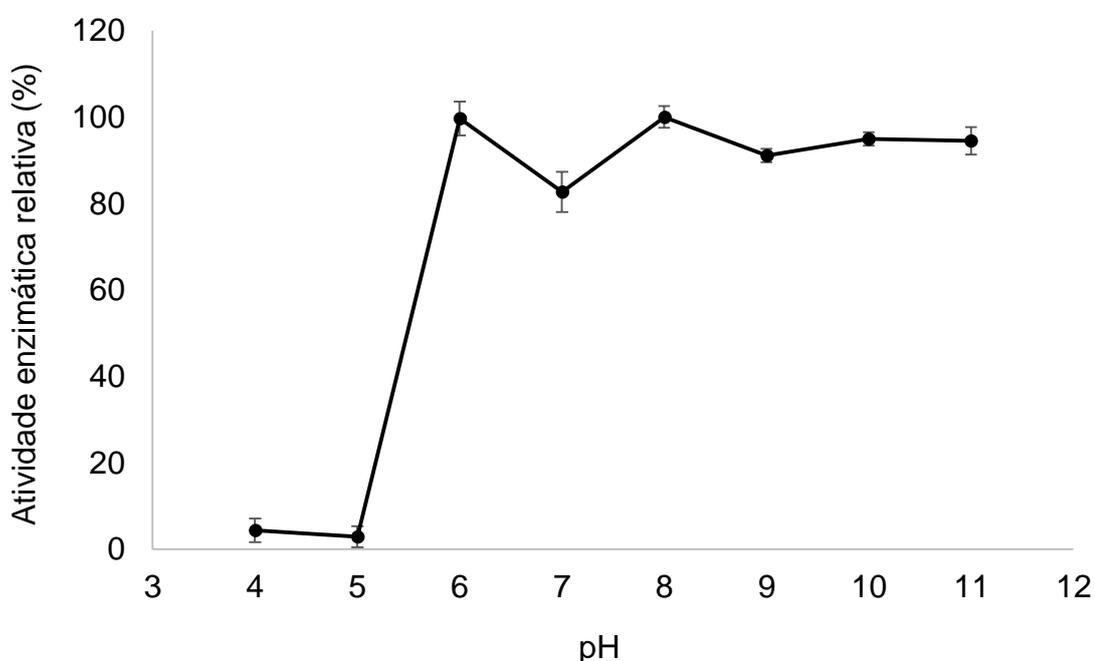
### 5.7.2 Determinação do pH ótimo para atividade enzimática

Variações de pH podem afetar positiva ou negativamente a atividade enzimática. A protonação e desprotonação de grupos polares (bem como alterações nas forças de atração e repulsão em grupos apolares) perturbam a estabilidade das ligações intramoleculares, podendo levar a perda conformacional do sítio ativo, tal qual ocorre em temperaturas elevadas.

Apresentando características de uma protease alcalina, a queratinase de *B. subtilis* obteve atividade enzimática elevada em todas as faixas de pH

neutro (6.0 a 8.0) e alcalino (9.0 a 11.0) avaliadas (Figura 17); com valores estisticamente iguais (Tabela 12 – apêndice). Queratinases de *Bacillus subtilis* demonstram, não raramente, características alcalinas, com atividade em uma larga gama de pH: 6,0 (Balaji et al., 2008); 7,0 (Pillai & Archana, 2008); 8,0 (Tork et al., 2013); 8,5 (Cai et al., 2008); 11,0 (Mousavi et al., 2013).

Em condições ácidas houve perda total da atividade enzimática.



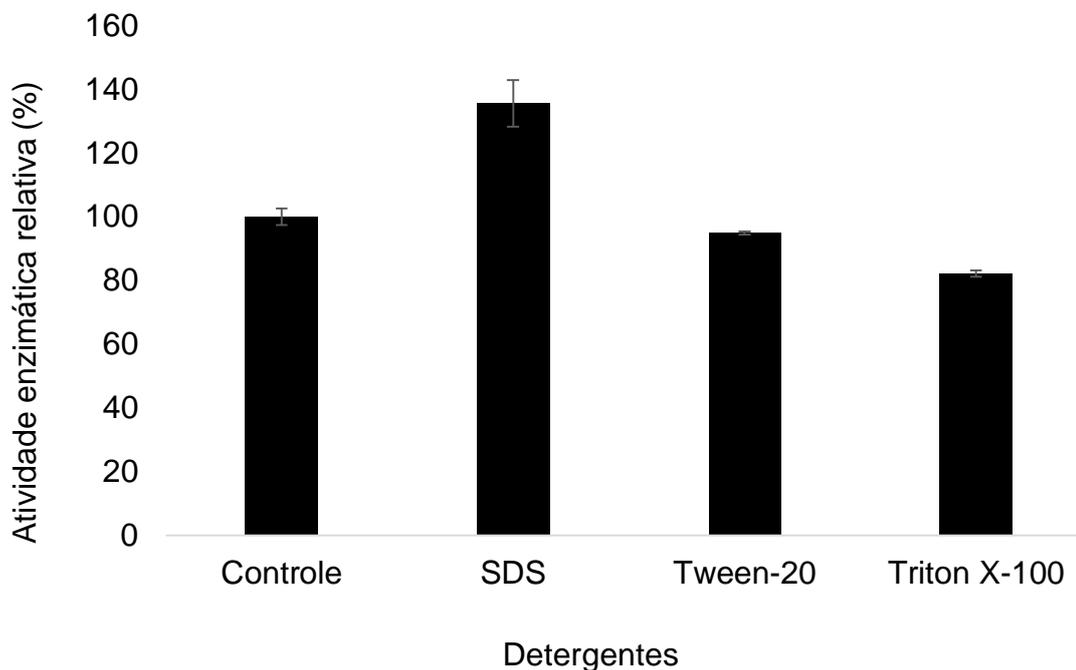
**FIGURA 17** Determinação do pH ótimo para atividade enzimática. A atividade percentual é calculada considerando-se como 100% o pH de maior atividade (U/mL).

### 5.7.3 Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática

Surfactantes fortes como o SDS são compostos de uma cadeia hidrofóbica e um grupo aniônico carregado em sua extremidade, levando a desnaturação proteica pela quebra das ligações não covalentes entre os

peptídeos e a ruptura de interações proteína-proteína. Detergentes não iônicos (Triton X-100) diferem em relação ao grupamento da extremidade da cadeia: hidrofílico e sem carga; são surfactantes suaves e não afetam a forma nativa nem rompem ligações entre proteínas. Tween-20 é um surfactante suave com uma porção de éster de ácido graxo e uma longa cadeia de polioxietileno; não afeta a atividade da proteína, mas a sua solubilização (Linke, 2009).

O SDS, como um surfactante aniônico forte, embora possa apresentar efeitos inibitórios para diversas proteases (Pillai & Archana, 2008; Fakhfakh-Zouari et al., 2010), estimulou a atividade enzimática, elevando-a aproximadamente 40% acima do controle (Figura 18). Os detergentes não iônicos Tween-20 e Triton X-100, os quais, em média, melhoram a atividade enzimática, não apresentaram efeito estatisticamente significativo, quando comparados ao controle (Tabela 13 – apêndice).



**FIGURA 18** Efeito de detergentes iônicos (SDS) e não iônicos (Tween-20/Triton X-100) em concentração de 1% sobre a atividade proteolítica da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.

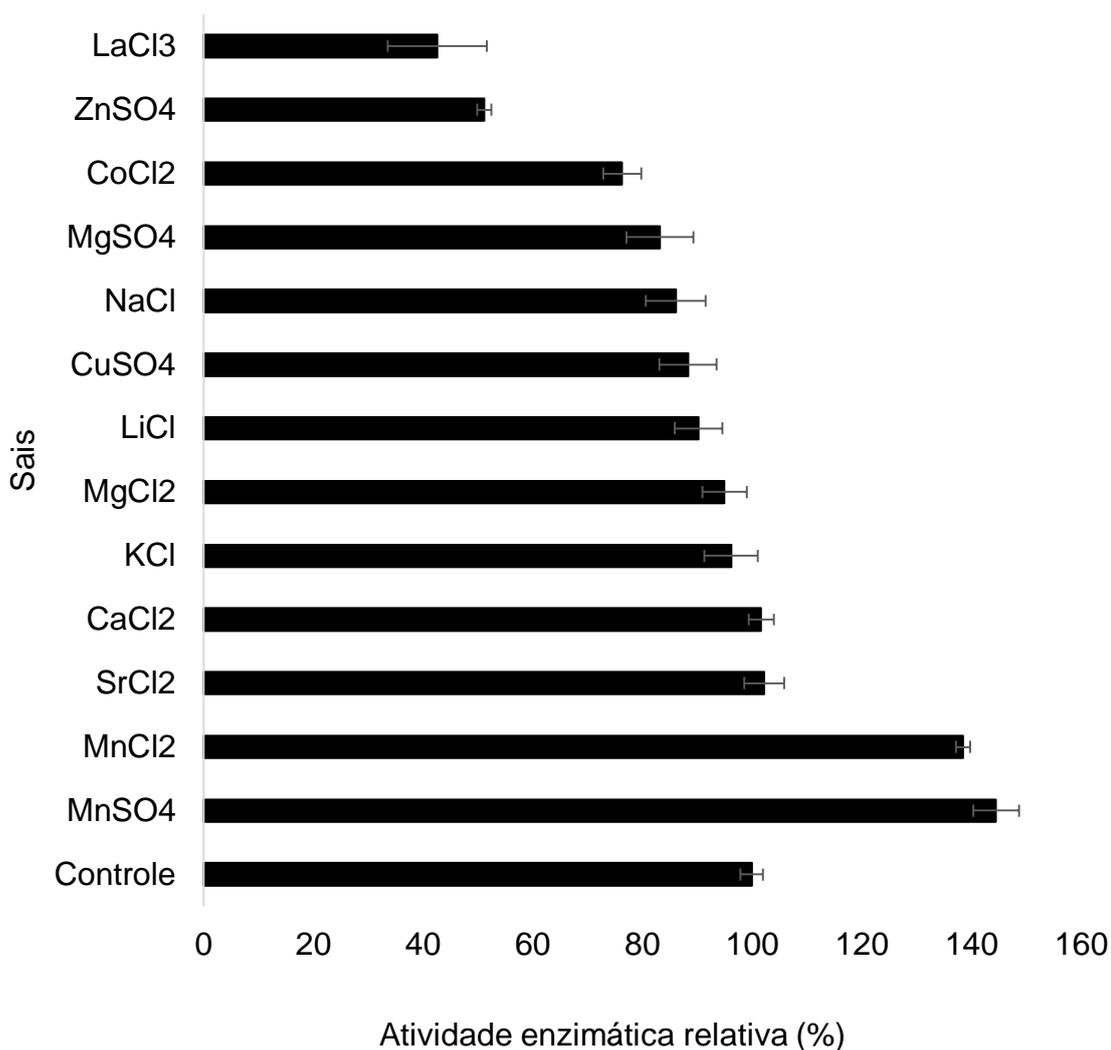
#### 5.7.4 Efeito de sais sobre a atividade enzimática

Íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  são frequentemente utilizados para a estabilização da atividade enzimática frente a desnaturação térmica. Processos de desnaturação, como cita Daroit (2011) envolvem a desorganização da estrutura terciária da enzima, tornando interações funcionais ou estruturais entre aminoácidos impossibilitadas pela distância entre os mesmos. Alguns íons conseguem manter a conformação ativa da proteína através formação de pontes iônicas ou salinas entre os resíduos, elevando, conseqüentemente, a atividade e a termoestabilidade (Gupta et al., 2003). Íons

de metais pesados como Zn e Cu podem apresentar também, efeito inibitório sobre a atividade enzimática (Cai et al., 2008).

Foi observado, neste ensaio, que alguns sais como o sulfato de manganês e o cloreto de manganês, exerceram estímulo diferencial, aumentando em aproximadamente 40% a atividade enzimática (Figura 19). Outros sais, de cálcio, estrôncio, potássio, magnésio, lítio, cobre e sódio não surtiram efeitos significativos sobre o controle (Tabela 14 – apêndice); já os demais, administraram variadas taxas inibitórias, sendo mais expressivos, o sulfato de zinco e o cloreto de lantânio, os quais reduziram 50 a 60% da proteólise.

Para algumas linhagens de *Bacillus*, elementos como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> mostram-se mais recorrentes como influência positiva na atividade enzimática, são exemplos a metaloqueratinase termoestável de *B. subtilis* NRC3 (Tork et al., 2013), e a metaloqueratinase de *B. pumilus* A1 (Fakhfakh-Zouari et al., 2010).



**FIGURA 19** Gráfico demonstrativo do efeito de diferentes sais (5 mM) sobre a atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.

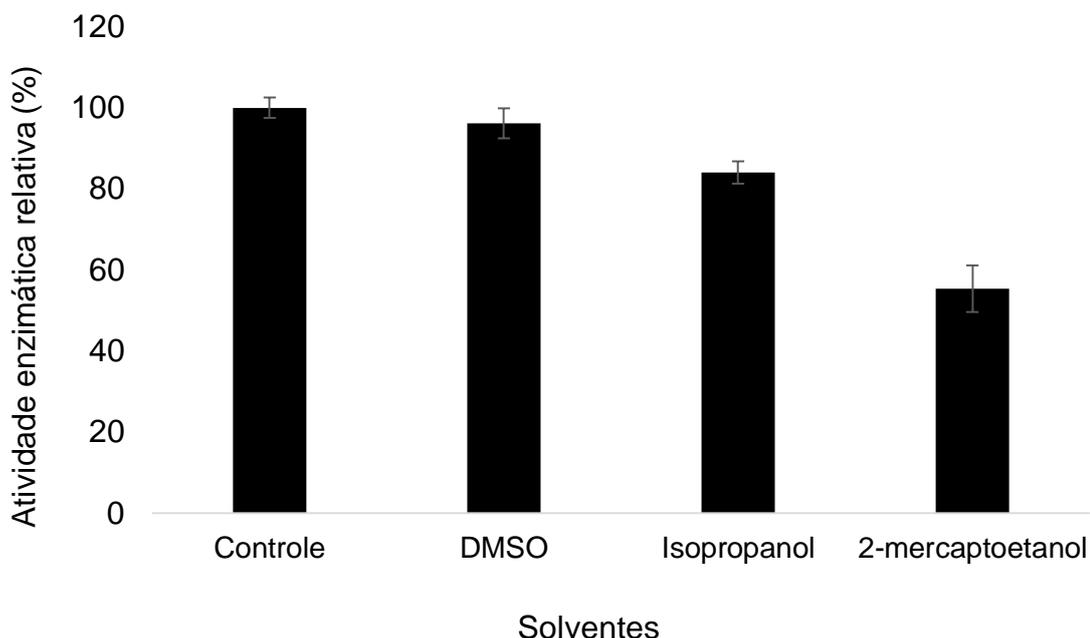
#### 5.7.5 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática

Agentes redutores como o  $\beta$ -mercaptoetanol tem efeito positivo em muitas queratinases, principalmente enzimas tiol-ativadas (Cai et al., 2008), porém, neste caso, houve inibição de, aproximadamente, 40% da atividade enzimática (Figura 20). Este resultado indica, possivelmente que, embora os

resíduos de cisteína não sejam essenciais para a catálise, as ligações –SH são importantes para a manutenção da estrutura tridimensional. Enzimas ativas em meio a agentes redutores e solventes orgânicos são especialmente úteis, devido a ação destes químicos nas ligações dissulfeto de substratos queratinosos e solubilização dos mesmos (Rajput et al., 2010).

O DMSO (solvente polar aprótico) quando utilizado de forma pura (100%) em proteínas pode induzir modificações estruturais pela desordenação das alfa-hélices (Batista et al., 2013); bem como, é utilizado para solubilizar – mantendo a forma nativa - ou precipitar proteínas quando em baixa ou alta concentração, respectivamente (Arakawa et al., 2007).

Na concentração de tratamento da protease (1% v/v), pode-se concluir, pelos valores obtidos, que não houve interferência significativa do DMSO (Tabela 15 – apêndice), contrariando outros achados em queratinases de *Bacillus*, nos quais a atividade enzimática foi reduzida em até 50% (Cai et al., 2008). O isopropanol (solvente polar prótico) em concentração de 1% reduziu pouco mais de 15% da atividade enzimática.



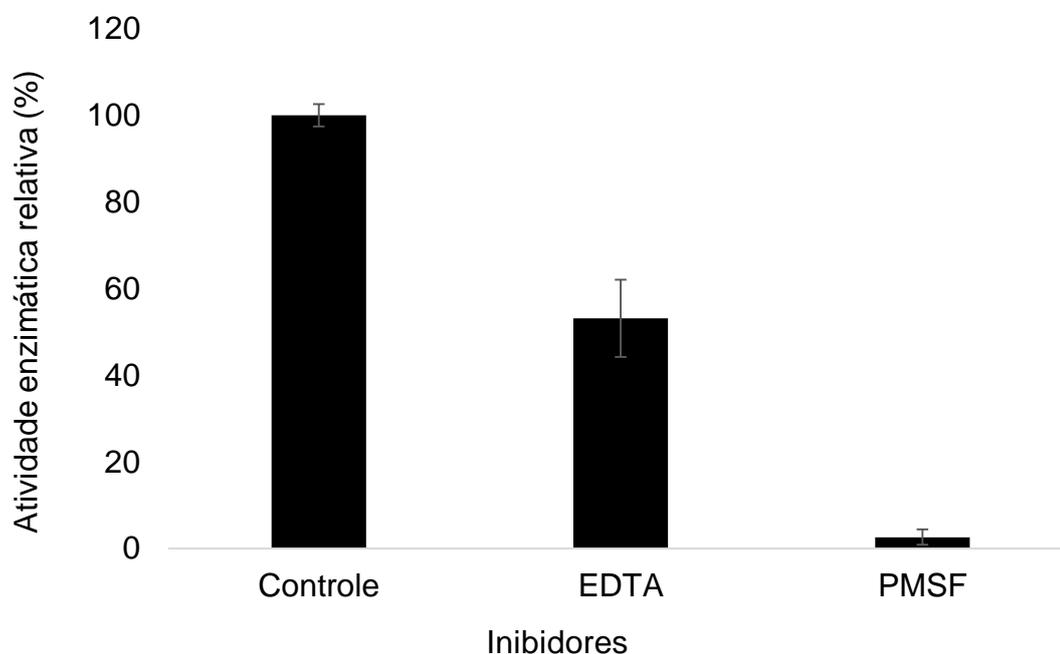
**FIGURA 20** Efeito de solventes sobre a atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.

#### 5.7.6 Efeito de inibidores de protease sobre a atividade enzimática

Para a determinar a classe da enzima purificada foram utilizados inibidores específicos dos dois principais grupos de queratinases bacterianas: serino e metaloproteases. Queratinases do gênero *Bacillus* são, predominantemente, serinoproteases; estas, possuem um resíduo de serina no sítio ativo, a qual realiza o ataque nucleofílico a ligação carbonil do peptídeo (Di Cera, 2009). Serinoproteases são irreversivelmente inibidas pelo PMSF devido a formação de ligações covalentes entre este e a enzima.

As metaloproteases são as peptidases que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos, necessitando de um ou dois íons metálicos divalentes; desta forma, são inibidas por agentes quelantes, como o EDTA.

Como resultado do ensaio, foi obtida inibição total da atividade enzimática em tratamento com PMSF (2 mM), caracterizando uma protease do tipo serina (Figura 21; Tabela 16 - apêndice). A inibição parcial por EDTA (5 mM) pode estar relacionada a dependência de íons metálicos para manter a estabilidade e/ou promover a atividade ótima da enzima. De acordo com Kumar (2008), a inibição relativa de serinoproteases pelo EDTA relaciona-se com o perfil descrito para proteases alcalinas.



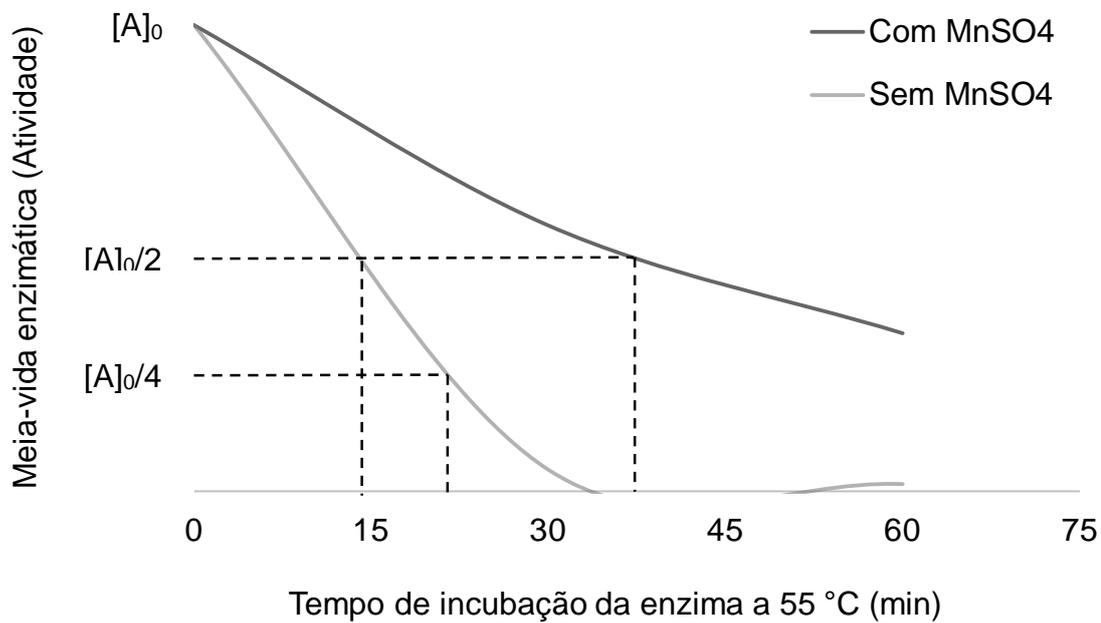
**FIGURA 21** Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade enzimática da queratinase. A atividade percentual (%) é calculada considerando-se como 100% a atividade enzimática (U/mL) da reação controle.

### 5.7.7 Efeito do íon manganês sobre a estabilidade térmica da enzima

Dentre os íons avaliados quanto a influência exercida sobre a atividade enzimática, o íon manganês foi o que apresentou resultado mais expressivo, tanto em sua forma de cloreto ( $\text{MnCl}_2$ ) quanto o sulfato ( $\text{MnSO}_4$ ). Como explicado no item 4.7.4, íons de diversos elementos são utilizados, mesmo em proteases não metalo, a fim de estabilizar a atividade enzimática frente a desnaturação térmica. Escolhido o  $\text{MnSO}_4$ , este foi adicionado a enzima, em concentração de 5 mM e a reação incubada por 30 e 60 min a 55 °C; temperatura de baixa estabilidade testada anteriormente.

Como resultado, foi verificado que a enzima tratada com  $\text{MnSO}_4$  manteve, por 30 min, aproximadamente, 60% de sua atividade e após 1 h restava, ainda, pouco menos de 40% (Figura 22). Ressalta-se que, em condições normais, após 30 min havia menos de 10% da atividade e a 1 h, estava zerada (Tabela 17 – apêndice).

Em estudos com outras queratinases de *Bacillus*, o íon  $\text{Mn}^{2+}$  diminuiu drasticamente a atividade enzimática: 50% para a serino-metaloprotease de *B. pumilus* (Fakhfakh-Zouari et al., 2010) e 100% para a queratinase de *B. subtilis* (Cai et al., 2008). Efeito positivo foi encontrado para a queratinase alcalina de *Streptomyces* sp. (Tatineni et al., 2008).



**FIGURA 22** Efeito do íon manganês sobre a meia-vida enzimática em incubação a 55 °C.

## 6 CONCLUSÃO

A linhagem probiótica FTC01PR01 de *Bacillus subtilis* demonstrou, através dos ensaios realizados, efetiva capacidade para degradação de substratos queratinosos a base de pena; porém não degradou composições mais rígidas como o cabelo humano. De fato, a não degradação  $\alpha$ -queratinas contribui para a segurança do consumo deste microrganismo, considerando-se a funcionalidade de probiótico e produtor de enzimas que melhorem a digestibilidade de dietas proteicas.

A produção de queratinases, conforme investigado, apresenta os picos de secreção enzimática e solubilização de proteínas em 96 h de cultivo; a mudança da fase de crescimento, sinalizando o fim do período exponencial e começo do estacionário é sinalizado pela grande liberação proteica, entre 24 e 48 h de cultivo.

A enzima purificada, de aproximadamente 31 kDa, como grande parte das queratinases alcalinas do gênero *Bacillus*, pertence ao grupo das serinoproteases, com atividade ótima a 60 °C em pH neutro a alcalino (6.0 a 11.0). Constatou-se rápida perda de função em altas temperaturas ( $\geq 70$  °C) e baixa termoestabilidade próximo a temperatura ótima, mantendo-se ativa após

incubação de até 15 min a 55°C; a 37 °C, a funcionalidade da enzima permaneceu em níveis normais durante todo o tempo avaliado.

Embora não dependente de íons, foi observada forte influência dos sais de manganês sobre a atividade da enzima, com estimulação em condições moderadas e aumento da resistência a inativação térmica; íons de zinco e lantânio inibiram a atividade enzimática.

Detergentes aniônicos, como o SDS, parecem surtir efeito positivo sobre a queratinase, elevando a taxa proteolítica em 40%. Contrariamente, os demais detergentes testados, bem como o solvente orgânico DMSO não interferem na atividade enzimática; o isopropanol afeta moderadamente a atividade da enzima, ao passo que o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol, reduziu 45% da função enzimática.

Estudos adicionais são necessários para a comprovação da efetividade do microrganismo em melhorar o aproveitamento nutricional de rações queratinosas *in vivo*. No entanto, confirma-se neste trabalho, a potencialidade da queratinase para a degradação de penas/farinha de pena e produção de rações mais ricas e digestíveis; bem como a utilização da protease em processos industriais que demandem a degradação de substratos recalcitrantes, produção de detergentes, fertilizantes e outros produtos provenientes da hidrólise de queratina.

## **PERSPECTIVAS**

A purificação e caracterização da queratinase permitiu constatar expressiva atividade proteolítica em substratos queratinosos. Com isso, tem-se como perspectiva, a utilização da enzima em processos industriais, seja para a degradação de substratos recalcitrantes (na composição de detergentes) ou para a produção e melhoramento de rações a base de queratina e outras fontes proteicas. O uso concomitante do microrganismo como probiótico e produtor de queratinase, a fim de elevar o aproveitamento proteico da ração, exige estudos específicos *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ADIGÜZEL, A. C. et al. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 226–234, 2009.
- ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P. C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 34, p. 337- 342, 2002.
- ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; MATHIVANAN, N.; ANNADURAI, G. Secretion of keratinolytic enzymes by *Scopulariopsis brevicaulis* and *Trichophyton mentagrophytes*: regression analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 1060-1069, 2006.
- ANBU, P. et al. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 6, p. 1298–1303, 2007.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175–183, 1998.
- ARAKAWA, T.; KITA, Y.; TIMASHEFF, S. N. Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. **Biophysical Chemistry**, v. 131, n. 1-3, p. 62–70, 2007.
- BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 19, p. 3719–3727, 2002.
- BALAJI, S.; KUMAR, M. S.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 38, p. 2741-2745, 2008.
- BÁLINT, B. et al. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 404–410, 2005.

- BATISTA, A. N. et al. Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. **Phys Chem Chem Phys**, v. 15, n. 46, p. 20147-20152, 2013.
- BERNAL, C.; CAIRÒ, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 49-54, 2006.
- BON, E. P. S. et al. **Enzimas em biotecnologia: produções, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT [Portugal], 2008.
- BOSE, A. et al. Keratinolytic Protease Production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B Using Feather Meal as Substrate and Application of Feather Hydrolysate as Organic Nitrogen Input for Agricultural Soil. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, n. 4, p. 595–605, 2013.
- BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105–116, 29 set. 2007.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735–50, 2010.
- CAI, C. et al. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 9, p. 713–720, 2008.
- CAI, C. G.; ZHENG, X. D. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Heidelberg, v. 36, p. 875-883, 2009.
- CAI, S. B. et al. Identification of a keratinase-producing bacterial strain and enzymatic study for its improvement on shrink resistance and tensile strength of wool- and polyester-blended fabric. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 112–126, 2011.
- CANGANELLA, F. et al. A microbiological investigation on probiotic preparations used for animal feeding. **Microbiological Research**, v. 151, n. 2, p. 167–175, 1996.
- CASARIN, F.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry by product for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 1, p. 301-305, 2008.

CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F. X. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. **Protein Science**, v. 23, n. 2, p. 123–144, 2014.

CORRÊA, A. P. F. **PROTEASE ALCALINA QUERATINOLÍTICA DE *Bacillus sp* . P7**. 2009. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinase produced by ***Bacillus sp* . P7** isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1–6, 2010.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 214–220, 2011.

DAROIT, D. J. **Potencial queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus sp* . P45**. 2011. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus sp* . P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 45–51, 2011.

DEMIR, T. et al. An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces sp* . 2M21 by utilizing chicken feather. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, p. 134–140, 2015.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, 61: 510–515, 2009.

DUC, H. et al. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2161–2171, 2004.

EVANGELOU, M. W. H. et al. Hydrolysed wool: A novel chelating agent for metal chelant-assisted phytoextraction from soil. **Chemosphere**, v. 72, n. 4, p. 525–531, 2008.

FAKHFAKH, N.; KANOUN, S.; MANNI, L.; NASRI, M. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 427-436, 2009.

FAKHFAKH-ZOUARI, N. et al. A novel serine metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather meal: Biochemical and

molecular characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 329–344, 2010.

FANG, Z. et al. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 82, p. 166–172, 2013.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p.85–93, 2004

FRASER, R. D. B.; PARRY, D. A. D. The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard b-keratins. **Journal of Structural Biology**, vol. 173, p. 391–405, 2011.

FONTOURA, R. et al. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 506–513, 2014.

GAMEIRO, M. et al. Supercritical carbon dioxide-based integrated continuous extraction of oil from chicken feather meal, and its conversion to biodiesel in a packed-bed enzymatic reactor, at pilot scale. **Fuel**, v. 153, p. 135–142, 2015.

GEGECKAS, A. et al. Keratinous waste decomposition and peptide production by keratinase from *Geobacillus stearothermophilus* AD-11. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 158–165, 2015.

GRADISAR H.; FRIEDRICH J.; KRIZAJ I.; JERALA R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microspores* to some known proteases. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 3420–3426, 2005.

GREEN, D. H. et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4288–4291, 1999.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.

GUNDERSON, A. R. et al. Resistance of melanized feathers to bacterial degradation: Is it really so black and white? **Journal of Avian Biology**, v. 39, n. 5, p. 539–545, 2008.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–395, 2003.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Appl Microbiol Biotechnol.**, vol. 70, p. 21–33, 2006.

HABBECHÉ, A. et al. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 4, p. 413–421, 2014.

IONATA, E. et al. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov., a thermotolerant organism isolated from solfataric muds. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 105–112, 2008.

JAOUADI, N. Z. et al. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76722, 2013.

JEEVANA LAKSHMI, P.; KUMARI CHITTURI, C. M.; LAKSHMI, V. V. Efficient degradation of feather by keratinase producing *Bacillus* sp. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, p. 9–11, 2013.

JISHA, V. N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 01, n. 03, p. 39–51, 2013.

JONES, L. N.; SIMON, M.; WATTS, N. R.; BOOY, F. P.; STEVEN, A. C.; PARRY, D. A. D. Intermediate filament structure: hard  $\alpha$ -keratin. **Biophysical Chemistry**, vol. 68, p. 83-93, 1997.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1689–1701, 2011.

KUMAR, A. G. et al. Characterization of an alkaline active - Thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 411–419, 2008.

KUO, J. M. et al. Purification and characterization of a thermostable keratinase from *Meiothermus* sp. I40. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 70, p. 111–116, 2012.

LAMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, K.; LILLEHOJ, H. S.; SIRAGUSA, G. R. Direct-Fed Microbials and Their Impact on the Intestinal Microflora and Immune System of Chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 47, n. 2, p. 106–114, 2010.

LIN, X. A et al. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading *Bacillus licheniformis* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3271–3275, 1992.

- LINKE, D. Detergents: an overview. **Methods Enzymol.**;463:603-17, 2009.
- LIPPOLIS, R. et al. Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains. **Proteome science**, v. 11, n. 1, p. 28, 2013.
- LO, W. H.; TOO, J. R.; WU, J. Y. Production of keratinolytic enzyme by an indigenous feather-degrading strain *Bacillus cereus* Wu2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 640–647, 2012.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LV, L. X. et al. Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1236–1244, 2010.
- MANABE, K. et al. Combined effect of improved cell yield and increased specific productivity enhances recombinant enzyme production in genome-reduced *Bacillus subtilis* strain MGB874. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8370–8381, 2011.
- MARAGKOUidakis, P. A et al. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. **International journal of food microbiology**, v. 141 Suppl , p. S91–7, 31 jul. 2010.
- MAZOTTO, A. M. et al. Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation. **Enzyme research**, v. 2011, p. 523780, 2011.
- MOHORČIČ, M. et al. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, n. 1-2, p. 196–201, 2007.
- MOUSAVI, S. et al. Optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 6–10, 2013.
- MONDOL, M. A. M.; SHIN, H. J.; ISLAM, M. T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: Chemistry and biological activity. **Marine Drugs**, v. 11, n. 8, p. 2846–2872, 2013.
- NAM, G. W. et al. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, v. 178, p. 538–547, 2002.
- ONIFADE, A.A. et al. 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**, Oxford, v. 66, p. 1-11, 1998.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7-8, p. 1220–1236, 2008.

PARRADO, J. et al. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 1–7, 2014.

PAUL, T. et al. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 50–57, 2013.

PHILLIPS, M. A.; FLETTERICK, R. A. Proteases. **Current Opinion in Structural Biology** v. 2, p. 713–720, 1992.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 643–650, 2008.

PORRES, J.; BENITO, M.; LEI, X. Functional expression of keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology letters**, p. 631–636, 2002.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 625–633, 2010.

QUEIROZ, J.A.; TOMAZ, C.T.; CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 143–159, 2001.

RADHA, S.; GUNASEKARAN, P. Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1301–1310, 2007.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline  $\beta$ -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 1, p. 47–56, 2011.

RAJPUT, R.; GUPTA, R. Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: Production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 118–126, 2013.

RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, R. Biochemical Characterization of a Thiol-Activated, Oxidation Stable Keratinase from *Bacillus pumilus* KS12. **Enzyme research**, v. 2010, p. 132148, 2010.

RAWLINGS, N.D., WALLER, M., BARRETT, A.J. & BATEMAN, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research** 42, D503-D509.

RIFFEL, A. **Avaliação de proteases extracelulares de linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica**. 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RIFFEL, A. et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, p. 693-703, 2007.

SANSINENEA, E.; ORTIZ, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 8, p. 1523–1538, 2011.

SAHOO, D. K. et al. Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1040–1051, 2012.

SAUCEDO-RIVALCOBA, V. et al. (Chicken feathers keratin)/polyurethane membranes. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 104, n. 1, p. 219–228, 2011.

SCOPES, P. K. Protein purification: principles and practice. 3 Ed. New York: **Springer-Verlag**, 1994.

SHARMA, R.; GUPTA, R. Thermostable, thiol activated keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* KS-1 for prospective applications in prion decontamination. *Research Journal of Microbiology*, New York, v. 5, p. 954-965, 2010.

SHEN, H.-B.; CHOU, K.-C. Identification of proteases and their types. **Analytical biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 153–160, 2009.

SIMÕES, I.; FARO, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European Journal of Biochemistry**, 271: 2067–2075, 2004.

SUNTORNUSUK, W. et al. Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, vol. 21, 1111-1117, 2005.

SYED, D. G. et al. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1868–1871, 2009.

TATINENI, R. et al. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1596–1602, 2008.

TIWARY, E.; GUPTA, R. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6103–6110, 2010.

TORK, S. E. et al. Production and characterization of thermostable metallo-keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 169–175, 2013.

TSIROULNIKOV, K. et al. Hydrolysis of the amyloid prion protein and nonpathogenic meat and bone meal by anaerobic thermophilic prokaryotes and *Streptomyces* subspecies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6353–6360, 2004.

VAZQUEZ, S. C.; CORMACK, W. P. M. Effect of isolation temperature on the characteristics of extracellular proteases produced by Antarctic bacteria. **Polar Research**, v. 21, p. 63-71, 2006.

VOJCIC, L. et al. An efficient transformation method for *Bacillus subtilis* DB104. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012.

WANG, H.; GUO, Y.; SHIH, J. C. H. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 140, n. 3-4, p. 376–384, 2008.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2004.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G.; BLAUT, M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 3–10, 2010.

WU, J. W.; CHEN, X. L. Extracellular metalloproteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 253–262, 2011.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E.  
Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from  
*Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research  
Communications**, San Diego, v. 294, p. 1138-1143, 2002.

YUE, X. Y. et al. Separation and purification of a keratinase as pesticide against  
root-knot nematodes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.  
27, n. 9, p. 2147–2153, 2011.

## APÊNDICE

**TABELA 8** Análise estatística das médias de produção enzimática por ANOVA e Teste de Tukey.

	<b>FP</b>	<b>CPB</b>	<b>COM</b>	<b>CC</b>
<b>0</b>	0 L	0 L	0 L	0 L
<b>24</b>	85 EF	17 IJL	21 HIJ	0 L
<b>48</b>	470 C	37 GH	25 HI	2 JL
<b>72</b>	596 B	96 E	48 G	4 JL
<b>96</b>	710 A	142 D	76 F	5 JL

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si

**TABELA 9** Análise estatística das médias de quantificação de proteínas solúveis por ANOVA e Teste de Tukey.

**Médias de proteínas solúveis (mg/mL) durante o tempo de cultivo nos diferentes substratos queratinosos**

	<b>FP</b>	<b>CPB</b>	<b>CPM</b>	<b>CC</b>
<b>0</b>	0 J	0 J	0 J	0 J
<b>24</b>	0,86 D	0,142 GHI	0,176 GH	0,031 IJ
<b>48</b>	4,97 C	0,257 FG	0,236 FG	0,052 IJ
<b>72</b>	5,55 B	0,335 EF	0,379 E	0,060 HIJ
<b>96</b>	5,84 A	0,454 E	0,388 E	0,056 HIJ

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 11** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática em cada temperatura por ANOVA e Teste de Tukey.

**Média (%) de atividade enzimática em diferentes temperaturas (C °)**

<b>T (C°)</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>	<b>70</b>	<b>80</b>
<b>Média (%)</b>	31,92 F	49,94 D	76,74 C	90,19 B	100 A	40,14 E	38,43 EF

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 12** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática após pré-incubação da enzima a 37 e 55 °C por ANOVA e Teste de Tukey.

<b>Média (%) de atividade enzimática (estabilidade térmica)</b>							
Tempo		<b>0</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>45</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
Temperatura (C°)	<b>37° C</b>	100 CD	124,85 A	120,39 AB	119,22 AB	110,10 BC	94,37 D
	<b>55° C</b>	100 CD	21,36 E	4,47 F	2,52 F	7,18 F	1,04 F

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 13** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática em cada pH por ANOVA e Teste de Tukey.

<b>Média (%) de atividade enzimática (pH)</b>								
pH	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Média (%)</b>	4,34 B	2,89 B	99,68 A	82,64 A	100 A	91,16 A	95,01 A	94,53 A

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 14** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática sob efeito de detergentes por ANOVA e Teste de Tukey.

<b>Média (%) de atividade enzimática sob efeito de detergentes</b>				
Detergente	<b>Controle</b>	<b>SDS</b>	<b>Triton X-100</b>	<b>Tween-20</b>
<b>Média (%)</b>	100 B	135,62 A	82,19 B	94,86 B

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 15** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática sob efeito de diferentes sais por ANOVA e Teste de Tukey.

Sal	Atividade relativa (%)	Sal	Atividade relativa (%)
Controle	100 B	LiCl	90,24 BC
MnSO <sub>4</sub>	144,52 A	CuSO <sub>4</sub>	88,36 BC
MnCl <sub>2</sub>	138,53 A	NaCl	86,13 BC
SrCl <sub>2</sub>	102,23 B	MgSO <sub>4</sub>	83,22 BC
CaCl <sub>2</sub>	101,71 B	CoCl <sub>2</sub>	76,37 CD
KCl	96,23 BC	ZnSO <sub>4</sub>	51,17 DE
MgCl <sub>2</sub>	95,03 BC	LaCl <sub>3</sub>	42,64 E

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 16** Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática sob efeito de solventes por ANOVA e Teste de Tukey.

<b>Média (%) de atividade enzimática sob efeito de solventes</b>				
Solvente	Controle	DMSO	Isopropanol	B-mercapto etanol
<b>Média (%)</b>	100 A	96,11 A	84,02 B	55,33 C

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

**TABELA 17**

Análise estatística das médias percentuais de atividade enzimática sob efeito de inibidores de protease por ANOVA e Teste de Tukey.

<b>Média (%) de atividade enzimática sob efeito de inibidores</b>			
Inibidor	Controle	EDTA	PMSF
<b>Média (%)</b>	100 A	53,08 B	2,57 C

Resultado da análise de variância significativo ao nível de 1% de probabilidade. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.