

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

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
PROTEASE ALCALINA QUERATINOLÍTICA DE *Bacillus* sp. P7**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA PAULA FOLMER CORRÊA

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Fevereiro de 2009

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

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
PROTEASE ALCALINA QUERATINOLÍTICA DE *Bacillus* sp. P7**

ANA PAULA FOLMER CORRÊA  
(QUÍMICA INDUSTRIAL – UFSM)

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  
Fevereiro de 2009

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

C824p Corrêa, Ana Paula Folmer

Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7 / Ana Paula Folmer Corrêa. – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof. Adriano Brandelli

1. *Bacillus* 2. Enzimas - purificação 3. Queratinase 4. Farinha de pena I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

CDU 579.852.1(043)

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Brandelli, pela sua orientação, sabedoria, compreensão e amizade;
  
- Aos colegas de laboratório, Daniel, Silvana, Lucas, Sabrine, Jaslin, Florência, Patricia, Roberta, Evelise, Renata, Rosiele, Fernandas, Naty, Nísia, Simone, Tamila, Cássia, Bacana, Débora, Josiele, Amanda, Lisiane, pela amizade e ótimo convívio;
  
- Aos meus pais, Wilson e Sueli e meus irmãos, pelo apoio, carinho e dedicação;
  
- Ao Franco que é meu irmão de coração;
  
- Aos amigos Walter e Lucélia pela amizade e convívio enriquecedor;
  
- A CAPES pela bolsa de estudo fornecida;
  
- À coordenação, professores e funcionários do PPGMAA;
  
- Aos colegas vizinhos de laboratório Nicole, Ana Carolina, Caroline, Carlos, Patrícia, Lu, pela companhia e amizade;
  
- De forma especial ao colega Daniel pela grande ajuda durante o mestrado, paciência e amizade;
  
- A Silvana que é uma grande amiga e me ajudou muito neste trabalho.

## Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7<sup>1</sup>

**Autor:** Ana Paula Folmer Corrêa

**Orientador:** Adriano Brandelli

### RESUMO

Queratinases alcalinas apresentam um interessante potencial para utilização em processos de hidrólises de proteínas, particularmente na quebra de resíduos de queratina para obter produtos de melhor valor. Uma bactéria queratinolítica, previamente isolada do intestino de peixe *Piaractus mesopotamicus* da bacia Amazônica foi identificada como sendo *Bacillus* sp. P7. Esta linhagem foi capaz de degradar penas e farinha de penas durante cultivos submersos, com a concomitante produção de queratinases extracelulares e com o aumento da concentração de proteínas solúveis no meio. O meio de cultivo para a produção da queratinase continha farinha de pena como única fonte de carbono, nitrogênio e enxofre. A purificação da enzima envolveu as etapas de precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de gel-filtração e de troca-iônica. Após as referidas etapas, a enzima apresentou um fator de purificação de 29,8 vezes e um rendimento de 27%. A análise do zimograma revelou 2 bandas proteolíticas. A queratinase parcialmente purificada apresentou atividade ótima em pH 9,0 e 55 °C. A atividade da enzima foi estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ , e reduzida por  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ . Os solventes  $\beta$ -mercaptoetanol e Triton X-100 afetaram ligeiramente a atividade da enzima, ao passo que SDS estimulou a atividade enzimática. PMSF e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) inibiram a atividade queratinolítica nos ensaios enzimáticos, sugerindo uma característica de serina protease, requerendo íons metálicos para a máxima atividade e/ou estabilidade. Tais queratinases alcalinas podem ser empregadas nas formulações de detergentes, no processamento do couro e nos processos de hidrólise protéica, especificamente na quebra de resíduos queratinosos para obter produtos de melhor valor.

*Palavras-chave:* *Bacillus* sp., queratinase, farinha de pena, purificação.

1/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (89 p.) Fevereiro, 2009.

## Partial purification and characterization of an alkaline keratinolytic protease from *Bacillus* sp. P7<sup>1</sup>

**Author:** Ana Paula Folmer Corrêa

**Orientation:** Adriano Brandelli

### ABSTRACT

Alkaline keratinases offer an interesting potential for utilization in processes of protein hydrolysis, particularly in the breakdown of keratin wastes in view to obtain added-value products. A keratinolytic bacterium was previously isolated from intestines of the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus* and was identified as *Bacillus* sp. P7. This strain degraded feather meal and whole feathers during submerged cultivations, with the concomitant production of extracellular keratinolytic enzymes and the increase in soluble protein. The medium for keratinase production contained feather meal as the only source of carbon, nitrogen and sulphur. Enzyme purification was carried out by ammonium sulphate precipitation and sequential gel-filtration and ion-exchange chromatographies. The purification was about 29.8-fold, with a yield of 27%. Zymogram analysis revealed two proteolytic bands. The partially purified keratinase had optimal activity at pH 9.0 and 55 °C. Enzyme activity was stimulated by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup>, and reduced by Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup>. Solvents, β-mercaptoethanol and Triton X-100 slightly affected, whereas SDS stimulated the enzyme activity. PMSF and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) inhibited keratinase activity in enzyme assays, suggesting its major serine protease feature, requiring metallic ions for maximum activity/stability. Such alkaline keratinase might be employed in detergent formulations, in leather processing, and in processes of protein hydrolysis, specifically the breakdown of keratin wastes to obtain value-added products.

**Keywords:** *Bacillus* sp., keratinase, feather meal, purification.

1/ 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. (89 p.) February, 2009.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Proteases.....	3
2.1.1 Classificação.....	5
2.1.2 Aplicações.....	6
2.2 Queratinas.....	7
2.2.1 Microrganismos queratinolíticos.....	9
2.2.2 Queratinases.....	12
2.2.3 Aplicações.....	13
2.3 Gênero <i>Bacillus</i> .....	15
2.4 Resíduos agroindustriais como substratos para produção de proteases.....	17
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 Penas de frango.....	20
3.2 Farinha de pena.....	20
3.3 Cabelo humano.....	20

3.4 Meios de cultura.....	21
3.5 Microrganismo e estoque do microrganismo.....	21
3.6 Funcionalidade da enzima.....	21
3.7 Padronização do pré-inóculo para os cultivos.....	22
3.8 Seleção de substratos para produção de queratinase.....	22
3.9 Produção da enzima.....	23
3.10 Ensaio de atividade proteolítica.....	23
3.11 Ensaio de atividade queratinolítica.....	23
3.12 Purificação parcial da enzima.....	24
3.12.1 Precipitação com sulfato de amônio.....	24
3.12.2 Cromatografia líquida de gel filtração.....	25
3.12.3 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica.....	25
3.12.4 Cromatografia de troca iônica (SP-Sepharose).....	26
3.12.5 Cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose).....	26
3.13 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida.....	27
3.14 Zimograma.....	28
3.15 Determinação da concentração de proteínas solúveis.....	28
3.16 Caracterização da enzima parcialmente purificada.....	29
3.16.1 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática.....	29
3.16.2 Determinação do pH ótimo de atividade enzimática.....	29
3.16.3 Estabilidade térmica.....	30
3.16.4 Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática.....	30
3.16.5 Efeito de sais sobre a atividade enzimática.....	30
3.16.6 Efeito de solventes sobre a atividade enzimática.....	31



3.16.7 Efeito de inibidores sobre a atividade enzimática.....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1 Escolha do microrganismo produtor de queratinase.....	32
4.2 Seleção de substratos para produção de queratinase.....	33
4.3 Purificação parcial da queratinase extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. P7.	36
4.4 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica.....	44
4.5 Temperatura e pH ótimos da enzima parcialmente purificada.....	44
4.6 Estabilidade térmica.....	47
4.7 Efeito de produtos químicos na atividade da enzima parcialmente purificada.	48
4.8 Efeito de sais na atividade da enzima parcialmente purificada.....	50
4.9 Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica.....	53
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>70</b>
<b>VITA.....</b>	<b>76</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> Aplicações industriais das enzimas microbianas.....	7
<b>TABELA 2.</b> Microrganismos queratinolíticos.....	11
<b>TABELA 3.</b> Aplicações industriais de enzimas produzidas por <i>Bacillus</i> sp.....	17
<b>TABELA 4.</b> Quadro da purificação parcial da queratinase extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. P7.....	37
<b>TABELA 5.</b> Efeito de vários reagentes na atividade queratinolítica.....	50
<b>TABELA 6.</b> Efeito de sais na atividade queratinolítica.....	52
<b>TABELA 7.</b> Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica.....	55

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. P7 em diferentes substratos ricos em queratina.....	34
<b>FIGURA 2.</b> Concentração de proteína solúvel durante o cultivo de <i>Bacillus</i> sp. P7 em diferentes substratos ricos em queratina.....	35
<b>FIGURA 3.</b> Perfil de eluição em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração com a resina G-200.....	38
<b>FIGURA 4.</b> Perfil de eluição em coluna de cromatografia líquida de troca iônica SP-Sepharose.....	40
<b>FIGURA 5.</b> Perfil de eluição em coluna de cromatografia líquida de troca iônica DEAE-Sepharose.....	41
<b>FIGURA 6.</b> SDS-PAGE da amostra do processo de purificação parcial.....	42
<b>FIGURA 7.</b> Zimograma de gelatina da enzima parcialmente purificada.....	43
<b>FIGURA 8.</b> Efeito da variação do pH sobre a atividade da queratinase extracelular parcialmente purificada.....	46

**FIGURA 9.** Efeito da variação da temperatura sobre a atividade da queratinase extracelular parcialmente purificada.....47

**FIGURA 10.** Estabilidade térmica da queratinase parcialmente purificada.....48

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AFP:** Ágar farinha de pena

**AL:** Ágar leite

**BHI:** Infusão de cérebro e coração

**BSA:** Albumina sérica bovina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**MMM:** Meio mínimo mineral

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonil

**SDS:** Dodecilsulfato de sódio

**TCA:** Ácido tricloroacético

**Temed:** N,N,N',N'-tetrametiletenodiamino

**Tris:** Hidroximetilaminometano

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria avícola produz uma grande quantidade de penas que apresentam elevado potencial poluente, visto que acumulam em forma de resíduos após o processamento das aves para consumo humano. Sabe-se que o principal componente das penas é a queratina, cerca de 90%.

Uma alternativa para reduzir esta poluição é o desenvolvimento de processos de bioconversão dos substratos queratinosos, visando sua utilização, por exemplo, como ração animal. O processamento das penas utilizando ferramentas biotecnológicas, ao contrário do processo hidrotérmico convencional, oferece vantagens relacionadas ao enriquecimento protéico das penas pela própria biomassa microbiana e a não destruição de aminoácidos essenciais tais como metionina, lisina, histidina, encontrados em níveis sub-ótimos. Deve-se ressaltar ainda que a utilização de restos de penas constitui uma alternativa ao descarte, evitando o seu acúmulo no meio ambiente e o desenvolvimento de vários tipos de patógenos. A farinha de penas também pode ser utilizada na agricultura como um fertilizante nitrogenado, com dois propósitos, melhorar o crescimento da planta e intensificar a atividade microbiana do solo.

Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina e papaína. Esta resistência ocorre

não só pelo fato da composição e configuração molecular dos aminoácidos constituintes responsáveis por sua rigidez, como também pelo fato da cadeia de queratina ser firmemente enovelada em  $\alpha$ -hélice (como em cabelos e pêlos) ou  $\beta$ -folhas (como nas penas). Além dos motivos acima citados, essa proteína apresenta um alto grau de ligações cruzadas (ligações dissulfeto - cistina), pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que também contribuem para sua resistência à degradação. Em consequência desta estrutura, a degradação microbiana da queratina limita-se a certo número de fungos, actinomicetos e bactérias, que são chamados de microrganismos queratinolíticos. As proteases produzidas por estes microrganismos, que possuem certa especificidade pela queratina como substrato, são chamadas de queratinases. Dado o caráter insolúvel da queratina, as queratinases microbianas são geralmente extracelulares.

Se considerarmos o elevado conteúdo de queratina das penas, e que as rações representam uma parte significativa no custo de produção de animais, é importante investigar alternativas para os ingredientes mais caros da dieta. As penas representam uma alternativa devido a sua disponibilidade e alto conteúdo protéico.

O presente trabalho tem como principal objetivo purificar parcialmente e caracterizar uma protease alcalina queratinolítica produzida por *Bacillus* sp. P7 em cultivos submersos utilizando farinha de penas como substrato.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 PROTEASES**

As proteases pertencem a uma classe de enzimas que ocupa uma posição importante em relação às suas aplicações no campo fisiológico e comercial. Enzimas proteolíticas catalisam a hidrólise peptídica em proteínas e fragmentos de proteínas (Rao et al. 1998). Fazendo isto, elas causam alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (Barret; Rawlings; O'Brien, 2001).

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais. Essas enzimas apresentam grande utilização em processos industriais, tais como na indústria de detergentes, bem como indústrias de couro e alimentos (Kumar & Takagi, 1999; Gupta et al. 2002).

As proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total de vendas de enzimas mundialmente. Elas são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, e são encontradas em uma grande diversidade de fontes tais como plantas, animais e microrganismos (Rao, 1998). As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das



condições climáticas. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso. Neste contexto, os microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento e ao pequeno espaço requerido para seu cultivo (Rao, 1998). Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil e mais seguro (Wiseman, 1991).

Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases são os fungos e as bactérias, devido à maior facilidade de cultivo e obtenção da enzima (Bernardi et al., 1991). Em geral, as enzimas fúngicas têm um pH ótimo ácido ou neutro, não sendo termoestáveis. Por outro lado, as proteases bacterianas possuem um pH ótimo alcalino ou neutro, sendo com frequência termoestáveis (Wiseman, 1991).

As proteases bacterianas apresentam inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e químicas. Espécies do gênero *Bacillus*, principalmente, possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (Joo & Chang, 2005).

Para espécies de *Bacillus*, a produção de proteases é fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (Nehete et al., 1985, Johnvesly & Naik, 2001).

### 2.1.1 Classificação

A União Internacional de Bioquímica (IUB) classifica as proteases em seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade em relação ao substrato. São elas: serina protease I (ex. tripsina e elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), aspartil protease (ex. pepsina, quimosina), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex. termolisina). A serina protease e a metalo protease se subdividem em duas famílias: as proteases de mamíferos e as proteases microbianas. Cada família de protease possui resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (Beynon, 1996).

As serina proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo. Elas são bastante numerosas, amplamente distribuídas entre os vírus, procariotos e eucariotos sugerindo importância vital para todos os organismos. As serina proteases podem ser reconhecidas por sua inibição irreversível pelos compostos PMSF, 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), diisopropilfluorofosfato (DFP) e 3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (Barret, 1994, Rao et al., 1998).

As aspartil proteases, também são conhecidas como proteases ácidas e dependem da presença de resíduos de ácido aspártico para a atividade catalítica. A maioria delas apresenta atividade máxima em baixos valores de pH. São inibidas por pepstatina (Barret, 1995, Rao et al., 1998).

As cisteína proteases ocorrem em procariotos e eucariotos. Geralmente, estas enzimas são ativas somente na presença de condições redutoras. As cisteína proteases em sua maioria são ativas em pH neutro. Outra

característica é a inibição por agentes sulfidríla como *p*-cloromercurilbenzoato (PCMB) e iodoacetamida (Barret, 1994).

As metaloproteases estão distribuídas em todos os organismos vivos e são as enzimas que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos. Elas são caracterizadas pela necessidade da presença de um íon metálico divalente para atividade (Barret; Rawlings; O'Brien, 1995). As metaloproteases são inibidas por agentes quelantes como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetraacético (EGTA) e 1,10-orto-fenantrolina (OP) (Barret, 1995).

### **2.1.2 Aplicações**

As proteases têm uma grande variedade de aplicações, principalmente nas indústrias de detergentes e alimentos. Em vista da recente tendência do desenvolvimento de tecnologias ambientais, as proteases são utilizadas no tratamento de couro e em vários processos de biorremediação. As proteases são um dos ingredientes padrão adicionado a todos detergentes devido, principalmente, à especificidade em relação a alguns substratos constituintes do material a ser removido. Na indústria de alimentos são amplamente utilizadas em laticínios, massas e na produção de hidrolisados protéicos. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. No entanto, essas proteases são produzidas em pequenas quantidades e requerem alto grau de pureza (Rao et al., 1998).

Na tabela 1 são apresentadas as proteases de origem microbiana, bem como suas aplicações industriais.

**Tabela 1:** Aplicações industriais das enzimas microbianas.

Fonte	Enzima	Aplicação industrial
<i>Aspergillus Níger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado cereais, bebidas
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação
<i>Aspergillus melleus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação

Fonte: Wiseman (1991)

## 2.2 QUERATINAS

Queratinas são polipeptídios formados por unidades de aminoácidos, com massa molar média da ordem de 10.000 g/mol, apresentando resíduos de cisteína na proporção de 7 a 20% do número total de resíduos de aminoácidos (Onifade, 1998; Yamauchi, 1996). Pertencem à classe de proteínas fibrosas, com formação de pontes dissulfeto inter ou intramolecular, resultando em um

material com características de conformação rígida e tenaz devido à rede tridimensional das fibras de queratina (Schrooyen, 2000 e 2001).

A queratina é uma proteína insolúvel requerendo a secreção de enzimas extracelulares para que a sua biodegradação ocorra. Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina e papaína (Farag e Hassan, 2004; Williams et al, 1990). Esta proteína é o principal componente das peles, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas. As queratinas foram vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica (Busson et al., 1999).

A capacidade de resistência mecânica e de digestão proteolítica que as queratinas apresentam são consequência do firme empacotamento da cadeia protéica em  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) e  $\beta$ -pregueada ( $\beta$ -queratina) no empacotamento da cadeia polipeptídica. As queratinas também apresentam um alto índice de ligações intercadeia, consequência da grande quantidade de formação de pontes dissulfeto que é facilitada pelo alto conteúdo de cisteína. Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas também conferem à queratina força, estabilidade e resistência à proteólise (Onifade, 1998).

As queratinas são classificadas em “leves” e “rígidas”. As queratinas “leves”, encontradas no extrato córneo, são isentas ou contêm pouco conteúdo de cisteína e são constituídas principalmente de aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina. As queratinas “rígidas” são ricas em cisteína e contêm muitas ligações dissulfeto bem como a presença da maioria dos aminoácidos. Incluem-se nesta classe, penas e pêlos com cerca de

10 a 14% de cisteína (Hood et al. 1994). A principal característica que diferencia a queratina quando comparada a outras proteínas fibrosas, tais como o colágeno, a elastina e as proteínas miofibrilares, é a ocorrência de uma grande quantidade de resíduos de cisteína (Schrooyen et al., 2000; Kato et al., 2004).

As queratinas são extremamente diversas em estrutura molecular. As  $\alpha$  e  $\beta$ -queratinas tem sido amplamente estudadas e historicamente consideradas convergentes em termos de estrutura e função. No entanto, há poucas similaridades em seqüência e muitas diferenças moleculares entre elas. As  $\alpha$ -queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores, enquanto as  $\beta$ -queratinas são encontradas exclusivamente em répteis e aves. Todas as  $\beta$ -queratinas são menores que as  $\alpha$ -queratinas (Brush, 1996).

As enzimas proteolíticas, especialmente as de mamíferos e de aves, são incapazes de hidrolisar a queratina. Esta resistência à ação das peptidases digestivas faz com que o valor nutritivo das queratinas seja extremamente baixo. Em consequência deste fato, o grande volume de resíduos de queratina proveniente dos abatedouros de aves tem um aproveitamento econômico mínimo (Bon et al., 2008).

### **2.2.1 Microrganismos queratinolíticos**

Apesar da alta estabilidade da queratina, percebe-se que não há acúmulo na natureza. Isto confirma a existência de microrganismos decompositores naturais capazes de utilizar a queratina como substrato para seu crescimento. Estes são chamados de microrganismos queratinolíticos e podem crescer em diferentes condições ecológicas e ambientais,

demonstrando uma capacidade variada de solubilização de substratos queratinosos, bem como de outros substratos protéicos compactados. Geralmente, essa solubilização se faz através da síntese e secreção de proteases para a superfície destes substratos viabilizando a hidrólise e assim a assimilação de nutrientes (Onifade et al., 1998).

Microrganismos queratinolíticos têm sido muito investigados devido à importância de seu potencial industrial para o processamento do couro, produção de rações e tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola, entre outras (Onifade et al., 1998).

Como muitas espécies de fungos queratinolíticos são patogênicas e, portanto, com potencial biológico limitado, estudos recentes concentram-se nas bactérias queratinolíticas como fonte destas enzimas para uso industrial. Estes trabalhos levaram ao isolamento, principalmente a partir de resíduos das indústrias avícolas e do solo em que estes se encontram, de muitas espécies de bactérias capazes de produzir diferentes queratinases (Lin et al., 1992; Thomas et al., 1995; William et al., 1990; Zaghloul et al., 1998; Ichia et al., 2001; Riffel e Brandelli, 2002).

Grande parte das bactérias queratinolíticas descritas relaciona-se ao gênero *Bacillus* (Zaghloul et al., 1998, Kim et al., 2001, Fonseca, 1998). Entretanto, diversos outros microrganismos queratinolíticos vêm sendo isolados e caracterizados conforme consta na Tabela 2, abaixo.

**Tabela 2:** Microrganismos queratinolíticos

Microrganismo	Autor
<i>Bacillus licheniformis</i>	Williams et al., 1990
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Chitte et al., 1999
<i>Vibrio</i> sp	Sangali & Brandelli, 2000
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Kim et al., 2001
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Lucas et al., 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farag & Hassan, 2004
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Macedo et al., 2005
<i>Kocuria rosea</i>	Bernal et al., 2006
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Anbu et al., 2007
<i>Streptomyces</i> sp.S7	Tatineni et al., 2008
<i>Chryseobacterium</i> sp. KR6	Riffel et al., 2007
<i>Chryseobacterium indologenes</i> TKU014	Wang et al., 2007

Fonte: Ana Paula Folmer Corrêa em: Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. p7 PPGMAA, UFRGS, 2009.



### 2.2.2 Queratinases

As proteases específicas intra ou extracelulares elaboradas por microrganismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Estas enzimas distinguem-se das outras proteases por uma maior capacidade de degradação de substratos compactos como, por exemplo, a queratina (Onifade et al., 1998).

As queratinases são, em sua maioria, endopeptidases do tipo serina, cisteína e metalo-peptidases, embora já tenham sido descritas exopeptidases do tipo amino-peptidase com esta atividade. O mecanismo de ação destas enzimas ainda está em estudo. Acredita-se que as queratinases são simples peptidases que atuam em conjunto com agentes redutores, como o sulfito e similares, ou com outras enzimas com atividade de dissulfeto-redutase. Embora inicialmente estas enzimas tenham sido muito estudadas em fungos dermatófitos, atualmente elas têm sido isoladas e caracterizadas de procariotos representados por vários gêneros de bactérias, em especial *Bacillus* e *Streptomyces* (Bon et al., 2008).

Estudos recentes apresentaram evidências de que as queratinases podem degradar príons, partículas protéicas das encefalopatias neurodegenerativas de humanos e animais (Muller-Hellwig et al., 2006).

Os procedimentos utilizados para a purificação das queratinases são semelhantes aos utilizados na purificação de diversas enzimas microbianas extracelulares. Assim, os sobrenadantes de culturas queratinolíticas são concentrados por precipitação com sulfato de amônio (Chitte et al, 1999) ou outras técnicas. Etapas de purificação adicionais por cromatografia de troca iônica e/ou filtração em gel estão descritas na literatura (Yamamura et al,

2002). Algumas queratinases foram purificadas por SDS-PAGE preparativa (Malviya et al., 1992) e também, por cromatografia de afinidade (Mignon et al., 1998, Longshaw et al., 2002).

Dependendo da espécie do microrganismo produtor, as propriedades físico-químicas destas enzimas têm se mostrado bastante diversas. Já foram encontradas enzimas de pesos moleculares de 18 KDa (Bressollier et al., 1999) até maiores de 200 KDa (Nam et al., 2002) sendo a maioria delas pertencentes à classe das serina proteases, mas cisteína e metalopeptidases também tem sido caracterizadas. Os pH e temperaturas de maior atividade também variam bastante, de 5,5 (Qin; Dekio; Jidoi, 1992) a 10,0 (Bernal; Cairó; Coello, 2005) e 30 °C (Mukhopadhyay; Chandra, 1990) até 100 °C (Nam et al., 2002).

### **2.2.3 Aplicações**

Os nichos industriais para a potencial aplicação das queratinases são muitos, sendo que os usos mais evidentes relacionem-se ao preparo de rações animais a partir de penas de aves e ao uso como agente depilatório na indústria do couro. Durante o processamento do couro, as queratinases podem ser empregadas na depilação da pele em substituição ao sulfeto de sódio. Este composto é extremamente tóxico e gera gás sulfídrico, agente responsável pela poluição do ar (Friedrich & Antranikian, 1996; Roth et al., 1995), e que já ocasionou mortes de trabalhadores (Cocheo, 1990; Balasubramanian & Pugalenti, 2000). Esta tecnologia é efetiva e está se estabelecendo como uma opção viável aos curtumes pela pressão social por tecnologias mais limpas e de menor impacto ambiental. Processos de depilação que empregam

queratinases já são utilizados em curtumes, substituindo total ou parcialmente o uso de sulfetos (Cassano et al., 2000).

A magnitude do problema ambiental gerado nos abatedouros de aves devido à grande quantidade de penas produzidas pelo processamento de frangos motivou o desenvolvimento de processos de aproveitamento deste resíduo (Shih, 1993; Thomas et al., 1995). O processamento biotecnológico de penas para a produção de ração animal oferece em contraposição ao processamento químico, vantagens relacionadas ao enriquecimento protéico das penas porque não destrói aminoácidos essenciais, tais como metionina, lisina, histidina, que apresentam níveis sub-ótimos nas penas. Apresenta, ainda, a vantagem de não formar derivados de aminoácidos não-assimiláveis (Onifade, 1998; Dalev et al., 1997).

Estudos recentes sugerem que o hidrolisado de penas é um produto potencialmente útil como fertilizante de liberação lenta de nitrogênio, devido ao alto teor deste elemento, que atinge cerca de 15% (Ichida et al., 2001). Hidrolisados enzimáticos de penas de frango já foram usados com sucesso em condições de campo (Choi & Nelson, 1996). Outra utilidade dada à queratinase é na hidrolise de pêlos, penas e colágeno para a desobstrução de redes de tratamento de água (Godfrey, 2003).

Na área de cosméticos, as queratinases ainda apresentam uso potencial em cremes depilatórios e na obtenção de hidrolisados de queratinas em cremes para tratamento capilar (Bon et al., 2008).

As possibilidades de uso de queratinases nas indústrias de rações, de couro, de cosméticos e de produtos farmacêuticos aumentam paralelamente ao

isolamento e identificação de novos microrganismos produtores e à caracterização química e bioquímica dessas proteases. Além disto, a clonagem e a expressão dos genes que codificam estas enzimas possibilitarão a sua produção nas quantidades necessárias, com custos compatíveis para a obtenção de produtos de interesse e para aplicação industrial. Neste contexto, a produção destas enzimas por microrganismos recombinantes é de particular importância, uma vez que muitos microrganismos produtores naturais são freqüentemente patogênicos (Bon et al., 2008).

### **2.3 GÊNERO *Bacillus***

Segundo o *Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática* (Sneath et al., 1984), os *Bacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram-positivas, formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e a maioria é catalase positiva. São agrupadas de acordo com as exigências físicas, químicas, nutricionais ou genéticas. Dentro do gênero *Bacillus*, o grupo *Bacillus subtilis* é reconhecido por englobar cinco espécies fisiologicamente similares (Gordon et al., 1973): *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*. Embora essas bactérias são fenotipicamente muito similares, elas podem facilmente ser distinguidas por estudos do DNA (Seki and Oshima, 1989).

O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia. Suas características são muito variadas, sendo encontradas espécies com importância industrial e agrícola e espécies patogênicas produtoras de toxinas (Paik et al., 1997).

*Bacillus* são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como: sua alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação; sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (Generally Recognized As Safe), considerado pelo FDA (Food and Drug Administration) de algumas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Schallmey et al., 2004), as quais são muito próximas, filogeneticamente, de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estes organismos são uma fonte muito importante de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente, incluindo proteases e amilases.

O gênero *Bacillus* é atualmente considerado como um dos maiores produtores de enzimas industriais, incluindo espécies encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas como participante da biota intestinal (Chantawannakul, et al., 2002). As principais aplicações deste gênero estão resumidas na tabela 3.

**Tabela 3:** Aplicações industriais de enzimas produzidas por *Bacillus* spp.

Indústria	Enzimas	<i>Bacillus</i> sp.
Detergentes	Proteases alcalinas	<i>B. claisii</i>
		<i>B. amyloliquefaciens</i>
Textil	Amilase	<i>B. halodurans</i>
Bebidas	Amilase	<i>B. licheniformis</i>
		<i>B. amyloliquefaciens</i>
Bebidas	$\beta$ - glucanase	<i>B. subtilis</i>

Fonte: Ana Paula Folmer Corrêa em: Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. p7 PPGMAA, UFRGS, 2009.

## 2.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES

A indústria de alimentos produz ao longo de sua cadeia uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, o que gera perda de divisas, além de inúmeros problemas ambientais. No entanto, o aproveitamento integral desses resíduos como matéria-prima para a formulação de rações tem como objetivo principal agregar valor aos subprodutos (Sena & Nunes, 2006).

Grandes quantidades de resíduos agroindustriais são geradas a cada ano a partir das mais diversas atividades econômicas (Tan & Wahab, 1997; Heck et al., 2005), sendo geralmente utilizados como ração animal, fertilizantes ou condicionadores de solo (Ferrer et al., 2001; Schieber et al., 2001; Yang et al., 2001). Na realidade, biomassa em excesso e resíduos provenientes de

atividades agrícolas e agroindustriais sempre foram amplamente empregados na produção de energia, rações, alimentos, entre outros produtos úteis (Moraes et al., 2002).

Segundo Demajorovic (1995) resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo, pois enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que deve apenas ser descartado, os resíduos possuem valor econômico agregado por possibilitarem o reaproveitamento no próprio processo produtivo.

Proteínas insolúveis e de difícil degradação estão presentes em todas as partes do corpo dos animais. A maior parte dessas proteínas é gerada nas indústrias de carnes em uma mistura de ossos, órgãos e tecidos, sendo convertido a resíduos industriais (Deydier et al., 2005). A maior parte dessa proteína animal de difícil degradação é atualmente incinerada (Deydier et al., 2005, Haruta et al., 2005). No entanto, este método apresenta desvantagens ecológicas devido à perda de energia e a produção de uma grande quantidade de dióxido de carbono. Assim, uma solução inovadora para esses problemas é urgentemente necessária (Suzuki et al., 2006).

A queratina é o principal componente da pele, unhas, cabelos, penas e lã. (Williams et al., 1991). A magnitude do problema ambiental gerado nos abatedouros de aves devido à grande quantidade de penas produzidas pelo processamento de frangos motivou o desenvolvimento de processos de aproveitamento deste resíduo (Shih, 1993; Thomas et al., 1995).

As penas de aves são compostas basicamente por 90% de proteína na forma de queratina, que atualmente vem sendo utilizada, depois de hidrolisadas a altas temperaturas, na formulação de ração animal.

Considerando-se que as penas representam de 5 a 7% do peso dos frangos (Martelli et al., 2006) e que o Brasil é o segundo produtor mundial dessas aves, pode-se avaliar a grande disponibilidade da queratina na indústria de processamento de aves (Tanabe et al., 2004).

No Brasil, é estimada a geração de 600 mil toneladas de penas por ano. Nos Estados Unidos, essa estimativa aproxima-se de quatro milhões de toneladas anuais. Não apenas o acúmulo das penas, mas também a sua deterioração lenta, que origina compostos sulfurosos de odor extremamente desagradável, vem impulsionando o estudo de microrganismos queratinolíticos e dos processos envolvidos na biodegradação da queratina (Latshaw et al., 1994; Ichida et al., 2001; Shih, 1993; Onifade et al., 1998; Friedrich et al., 1999; Suntornsuk e Suntornsuk, 2003).

A produção industrial de enzimas é freqüentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos produtivos (Joo & Chang, 2005). Neste sentido, a utilização de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção (Bocchini et al., 2005).



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Penas de frango**

As penas de frangos utilizadas como componente de meio de cultura foram cedidas pela empresa Avipal (RS, Brasil). As penas foram submetidas à lavagem em água corrente para a retirada de impurezas como unhas, sangue e pedaços de pele.

#### **3.2 Farinha de pena**

A farinha de pena utilizada como substrato para ensaios enzimáticos e componentes de meios de cultura foi obtida a partir do processamento de cocção sob pressão e moagem na empresa Santista (RS, Brasil) e fornecida em lote de 20 Kg.

#### **3.3 Cabelo humano**

O cabelo utilizado como substrato para meios de cultura foi obtido através da doação de um integrante de nosso laboratório. Os cabelos foram submetidos à lavagem em água corrente para retirada de impurezas.

### 3.4 Meios de cultura

Os meios de cultura Caldo pena (CP), Caldo farinha de pena (CF), Caldo Cabelo Humano (CC), Caldo Cérebro-Coração (BHI), Ágar farinha de pena (AFP), Ágar leite (AL) e Ágar Cérebro-Coração (BHA), utilizados neste estudo, têm sua composição descrita no apêndice. O pH dos meios foi ajustado conforme necessário com NaOH (1N) ou HCl (1N). A composição do tampão Tris-HCl também é apresentada no apêndice.

### 3.5 Microrganismo e estoque do microrganismo

Foi utilizada a bactéria queratinolítica *Bacillus* sp. P7 (Genebank DQ 387865), previamente isolada do intestino de peixe *Piaractus mesopotamicus* da bacia Amazônica. As culturas foram mantidas em placas de BHA a 4 °C. Periodicamente (a cada 15 dias) essas culturas eram inoculadas em novas placas de BHA e incubadas a 30 °C por 24 h. O estoque foi feito através do cultivo em meio caldo BHI, contendo 20% de glicerol (v/v) e armazenado na temperatura de -20 °C.

### 3.6 Funcionalidade da Enzima

A avaliação da funcionalidade da enzima foi realizada através da inoculação do microrganismo através da semeadura em picada, sobre uma placa de ágar leite (10% v/v) e pH 7,0, a qual foi incubada a 37 °C durante 24 horas. A presença de halos transparentes é indicativa da produção de enzimas proteolíticas.

### 3.7 Padronização do pré-inóculo para os cultivos submersos

Os pré-inóculos para os cultivos submersos foram feitos inoculando-se bactérias em placas de AFP por 24 horas a 37 °C. Após esse tempo, algumas colônias foram suspensas em solução salina estéril até atingirem uma leitura de 0,4 U em espectrofotômetro (600 nm). Os meios de cultivo foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo com absorvância de 0,4 U (600 nm) para cada 100 mL de meio de cultura.

### 3.8 Seleção de substratos para produção de queratinase

Penas, farinha de pena e cabelo foram testados como substratos (10 g/L) para produção de protease extracelular por *Bacillus* sp. P7 em meio mineral. O meio mineral foi composto por NaCl (0,5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 g/L) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 g/L) em água destilada. O pH inicial do meio foi ajustado para 8,0 antes da esterilização (121 °C por 15 min).

Frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio mínimo mineral e 1% dos diferentes substratos, foram inoculados com 250 µL (1% v/v) de inóculo (seção 3.7), e incubados a 30 °C em incubadora com agitação orbital (125 rpm) por 5 dias. Alíquotas (500 µL) dos cultivos foram retiradas, centrifugadas (10.000 x g por 5 min) e o sobrenadante foi utilizado para realização do ensaio enzimático visando estimar a atividade proteolítica extracelular. O substrato que apresentou a produção mais elevada de atividade proteolítica foi selecionado, sendo utilizado nos estudos subseqüentes.

### **3.9 Produção da enzima**

A produção de queratinase foi conduzida por incubação durante 48 horas em estufa com agitação (125 rpm) na temperatura de 30 °C. Uma amostra do cultivo foi centrifugada (10000 x g por 5 min) para separação da biomassa celular e substâncias insolúveis. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para análises de atividade enzimática sob diferentes condições.

### **3.10 Ensaio de atividade proteolítica**

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína como substrato. A reação foi iniciada misturando-se 100 µL da enzima com 100 µL de tampão Tris (0,02 M pH 8,0). Foi adicionado 100 µL do substrato (azocaseína 10 mg/mL). Essa mistura foi incubada por 30 min a 37 °C e a reação foi interrompida adicionando-se 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a 10.000 x g por 5 min ser realizada, nos 800 µL do sobrenadante, adicionou-se 200 µL de NaOH 1,8 N. A leitura da amostra foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste.

### **3.11 Ensaio de Atividade Queratinolítica**

O ensaio utilizando azoqueratina foi realizado segundo método descrito por Lin et al. (1992), com algumas modificações. O substrato foi suspenso em

tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,0), em concentração de 10 mg/mL. Cem microlitros desta suspensão foram transferidos para tubos de microcentrifugas contendo 100  $\mu$ L do mesmo tampão. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L da amostra contendo a enzima e, após agitação, a mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%, seguida de centrifugação por 5 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi coletado e sua absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Shimadzu U-1100) a 440 nm. O controle foi preparado da mesma forma exceto pela anterior adição de TCA à enzima. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,01 unidade de absorbância a 440 nm nas condições acima.

E/ou farelo de soja (5 g/L), em meio mineral. O meio mineral foi composto por  $K_2HPO_4$  (5,0 g/L),  $KH_2PO_4$  (5,0 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,1 g/L),  $CaCl_2$  (0,025 g/L),  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01 g/L) e  $MnSO_4$  (0,01 g/L), em água destilada.

### **3.12 Purificação Parcial da Enzima**

#### **3.12.1 Precipitação com sulfato de amônio**

A linhagem bacteriana *Bacillus* sp. P7 foi cultivada em condições ótimas de produção da enzima, sendo o volume do cultivo de 100 mL. A precipitação com sulfato de amônio foi realizada com o sobrenadante do cultivo, obtido através da centrifugação deste em centrífuga refrigerada (4 °C), durante 15 minutos a 10.000 x g.

A taxa de saturação utilizada para o extrato enzimático da bactéria *Bacillus* sp. P7 foi de 0-60%. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração e agitação. A quantidade de sulfato de amônio necessária para atingir esta faixa de saturação foi calculada com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação segundo Scopes (1994).

Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para a etapa de precipitação, a suspensão formada foi mantida por 1 hora sob agitação e, após, mais 1 hora em repouso sob refrigeração. Então, esta suspensão foi centrifugada (10.000 x g por 15 min), e o precipitado foi ressuspendido em 2 mL de tampão Tris-HCl (0,02 M pH 8,0). A amostra ressuspendida foi então dialisada contra o mesmo tampão por 12 horas. Após a diálise a amostra foi armazenada para posteriores análises.

### **3.12.2 Cromatografia líquida de gel filtração**

A suspensão resultante da etapa anterior foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração (Sephadex G-200) em volume não superior a 5% do volume de resina da coluna. A coluna (20 x 0,8 cm), com fluxo de 0,40 mL/minuto, foi eluída com tampão tris HCl (20 mM; pH 8,0), sendo coletadas 20 frações de 1 mL cada. Para cada fração foram realizados o ensaio enzimático (seção 3.10) e a estimativa da concentração de proteínas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro (280 nm).

### **3.12.3 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica**

Às frações reunidas na cromatografia líquida de gel-filtração foi adicionado sulfato de amônio, em concentração final de 55 mM. Este material

foi aplicado em coluna (10,5 x 0,65 cm) de cromatografia líquida de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose), com fluxo de 0,28 mL/minuto, sendo coletadas 20 frações de 1 mL cada. As primeiras cinco (05) frações foram eluídas com tampão Tris-HCl (20 mM; pH 8,0) contendo 55 mM de sulfato de amônio, e as frações seguintes foram eluídas com o mesmo tampão não adicionado de sulfato de amônio. Em cada fração coletada foram realizados o ensaio enzimático e a estimativa da quantidade de proteínas através de leitura da absorbância em espectrofotômetro (280 nm). As frações com atividade foram unidas, sendo realizados o ensaio enzimático bem como a determinação da concentração de proteínas solúveis.

#### **3.12.4 Cromatografia de Troca catiônica (SP-Sepharose)**

As frações reunidas na cromatografia líquida de gel-filtração 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 30 frações de 2mL cada. A amostra foi eluída com tampão Tris-HCl (20 mM pH 8,0) e posteriormente com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. A absorbância a 280 nm e a atividade enzimática (UA/mL) das frações coletadas (2 mL) foram determinadas.

#### **3.12.5 Cromatografia de Troca aniônica (DEAE-Sepharose)**

As frações com maior atividade foram reunidas e aplicadas em coluna (10,5 x 0,65 cm) de cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose) com fluxo de 0,6 mL/minuto, sendo coletadas 30 frações de 2mL cada. A amostra

foi eluída com tampão Tris-HCl (20 mM pH 8,0) e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. A absorbância a 280 nm e a atividade enzimática (UA/mL) das frações coletadas (2 mL) foram determinadas.

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

Após a purificação parcial do extrato bruto da bactéria *Bacillus* sp. P7, o padrão protéico foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Amostras das etapas de purificação parcial foram precipitadas através da adição de solução de ácido tricloroacético (TCA; 500 g/L) até a concentração de 20% em acetona (v/v). Esta mistura foi mantida sob refrigeração durante aproximadamente 12 horas e, após, foi centrifugada (15.000 x g por 15 minutos). O pellet resultante foi ressuspensionado em acetona e centrifugado (15.000 x g por 5 minutos). Este processo foi repetido diversas vezes, visando remover possíveis impurezas.

Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em 25 µL de tampão de amostra. O tampão de amostra foi preparado com 1 mL de tampão Tris-HCl (500 mM; 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 ressuspensão foi incubada a 100 °C por 5 minutos 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 foi possível após coloração do gel com nitrato de



prata (Heukeshoven e Dernick, 1985). No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

### **3.14 Zimograma**

A zimografia foi desenvolvida em gel de poliacrilamida contendo SDS e 1 mg/mL de gelatina. As amostras foram diluídas no tampão de amostra exceto a adição de agente redutor e desnaturação por calor. Segundo Laemmli et al. (1970), SDS-PAGE foi desenvolvida a 4 °C em gel de 12% de poliacrilamida com 1 mg/mL de gelatina que foi copolimerizada ao gel. 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 minutos. Após, o gel foi incubado com Tris-HCl (0,05 mM pH 8,0) contendo 0,5% de NaN<sub>3</sub> a 37 °C durante 12 horas. Em seguida, o gel foi fixado com metanol 50% contendo 10% de ácido acético e corado com Comassie Blue (Koshikawa et al., 1998).

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

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951), com o emprego de reagente de Folin-Ciocalteu. Trabalhou-se com dois reagentes: o reagente combinado (RC), preparado com 0,5 mL de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,5%, 0,5 mL de tartarato de Na/K 1% e solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2%) em NaOH 0,1N até o volume de 50 mL; e o reagente de Folin-Ciocalteu (FC), que foi diluído (1:1) com água destilada.

Para a reação misturou-se 100 µL de amostra e adicionou-se 2,5 mL de RC, deixou-se 10 minutos a temperatura de 37 °C. Adicionou-se 300 µL do reagente de FC diluído e deixou-se à temperatura ambiente por mais 30 minutos. As determinações de proteína solúvel de cada ponto foram realizadas em triplicata e foi medida a absorbância (750nm) em espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini-1240. Paralelamente, foi preparado um controle com 100 µL de água destilada mais reagentes. A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva-padrão preparada com albumina sérica bovina.

### **3.16 Caracterização da queratinase parcialmente purificada**

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

Para determinação da temperatura ótima, foi utilizada a metodologia já descrita no item 3.10, variando-se apenas as temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas foram 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80 °C. Determinaram-se as atividades relativas considerando-se como 100% a temperatura onde houvesse a maior atividade enzimática.

#### **3.16.2 Determinação do pH ótimo da atividade enzimática**

O ensaio para pH ótimo da atividade enzimática foi realizado da mesma maneira descrita no item 3.10, substituindo-se apenas o tampão utilizado pelos tampões citrato 20 mM (pH 5,0 e 5,5), fosfato de sódio 20 mM (pH 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5), Tris-HCl (pH 8,0; 8,5; 9,0 e 10,0) e carbonato (pH 11,0 e 12,0).

Determinaram-se as atividades relativas considerando-se como 100% o pH no qual foi observada a maior atividade enzimática.

### **3.16.3 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se a enzima parcialmente purificada por 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90 ou 120 minutos em temperaturas de 45, 50, 55, 60, 65 ou 70 °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. A atividade residual da enzima nestes testes foi expressa como porcentagem da atividade enzimática apresentada no tempo zero (controle).

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

O efeito de diferentes detergentes sobre a atividade enzimática foi avaliado através da pré-incubação da enzima com o respectivo detergente por 10 min em temperatura ambiente. Os detergentes testados foram os seguintes: SDS e Triton X-100, em concentrações de 0,5% e 1%. Após este período, o ensaio enzimático foi realizado (item 3.10).

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

Foi realizado método similar ao anteriormente descrito (item 3.16.4), exceto pela adição de sais em diferentes concentrações no meio reacional (1 e

5 mM). Os sais testados foram:  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{SrCl}_2$ .

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

O efeito de solventes foi avaliado de forma similar ao ensaio já descrito (item 3.16.4) exceto pela adição de solventes em determinadas concentrações ao meio reacional. A pré-incubação foi realizada por 10 minutos à temperatura ambiente e os solventes utilizados foram: DMSO (0,5 e 1%), isopropanol (0,5 e 1%) e acetonitrila (0,5 e 1%).

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

O efeito de inibidores sobre a enzima foi avaliado utilizando método similar ao descrito no item 3.16.4 exceto pela utilização de inibidores nas concentrações indicadas no meio reacional. Foi realizada pré-incubação da enzima e inibidor por 10 minutos em temperatura ambiente. Os inibidores utilizados foram: EDTA (1 e 5 mM), PMSF (1 e 5 mM) e 1,10-fenantrolina (1 e 5 mM). Um controle foi realizado através da realização da atividade enzimática sem a adição de inibidores.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Escolha do microrganismo produtor de queratinase

A biodiversidade microbiana é a principal fonte para novos produtos e processos biotecnológicos (Gupta et al., 2002). A bioprospecção da vasta biodiversidade amazônica, particularmente, pode conduzir ao isolamento de linhagens produtoras de diversos metabólitos com aplicações industriais e comerciais (Giongo et al., 2007).

A primeira etapa deste trabalho foi a escolha do microrganismo. Esta se baseou em trabalho anterior (Giongo et al., 2007), onde foram caracterizadas linhagens bacterianas isoladas da Bacia Amazônica. O microrganismo escolhido foi *Bacillus* sp. P7, uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, produtora de endósporos. Em pH 8,0 e 30 °C o microrganismo encontra-se nas condições ótimas de crescimento.

Microrganismos queratinolíticos e queratinases microbianas apresentam um amplo espectro nas aplicações industriais, apresentando valores potenciais na bioconversão de resíduos queratinosos, nas indústrias de detergentes, fertilizantes, biopolímeros, farmacêutica e na indústria de rações animais, bem como no processamento do couro e na hidrólise de príons (Gupta and Ramnani, 2006; Brandelli, 2008). Por este motivo, tais microrganismos e enzimas têm sido o foco de interesse em vários estudos (Bressollier et al.,

1999; Macedo et al., 2005; Thys and Brandelli, 2006; Anbu et al., 2007; Riffel et al., 2007; Kumar et al., 2008).

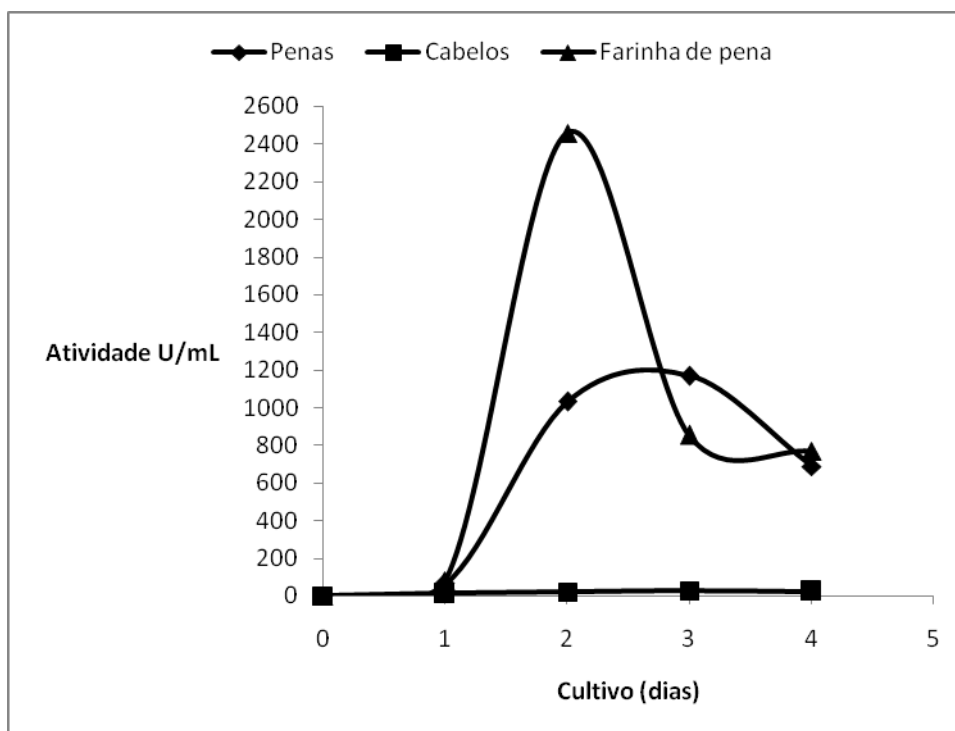
#### **4.2 Seleção de substratos para produção de queratinase**

Diferentes substratos foram testados visando a produção de protease extracelular por *Bacillus* sp. P7 em cultivos submersos. O cultivo no substrato farinha de pena resultou em maior produção de protease, alcançando valores máximos para a atividade enzimática em 48 horas de cultivo (figura 1). Também se pode observar uma maior solubilização de proteínas no meio contendo este substrato (figura 2).

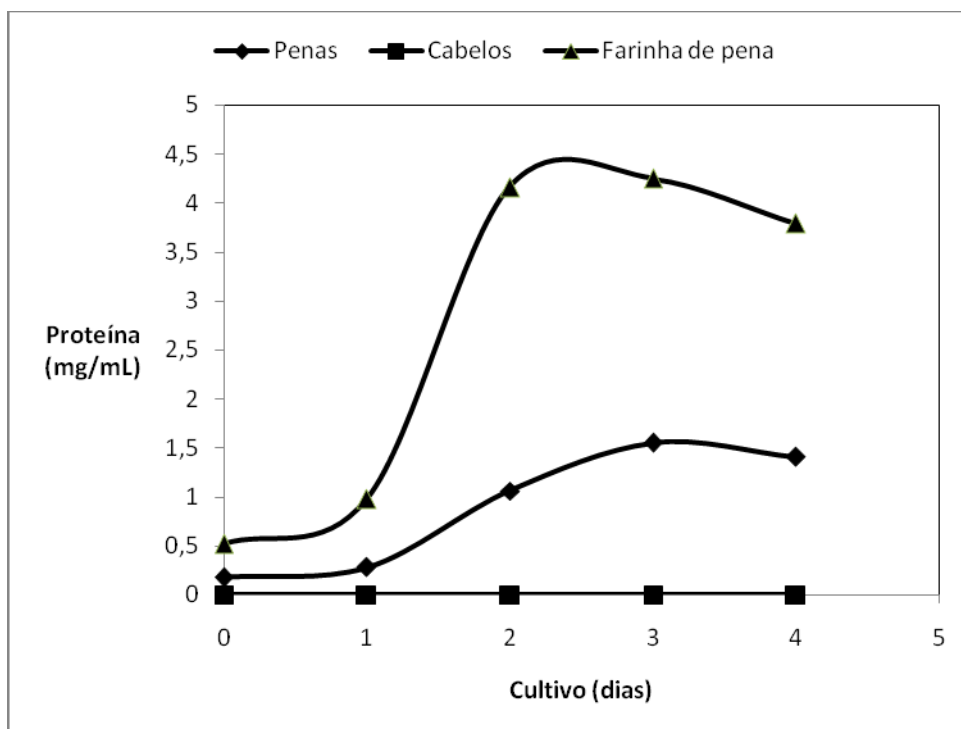
*Bacillus* sp. P7 mostrou degradar fortemente farinha de pena, bem como pena inteiras durante os cultivos submersos, no entanto, cabelo humano não foi degradado após 96 horas de cultivo (Fig. 1). Resultados similares foram relatados, confirmando a diversidade conformacional da queratina do cabelo em relação a queratina da pena (Daroit et al., 2009). A concentração de proteínas solúveis em cultivos submersos é atualmente utilizada como uma medida de degradação de penas (Szabó et al., 2000). A maior produção de proteína solúvel na farinha de pena pode ser resultado de uma maior acessibilidade e homogeneidade deste substrato quando comparado com penas inteiras. Tais hidrolisados protéicos são resultados da conversão microbiana da queratina da pena e pode ser utilizada como um ingrediente em rações para animais ou como fertilizante orgânico (Grazziotin et al., 2006).

A produção de queratinases microbianas são frequentemente induzidas por substratos queratinosos, tais como penas e farinha de pena (Gupta and Ramnani, 2006). Resultados similares ao deste trabalho foram relatados por

Son et al. (2008). Desta forma o substrato farinha de pena foi escolhido para ser utilizado em estudos subseqüentes.



**Figura 1:** Produção de protease por *Bacillus* sp. P7 em diferentes substratos ricos em queratina.



**Figura 2:** Concentração de proteína solúvel durante cultivo de *Bacillus* sp. P7 em diferentes substratos ricos em queratina.

A linhagem P7 mostrou elevada produção de protease na farinha de pena, o qual é um substrato bastante disponível e barato. Assim, a utilização de tal substrato pode resultar em um processo custo-benefício mais eficaz.

De forma semelhante ao observado neste estudo, farinha de pena tem sido empregada em outros estudos (De Toni et al., 2002; Pissuwan & Suntornsuk, 2001; Letorneau et al., 1998), assim como as penas inteiras também são muito utilizadas para produção de queratinase (Willians et al., 1990; Riffel et al., 2003; Zerdani et al., 2004; Thys et al., 2004).



### **4.3 Purificação parcial da queratinase extracelular produzida por *Bacillus* sp. P7**

O objetivo geral de um processo de purificação de proteínas não é apenas a remoção de contaminantes indesejados, mas também a concentração da proteína de interesse e sua transferência para um ambiente onde esta apresenta-se estável e adequada para a aplicação pretendida. A pureza de proteínas é pré-requisito para o estudo de suas estruturas e funções, ou para suas aplicações potenciais, sendo que o nível de purificação requerido depende do uso final da proteína. Alto grau de pureza é necessário para estudos estruturais ou aplicações terapêuticas, e baixo ou moderado grau de pureza para aplicações industriais, como na indústria alimentícia ou na produção de detergentes domésticos (Queiroz et al., 2001).

O cultivo de *Bacillus* sp. P7 em meio mineral contendo farinha de pena (10 g/L) foi centrifugado após 48 horas de incubação. O sobrenadante resultante, denominado extrato bruto, foi utilizado como fonte de enzima no processo de purificação parcial da queratinase extracelular. O processo de purificação consistiu de 4 etapas: precipitação com sulfato de amônio; cromatografia líquida de gel-filtração; e duas cromatografias de troca-iônica. O resumo do processo de purificação parcial é apresentado na tabela 4.

A primeira etapa de purificação da queratinase extracelular consistiu na precipitação de proteínas do extrato bruto por meio da adição de sulfato de amônio de modo a atingir uma saturação de 60%. A precipitação resultou na recuperação de aproximadamente 27% da atividade proteolítica presente no extrato bruto (100%), e em aumento de 1,4 vezes na atividade específica

(tabela 4). Os valores de atividade específica e fator de purificação apresentados na tabela 4 foram calculados tendo azocaseína como substrato. Destaca-se o elevado fator de purificação obtido após a última etapa cromatográfica.

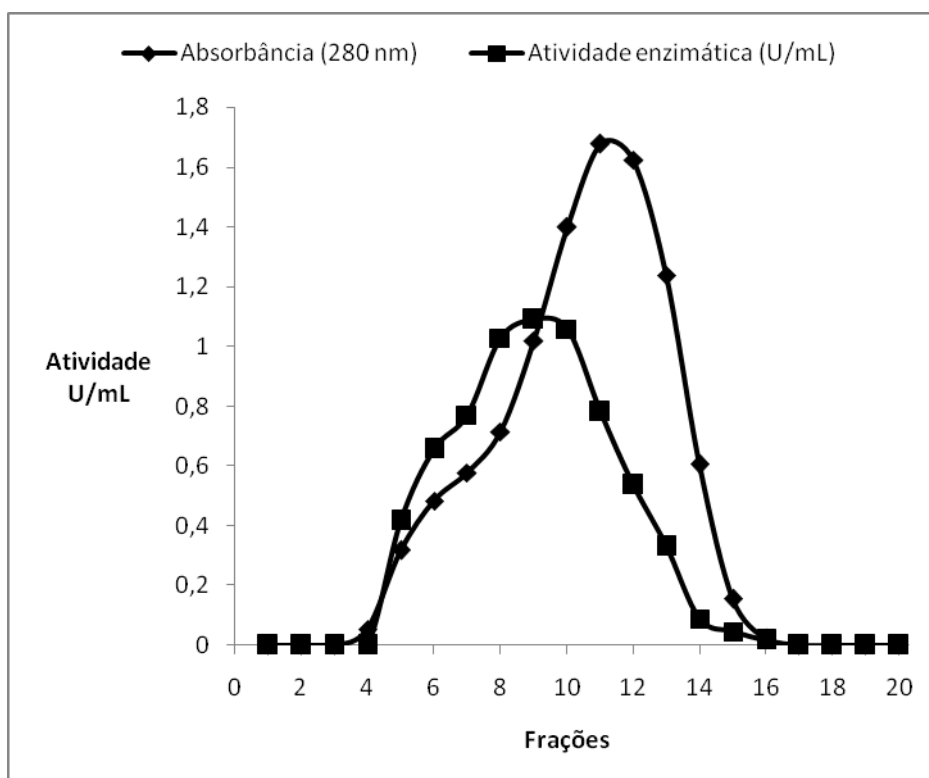
**Tabela 4.** Quadro de purificação parcial da queratinase extracelular produzida por *Bacillus* sp. P7

Etapa de purificação	Atividade Azocaseína (U/mL)	Atividade Azoqueratina (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação
Extrato bruto	1446	242	3,33	432.2	1,0
Precipitação	2192	285	3,60	608.8	1,4
Sephadex G-200	1109	194	0,70	1,584	3,6
SP-Sepharose	840	116	0,35	2,400	5,5
DEAE-Sepharose	389	86	0,03	12,966	29,8

A amostra resultante da etapa de precipitação com sulfato de amônio foi aplicada em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração Sephadex G-200, equilibrada com tampão tris-HC (20 mM; pH 8,0) e eluída com o mesmo tampão. A figura 3 apresenta o perfil de uma eluição típica. Na eluição foram coletadas 20 frações de 1mL cada. Neste cromatograma pode ser observado um pico de proteína (fração 11), e um pico de atividade enzimática (fração 9). A eluição da atividade enzimática nas primeiras frações pode indicar que a

queratinase seja uma enzima de peso molecular elevado, provavelmente maior que 100-150 kDa, ou que a enzima esteja agregada ou associada a outras moléculas.

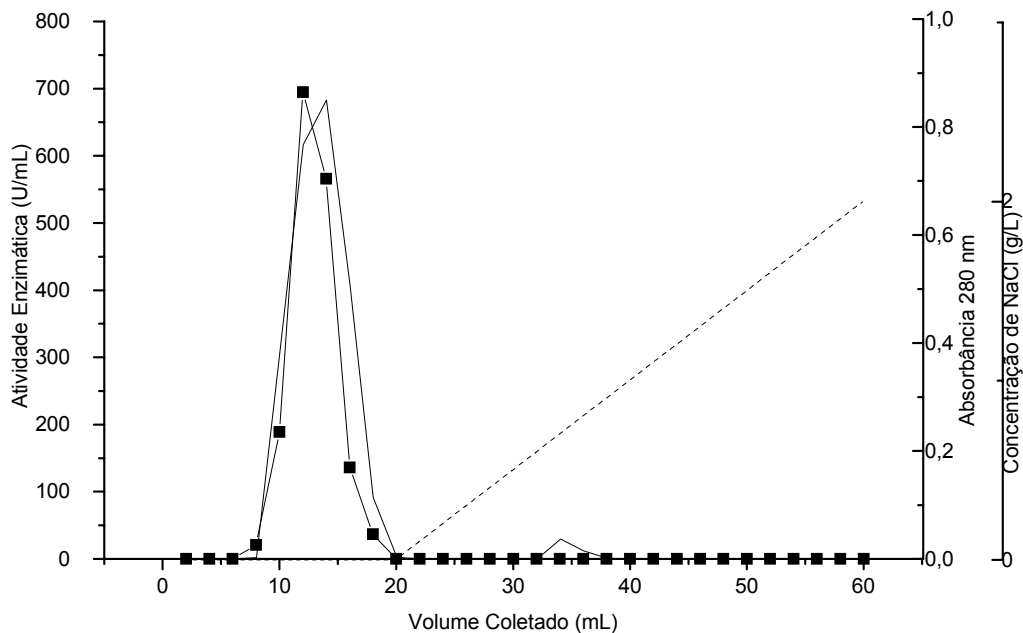
A cromatografia líquida de gel-filtração separa moléculas basicamente por tamanho e massa molecular, sendo que moléculas maiores são eluídas da coluna antes das moléculas menores. Isto ocorre, pois moléculas menores têm acesso a uma maior porção dos poros da resina na coluna e, com isso, a migração através da mesma ocorre em menor velocidade (Scopes, 1994; Popovici & Schoenmakers, 2005; Yu et al., 2006).



**Figura 3:** Padrão de eluição em coluna de cromatografia líquida de gel-filtração com a resina Sephadex G-200. (■) atividade enzimática (U/mL); (◆) absorbância a 289 nm.

As frações com atividade na etapa de gel filtração (8-10) foram unidas, e aplicadas em coluna de cromatografia líquida de troca-iônica. A separação por cromatografia de troca-iônica depende da adsorção reversível de moléculas de soluto carregadas a um grupo imobilizados de moléculas de cargas opostas. A matriz cromatográfica consiste em uma matriz porosa insolúvel onde um grupo carregado fica covalentemente ligado. A matriz SP-Sepharose foi acomodada em uma coluna de 10,5 cm de comprimento e 0,65 cm de diâmetro. Inicialmente, a coluna foi eluída com tampão tris-HCl (20 mM, pH 8,0) e, posteriormente, com um gradiente linear de NaCl 0-1M. Foram coletadas 30 frações de 2 mL, e aquelas que apresentaram um pico de absorbância foram submetidas a análise da atividade enzimática.

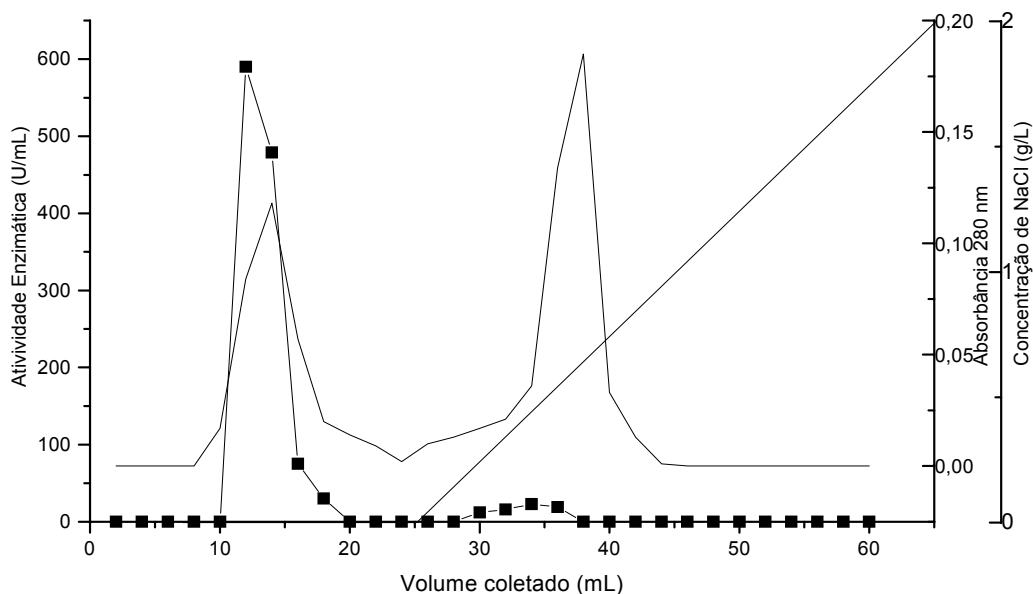
A figura 4 ilustra o perfil de eluição da enzima proteolítica utilizando resina de troca catiônica SP-Sepharose. Observa-se que a enzima foi coletada nas primeiras frações ainda antes do início do gradiente salino, sugerindo que nestas condições de pH a referida enzima não adsorveu na resina de troca catiônica. Provavelmente, em pH 8,0 a enzima não se encontra abaixo do ponto isoelétrico, ou seja, positivamente carregada para interagir com a resina SP-Sepharose. No entanto, observa-se que foi possível aumentar de 3,6 vezes para 5,5 vezes o fator de purificação.



**Figura 4:** Perfil de eluição em coluna de cromatografia líquida de troca iônica SP-Sepharose. (■) atividade enzimática (U/mL); (--) absorbância 280 nm; (...) gradiente linear de NaCl (0-1M).

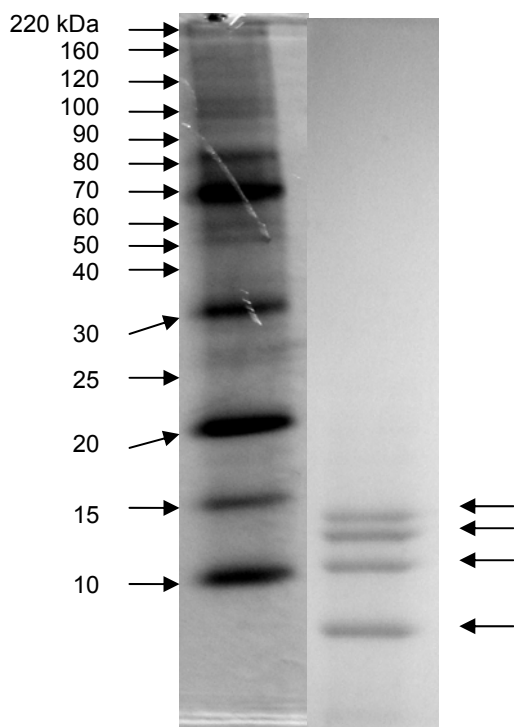
A matriz DEAE-Sepharose foi acomodada em uma coluna de 10,5 cm de comprimento e 0,65 cm de diâmetro. Inicialmente, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) e, posteriormente, eluída utilizando o gradiente linear de NaCl 0-1M. Foram coletadas 30 frações de 2 mL, as frações que apresentaram um pico de absorbância foram submetidas a análise da atividade enzimática.

A figura 5 ilustra o perfil de eluição da enzima utilizando resina de troca aniônica DEAE-Sepharose. É possível observar, que mesmo a enzima não se ligando a resina aniônica, foi possível separá-la de outros interferentes protéicos que foram eluídos durante o gradiente salino.



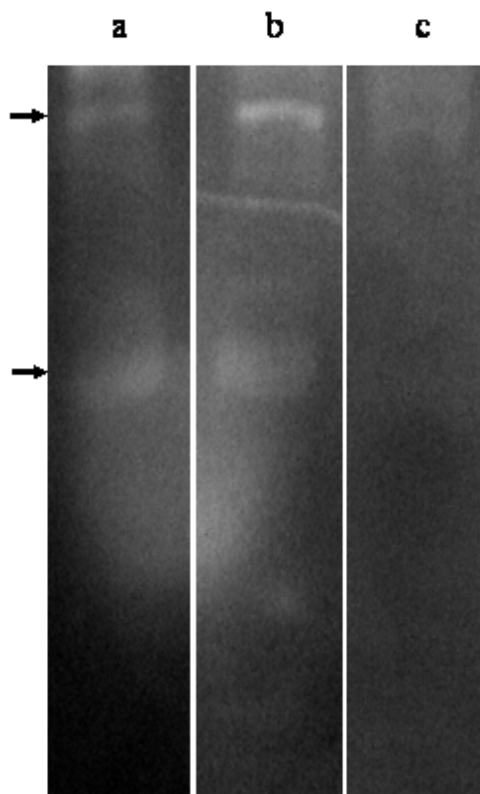
**Figura 5:** Perfil de eluição em coluna de cromatografia líquida de troca iônica DEAE-Sepharose. (■) atividade enzimática (U/mL); (--) absorvância 280 nm; (...) gradiente linear de NaCl (0-1M).

O padrão protéico após a purificação parcial foi analisado através de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme é apresentado na figura 6. A coloração do gel revelou 4 bandas com pesos moleculares inferiores a 20 KDa.



**FIGURA 6:** SDS-PAGE de amostra do processo de purificação parcial. **M:** marcador de peso molecular; **P:** padrão protéico após purificação parcial. As setas indicam bandas majoritárias após coloração com nitrato de prata.

Amostras obtidas na última etapa de purificação também foram submetidas à eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE), ilustrada na figura 7. Após a PAGE, a atividade proteolítica no gel foi visualizada através de zimograma com colágeno. Estes resultados indicaram a presença de duas bandas com atividade proteolítica.



**FIGURA 7:** Zimograma de gelatina da queratinase parcialmente purificada. Após a eletroforese, o gel foi incubado sem inibidor (a), ou na presença de 10 mM EDTA (b) ou 10 mM PMSF (c).

Após as etapas de purificação, duas bandas proteolíticas foram reveladas através da análise do zimograma (Fig.7). Quando o zimograma de gelatina foi incubado na presença de EDTA (Fig. 7b) e PMSF (Fig. 7c), ambas as bandas proteolíticas foram inibidas principalmente por PMSF, sugerindo uma característica de serina protease.

*Bacillus* sp. P7 apresenta a produção de várias proteases extracelulares durante o crescimento em caldo farinha de pena (Giongo et al. 2007), e isso também é freqüentemente relatado por outros *Bacillus* sp. (Daroit et al. 2009;



Kobaiashy et al. 1996). Embora as bandas proteolíticas possam representar diferentes proteases, múltiplas formas eletroforéticas podem ser resultados de uma deaminação irreversível de resíduos de glutamina ou asparagina na proteína; ou de autoproteólise (Kobayashi et al. 1996). No entanto, a elucidação deste estudo necessita de futuras investigações.

#### **4.4 Cromatografia líquida de interação hidrofóbica**

Nesta etapa cromatográfica a enzima não apresentou em nenhuma fração coletada atividade queratinolítica, sendo uma etapa eliminada do trabalho.

#### **4.5 Temperatura e pH ótimos da enzima parcialmente purificada**

Todas as enzimas são sensíveis à concentração de  $H^+$  do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre, porque como outras proteínas, as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Em consequência disso pode haver uma troca na velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ), na afinidade da enzima pelo substrato ( $K_m$ ) ou na própria estabilidade da enzima, pois esta depende do tempo em que se mantém exposta ao pH desfavorável (Wiseman, 1991).

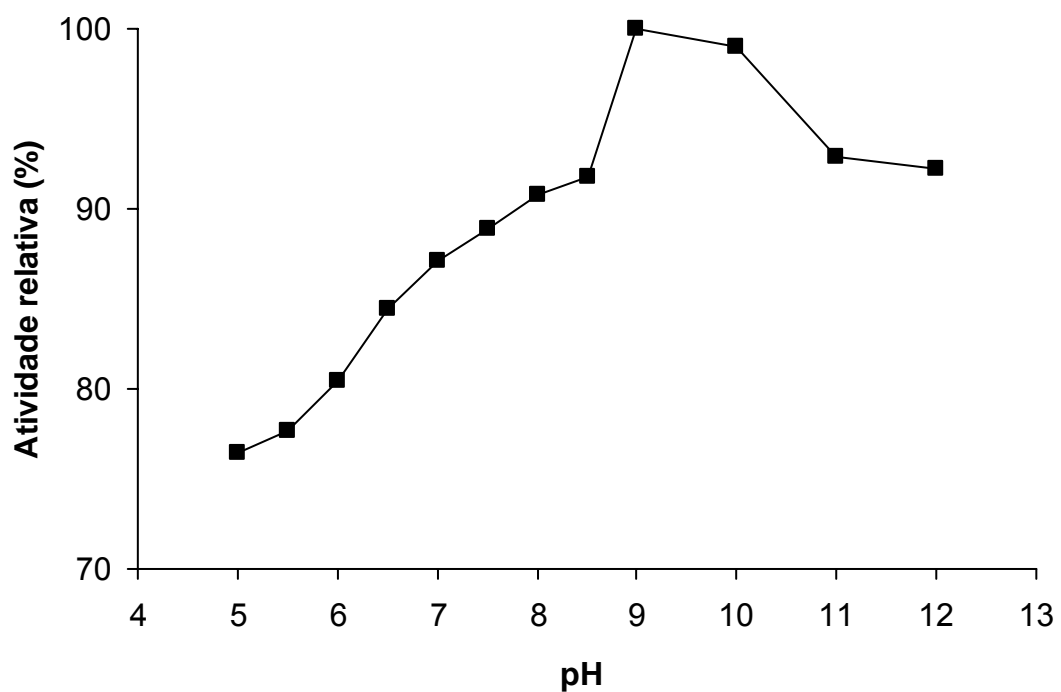
A temperatura é uma variável crítica em alguns processos enzimáticos, produzindo simultaneamente efeitos opostos de aumento de reatividade

enzimática e inativação (Illanes et al., 2000). A variação da atividade enzimática em função da temperatura pode resultar no aumento da agitação das moléculas com elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e pode provocar a desnaturação da enzima, frente ao calor (Trevan et al., 1990; Scriban et al., 1985).

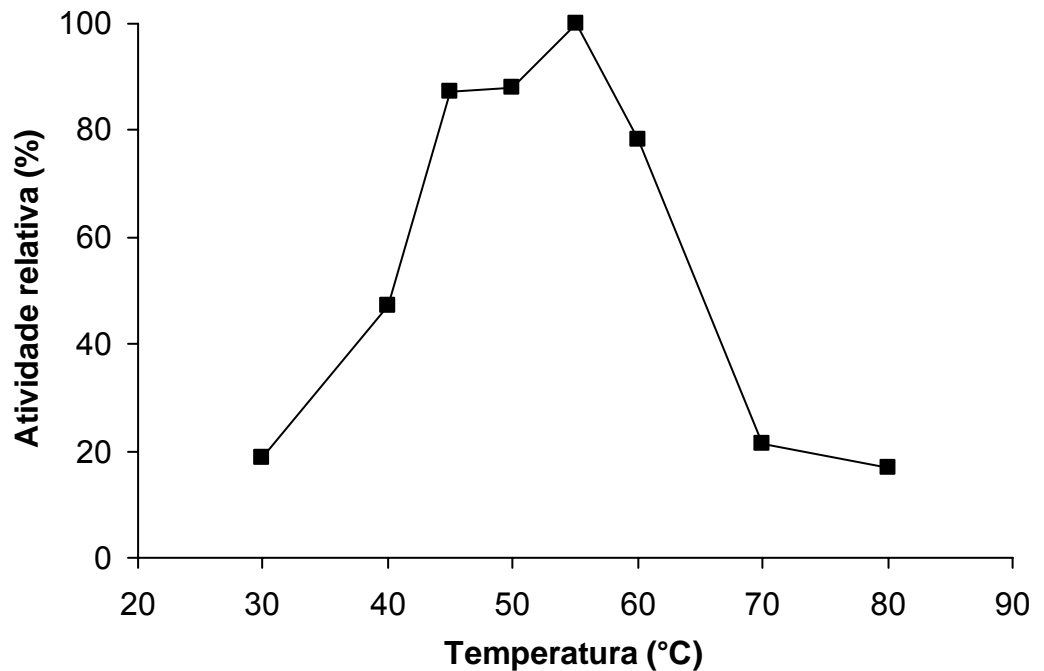
Os efeitos de temperatura e pH na atividade da queratinase extracelular parcialmente purificada, foram avaliadas. A atividade máxima foi observada em pH 9,0 e a atividade relativa foi acima de 90% em pH 10-12 (Fig. 8), indicando um caráter predominantemente alcalino.

Resultados similares foram relatados por, Kobayashi et al., (1995), onde as enzimas apresentaram pH ótimo na faixa de 11,0; Bernal et al., (2005), apresentou uma queratinase com pH ótimo em 10,0; Bhaskar et al., (2007), com uma protease parcialmente purificada com pH ótimo em 8,0 e Ogino et al., (2008), apresentou uma protease com pH ótimo alcalino.

A temperatura ótima da atividade da enzima de *Bacillus* sp. P7 foi 55 °C, além dos quais houve um rápido declínio (Fig. 9). Em 45 e 50 °C, a enzima apresentou aproximadamente 90 % da atividade máxima. Queratinases microbianas normalmente têm condições favoráveis de temperatura no intervalo de 30-80 °C, (Gupta e Ramnani, 2006). Por exemplo, queratinase de *Bacillus subtilis* MTCC (9102) apresentou atividade máxima em 40 °C (Balaji et al., 2008); a ótima atividade do *Bacillus subtilis* KS-1 foi observada em 60 °C (Suh e Sotavento, 2001); queratinase de *Streptomyces* sp. O S.K1-02 mostrou a ótima atividade em 70 °C (Letourneau et al., 1998); e *Microbacterium* sp. kr10 apresentou a atividade máxima em 50 °C (Thys e Brandelli, 2006).



**Figura 8:** Efeito da variação do pH sobre a atividade da queratinase extracelular de *Bacillus sp. P7* parcialmente purificada.

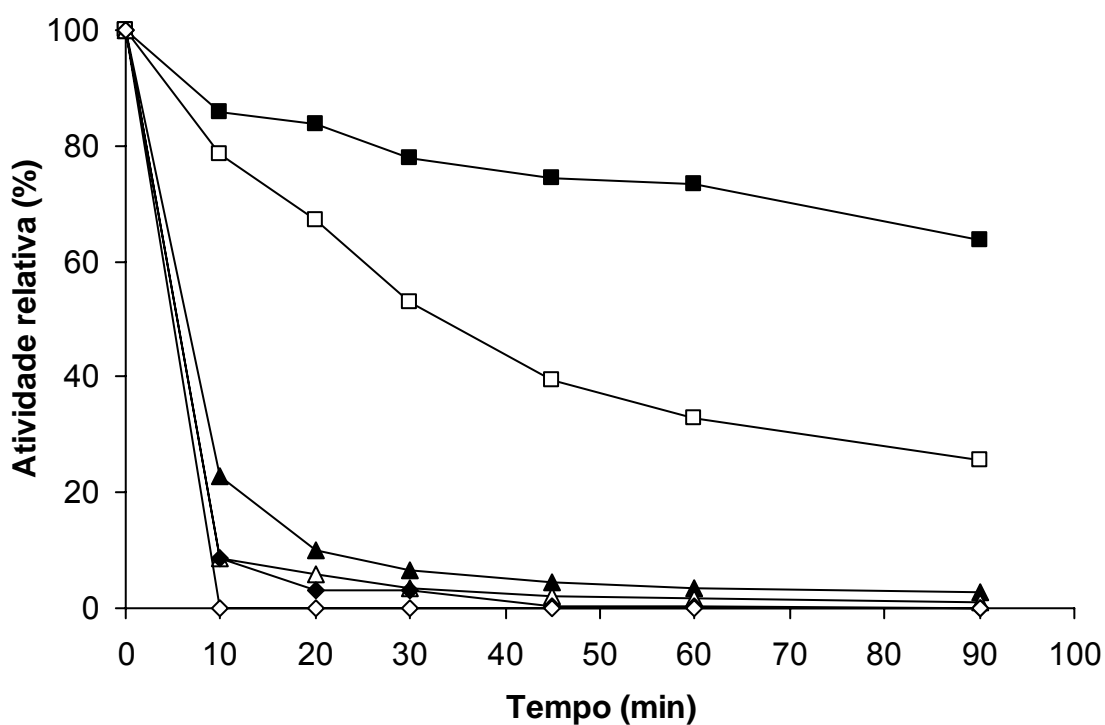


**Figura 9:** Efeito da variação da temperatura sobre a atividade da queratinase extracelular de *Bacillus* sp. P7 parcialmente purificada.

#### 4.6 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da queratinase parcialmente purificada foi avaliada incubando a enzima em diferentes temperaturas (entre 45 a 70 °C) durante 90 minutos, depois do qual o ensaio de atividade enzimática foi executado. Menos de 25 % da atividade inicial foram mantidas depois da pré-incubação em 55, 60 e 65 °C; ao passo que completa inativação foi observada depois de 10 minutos em 70 °C (Fig. 9). A pré-incubação em 45 °C durante 10 e 90 minutos resultou na atividade relativa de 85 % e 65 %, respectivamente; e em 50 °C, 78 % e 25 % da atividade inicial foi mantida depois de 10 e 90 minutos da pré-incubação, respectivamente (Fig. 10). Outras queratinases como de *Kocuria rosea* permaneceu totalmente ativa depois de 1h de pré-incubação em 10-60 °C, mostrando 40 % da atividade inicial depois de 1 h em 90 °C (Bernal et al., 2006). Assim, os efeitos observados da temperatura na

atividade de enzima (Fig. 9) e estabilidade (Fig. 10), pode ser concluído que queratinase de *Bacillus* sp. P7 possui baixa termotolerância e termoestabilidade. Essas são características desejáveis no controle eficiente da reatividade da enzima em processos que implicam hidrólise de proteína (Rao et al., 1998). Estas características vem ao encontro do crescente interesse pelo desenvolvimento de processos industriais com menor gasto energético por operar a temperaturas moderadas (Chauhan & Gupta 2002).



**Figura 10:** Estabilidade térmica da queratinase parcialmente purificada a 45 °C (■), 50 °C (□), 55 °C (▲), 60 °C (△), 65 °C (◆) e 70 °C (◇).

#### 4.7 Efeito de produtos químicos na atividade da enzima

Estudos de efeitos de químicos sobre a atividade enzimática tornam-se importantes no reconhecimento das condições nas quais a atividade enzimática

apresenta-se máxima, visando otimizar o desempenho enzimático em processos específicos através da adição de compostos que estimulem a atividade enzimática, ou através da supressão de compostos que, presentes no meio reacional, possam afetar negativamente a hidrólise enzimática.

A atividade enzimática foi ligeiramente inibida pelo agente redutor  $\beta$ -mercaptoethanol (tabela 5). Assim como a inibição provocada por  $Hg^{2+}$ , este resultado pode indicar que grupos  $-SH$  não são essenciais para a atividade catalítica, mas são necessários para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima (Riffel et al., 2007; Daroit et al., 2008). Esta resistência da enzima em relação ao  $\beta$ -mercaptoethanol é de interesse para fins industriais, para que a queratina possa ser enfraquecida pela ruptura das pontes dissulfeto por agentes redutores sem que haja uma perda significativa na atividade enzimática (Mitsuik et al., 2004). Os solventes orgânicos acetonitrila, DMSO e isopropanol, nas concentrações empregadas, não afetaram a atividade enzimática (tabela 5). Similarmente, a adição de solventes orgânicos também não influenciou a atividade queratinolítica de *Kocurea rósea* (Bernal, et al., 2005) e *Nocardiosis* sp. TOA-1 (Mitsuiki et al., 2004). Triton X-100, um detergente não-iônico, mostrou efeito negativo na atividade enzimática; enquanto que o SDS na concentração de 1% (m/v) estimulou a atividade da enzima (tabela 5). Contrariamente, SDS é apresentado como inibidor de algumas queratinases microbianas (Riffel et al., 2007; Tatineni et al., 2008).

**Tabela 5:** Efeito de vários reagentes na atividade queratinolítica

Reagente	Concentração	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,0
SDS	0.5% (m/v)	63,2
	1% (m/v)	128,6
Triton X-100	0.5% (v/v)	83,9
	1% (v/v)	67,2
$\beta$ -mercaptoetanol	1 mM	88,0
	5 mM	72,2
Acetonitrila	0.5% (v/v)	88,1
	1% (v/v)	92,3
DMSO	0.5% (v/v)	103,9
	1% (v/v)	97,3
Isopropanol	0.5% (v/v)	113,3
	1% (v/v)	92,5

#### 4.8 Efeito de sais na atividade da enzima parcialmente purificada

O efeito de íons é muitas vezes variável, dependendo da enzima em estudo. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  aumentaram a atividade de enzima em ambas as concentrações testadas (1 e 5 mM), ao passo que a inibição foi observada com os íons  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ .

Algumas proteases, como as proteases alcalinas, requerem íons metálicos divalentes como o  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  ou a combinação desses cátions para a obtenção de uma maior atividade (Kumar & Takagi, 1999). Acredita-se que esses cátions protegem a enzima contra a desnaturação em função da temperatura, mantendo a atividade em altas temperaturas (Satoshi & Noriaki, 2004).

Os íons metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  podem estimular a atividade da enzima atuando como sal ou pontes de íon que estabilizam a enzima na sua conformação ativa, e poderiam proteger a enzima contra desnaturação térmica (Balaji et al., 2008; Sareen e Mishra, 2008).

O efeito inibidor de  $\text{Zn}^{2+}$  é relatado em algumas metaloproteases, que resulta de pontes formadas entre o hidróxido de zinco ( $\text{ZnOH}$ ) e íons de zinco catalíticos no sítio ativo (Riffel et al., 2007). O íon  $\text{Hg}^{2+}$  é reconhecido agente oxidante de grupos sulfidril ( $-\text{SH}$ ), e a inibição provocada por este íon pode sugerir a presença de cisteína livres próximo ao sítio ativo (Thys e Brandelli, 2006). Contudo,  $\text{Hg}^{2+}$  também poderia reagir com resíduos de triptofano e/ou agrupamentos carboxil em aminoácidos da enzima (Lusterio et al., 1992).



**Tabela 6:** Efeito de sais na atividade queratinolítica

Sal	Concentração	Atividade Relativa (%)
Controle	-	100,0
CaCl <sub>2</sub>	1 mM	132,7
	5 mM	133,7
CoCl <sub>2</sub>	1 mM	66,8
	5 mM	44,7
CuSO <sub>4</sub>	1 mM	73,3
	5 mM	22,7
HgCl <sub>2</sub>	1 mM	47,7
	5 mM	0
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	113,2
	5 mM	113,8
MnSO <sub>4</sub>	1 mM	94,4
	5 mM	102,4
SrCl <sub>2</sub>	1 mM	121,3
	5 mM	129,9
ZnSO <sub>4</sub>	1 mM	79,9
	5 mM	18,9

#### 4.9 Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica

Os inibidores de proteases possuem uma significativa função na regulação da proteólise, sendo as proteases de origem endógena ou exógena. Eles permitem a regulação da taxa de proteólise na presença da enzima ativa (Cherqui et al., 2001).

Os agentes inibidores de proteases são componentes que reduzem a medida da taxa de hidrólise de um dado substrato. Estes inibidores subdividem-se em duas classes: os de ligação irreversível, quando os inibidores se ligam irreversivelmente a enzima, modificando sua estrutura química e seu sítio de ação, e os de ligação reversível (Beynon, 1996). Esta última pode ser do tipo competitiva, sendo revertida com o aumento da concentração de substrato ou do tipo não competitiva, que não pode ser reduzida com o aumento do substrato, podendo ser diminuída através da redução da concentração de substrato utilizada (Wiseman, 1991).

As queratinases são relatadas como sendo, principalmente, serina ou metaloproteases (Brandelli, 2008). Neste estudo, a atividade enzimática foi fortemente inibida por EDTA, um inibidor de metaloprotease, e PMSF, um inibidor de serina protease. Apesar disso, 1,10-fenantrolina afetou ligeiramente a atividade da enzima (tabela 7). Uma protease alcalina de *Vibrio fluvialis* linhagem VM10 foi inibida em 40% por 1,10-fenantrolina, 63-65% por PMSF e em 84% por EDTA (Venugopal & Saramma, 2006). Devido ao baixo efeito inibidor da fenantrolina, o qual é mais efetivo inibidor de metaloprotease que o EDTA e o efeito inibidor do PMSF, aqueles autores sugerem que a protease alcalina tenha um caráter serina protease (Venugopal & Saramma, 2006). Kim

et al., (2005) relata que uma endopeptidase de *Bacillus cereus* JH108 foi inibida por fenantrolina, EDTA e PMSF, indicando que a enzima apresentava um resíduo serina no seu sítio ativo, e por isso precisava de íons metálicos divalentes para sua atividade e/ou estabilidade. EDTA (5 mM) também foi relatado como inibidor de 70% de uma serina protease alcalina de *Bacillus licheniformis* NH1, demonstrando a importância do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na estabilização da enzima (El Hadjali et al., 2007). Queratinase de *Streptomyces* S7 foi inibida por EDTA (75%) e PMSF (66%) e estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ , indicando ser uma serina-metaloprotease (Tatineni et al., 2008). Assim, sugere-se que a queratinase parcialmente purificada de *Bacillus* sp. P7 possa apresentar um caráter serina-metaloprotease, dependendo dos íons metálicos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  para sua atividade ótima.

**Tabela 7:** Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica

<b>Inibidor</b>	<b>Concentração</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
Controle	-	100,0
EDTA	1 mM	18,7
	5 mM	18,7
1,10- fenantrolina	1 mM	81,2
	5 mM	79,5
PMSF	1 mM	28,4
	5 mM	17,8

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- A bactéria *Bacillus* sp. P7 produz uma queratinase extracelular utilizando farinha de pena como substrato em cultivo submerso;
- O processo de purificação parcial da queratinase, envolvendo a precipitação de proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio seguida das etapas de cromatografia líquida de gel-filtração e de troca-iônica, resultou na recuperação de 27% da atividade observada no extrato bruto, sendo alcançado um fator de purificação de 29,8 vezes;
- A enzima parcialmente purificada apresentou atividade ótima em pH 9,0 e temperatura de 55 °C
- Os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$  estimularam a atividade da enzima parcialmente purificada, enquanto que os íons  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  reduziram sua atividade;
- Os solventes e  $\beta$ -mercaptoetanol mostraram menor efeito na atividade da enzima;
- Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a utilização desta enzima na bioconversão de farinha de pena e na produção de hidrolisados protéicos.

## REFERÊNCIAS

ANBU, P. et al. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, Oxford, v.98, p.1298-1303, 2007.

BALAJI, S. et al. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v.24, p. 2741–2745, 2008.

BALASUBRAMANIAN, S.; PUGALENTHI, V. A comparative study of the determination of sulphide in tannery waste water by ion selective electrode (ISE) and iodometry. **Water Research**, Oxford, v. 34, p. 4201-4206, 2000.

BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 244, p. 1-15, 1994.

BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 248, p. 183, 1995.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, p. 95-102, 2001.

BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rósea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.38, p. 49-4, 2006.

BEYNON, R.J. **Proteolitic Enzymes: A Practical Approach**. New York, p. 257, 1996.

BHASKAR, N. et al. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, p. 2758–2764, 2007.

BOCCHINI, D. A. et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, 1 ed. Interciência, 2008., p.290-300.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 1, p. 105-116, 2008

BRESSOLLIER, P. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2570-2576, 1999.

BRUSH, A.H. On the origin of feathers. **Journal of Evolutionary Biology**, Oxon, v. 9, p. 131-142, 1996.

BUSSON, B.; ENGSTRÖN, P.; DOUCET, J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. **Journal of Synchrotron Radiation**, Copenhagen, v. 6, p. 1021-1030, 1999.

CASSANO, A. et al. Enzymatic membrane reactor eco-friendly goat skin unhairing. **Journal of the Society Technologists and Chemists**, v. 84(5), p. 205-211, 2000.

CHANTAWANNAKUL, P. et al. Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **ScienceAsia**, Thailand, v. 28, p. 241-245, 2002.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.60(4), p. 381-395, 2002.

CHERQUI, A.; CRUZ, N.; SIMÕES, N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimma unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p. 761-769, 2001.

CHITTE, R.R.; NALAWADE, V.K.; DEY, S. Keratinolytic activity from the broth of a feather degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxon, v. 28, p. 131-136, 1999.

CHOI, J.M.; NELSON, P.V. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources. 2. Using poultry feathers. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.121, p.634–638, 1996.

COCHEO, V. Impatto ambientale delle lavorazioni conciarie. **La Medicina Del Lavoro**, v. 81(3), p, 230-41, 1990.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. **Biotecnologia:Manual de Microbiologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, p. 413, 1993.

DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, p. 242-244, 1997.

DAROIT, D.J. et al. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Monascus purpureus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 18, p. 933-941, 2008.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, p. 358-363, 2009.

DEMAJORIVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. **Revista de Adm. De Empresas**, São Paulo, v.35 (3), p. 88-93, 1995.

DE TONI, C.H. et al. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xantomonas maltophila* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.48(4), p. 342-348, 2002.

DEYDIER, E. et al. Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material?”. **Journal Hazard Materials**, v.121, p.141-148, 2005.



EL HADJ-ALI, N. et al. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40 p.515-523, 2007.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, Characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus orizae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 85-93, 2004.

FERRER, J. et al. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 76, p. 39-44, 2001.

FONSECA, I.O. **Purificação e caracterização de uma queratinase secretada por cultura de *Bacillus* sp.** 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermatogales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3705-3710, 1996.

FRIEDRICH, J. et al. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.28(2), p. 127-30, 1999.

GIONGO, L.J. et al. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal Microbiol Biotechnol**, Dordrecht, v.23 p. 375-382, 2007.

GODFREY, T.X. Peptidase in wastes treatment. In: GODFREY, T; WEST, S. (Org.). **Industrial Enzymology**. London: Macmillan Press, 2003, p. 315-316.

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; PANG, C.H.N. The genus *Bacillus*. **United States Department of Agriculture**. Washington, 1973.

GRAZZIOTIN, A. et al. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.126 p.135-144, 2006.

GUEGUEN, Y. et al. Purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Botrytis cinerea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, p. 900-906, 1995a.

GUEGUEN, Y. et al. Purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, p. 469-476, 1997b.

GUPTA, R.; BEG, Q.K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiol Biotechnol**, Berlin, v.59 p. 15-32, 2002.

GUPTA, R. & RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.70, p. 21-33, 2006.

HARUTA, S. et al. Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.99, p.1 – 11, 2005.

HECK, J.X. et al. Optimization of cellulose-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL 69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 107-112, 2005.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 6, p. 103-112, 1985.

HOOD, C.M.; HEALY, M.G. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 179-188, 1994.

ICHIDA, J. M. et al. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiology Methods**, Shannon, v.47, p. 199-208, 2001.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELLO, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technonoly**, Amsterdam, v.27, p. 270-278, 2000.

JOHNVESLY, B. & NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 139-144, 2001.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

KATOH, K.; TANABE, T.; YAMAUCHI, K. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. **Biomaterials**, Oxford, v. 25, p. 4255-4262, 2004.

KIM, J.M.; LIM, W.J.; SUH, H.J. Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**, Oxon, v.37, p. 287-291, 2001.

KIM, J.I.; LEE, S.M.; JUNG, H.J. Characterization of calcium-activated bifunctional peptidase of the psychrotrophic *Bacillus cereus*. **The Journal of Microbiology**, Korea, v.43, p.237-243, 2005.

KOBAYASHI, T. et al. Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K-16. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin , v.43, p. 473-81, 1995.

KOBAYASHI, T. et al. Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin , v.45, p.63-71, 1996.

KOSHIKAWA, N. et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes and neurons in human and mouse. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v.153, p.937–944, 1998.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, p. 561-594, 1999.

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**, Oxford, v.104, p.411-419, 2008.

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

LATSHAW, J.D.; MUSHARAF, N.; RETRUM, R. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. **Animal feed science and technology**, Amsterdam, v.47, p.179–188, 1994.

- LETOURNEAU, F. et al. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.26, p.77-80, 1998.
- LIN, X. et al. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 10, p. 3271-3275, 1992.
- LONGSHAW, C.M. et al. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v. 93, p. 810-816, 2002.
- 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.
- LUCAS, P.S. et al. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, New York, v.45, p. 282-290, 2003.
- LUSTERIO, D.D. et al. Alkali resistant, alkaline endo-1,4- $\beta$ -glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, p. 1671-1672, 1992.
- MACEDO, A.J. et al. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 1, p. 594-596, 2005.
- MALVIYA, H.K.; RAJAK, R.C.; HASIJA, S.K. Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory. **Mycopathologia**, Jabalpur, India, 120, 1-4, 1992.
- MARTELLI, S.M. et al. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 292-301, 2006.
- MIGNON, B. et al. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Medical Mycology**, v.36, p.395-404, 1998.
- MITSUIKI, S. et al. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1. **Enzyme Microbiology Technology**, Amsterdam, v.34, p.482-489, 2004.

MUKHOPADHYAY, R.P.; CHANDRA, A.L. Keratinase of Streptomycete. **Indian Journal of Experimental Biology**, Calcutta, v. 28, p. 575-577, 1990.

MULLER-HELLWIG, S. et al. "Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrPsc in hamster brain homogenates by foodborne bacteria." **Systematic and Applied Microbiology**, Allemagne, v.29 (2), p. 165-71, 2006.

NAKANO, H. et al. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 85, p. 162-168, 1998.

NAM, G.W. et al. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1 a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, New York, v. 178, p. 538-547, 2002.

NEHETE, P.N.; SHAH, V.D.; KOTHARI, R.M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 7, p. 413-418, 1985.

OGINO, H.; OTSUBO, T.; ISHIKAWA, H. Screening, purification, and characterization of a leather-degrading protease. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p. 234-240, 2008.

OH, K.B. et al. Isolation and properties of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, p. 281-287, 1999.

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. **Biore-source Technology**, Oxford, v. 66, p. 1-11, 1998.

PAIK, H.D. et al. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp tochigiensis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p. 294-298, 1997.

PAINBENI, E. et al. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa*  $\beta$ -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 3087-3091, 1992.

POPOVICI, S. T.; SCHOENMAKERS, P. J. Fast size-exclusion chromatography – Theoretical and practical considerations. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1099, p. 92-102, 2005.

PISSUWAN, D. and W. SUNTORNSUK . Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v.35 (2), p. 171-178, 2001.

QIN, L.M.; DEKIO, S.; JIDOI, J. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. **The Journal of Dermatology**, Tokio, v. 277, p. 236-244, 1992.

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

RAO, M.B. et al., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.29(5), p. 255-8, 2002.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, New York , v.179, p.258–265, 2003.

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.

ROTH, S.H.; SKARAJNY, B.; REIFFESTEIN, R.J. Alteration of the morphology and neurochemistry of the mammalian nervous system hydrogen sulphide. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Austrália, v.22, p. 379-380, 1995.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 87, p. 17-24, 2000.

SAREEN, R.; MISHRA, P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.79, p.399–405, 2008.

SATOSHI, U.; NORIAKI, I. Partial purification and characterization of pro-phospholipase A2 activating proteases from gill membranes of red sea bream, *crysophrys major*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 141. p. 121-127, 2004.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 12, p. 401-413, 2001.

SCHROOYEN, P.M.M. et al. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 4.326, 2000.

SCHROOYEN, P.M.M. et al. Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 240, p. 30-39, 2001.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, P.O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.50, p. 1-17, 2004.

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

SCRIBAN, R. **Biotechnologia**. São Paulo: Manole, p. 489, 1985.

SEKI, T.; OSHIMA, I. Taxonomic position of *B. subtilis*. In: Maruo B., Yoshikawa H. (eds) *Bacillus subtilis: molecular biology and industrial applications*. **Elsevier**, Amsterdam, p. 7-21, 1989.

SENA, R.F. & NUNES, M.L. Utilization of agro-industrial wastes in the processing of feeds for carciniculture. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n2, p. 94-102, 2006.

SHIH JCH. Recent development in poultry waste and feather utilization — a review. **Poultry Science**, v.72, p. 1617– 1620, 1993.

SNEATH et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 8 ed. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins, 2 v., 1984.

SON, H.J. et al. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.30, p.461-465, 2008.

SUH, H.J. and LEE, H.K. Characterization of a Keratinolytic Serine Protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal of Protein Chemistry**, United States, Vol. 20, No. 2, 2001.

SUNTORNSUK, W; SUNTORNSUK, L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 86, p. 239 – 243, 2003.

SUZUKI, Y. et al. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam , v.102, p.73–81, 2006.

SZABÓ, I. et al. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 16, p. 253-255, 2000.

TAN, Y. H.; WAHAB, M. N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 13, p. 613-617, 1997.

TANABE, T.; OKITSU, N.; YAMAUCHI, K. Fabrication and characterization of chemically crosslinked keratin films. **Materials Science & Engineering**, Amsterdam, v. 24, p. 441-446, 2004.

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

THYS, R. et al. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.



THYS, R.C.; BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, p. 1259- 1268, 2006.

TREVAN, M.D. ET al. **Biotechnologia: Princípios biológicos**, Espanha, Zaragoza: Acribia, 1990, 284p.

VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A.V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, Oxford, v.41, p.1239-1243, 2006.

WANG, S.L. et al. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. **Bioresource Technology**, England, v. 99, p. 5679-5686, 2007.

WEI, D.L. et al. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 297-301, 1996.

WILLIAMS, C.M. et al. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading *Bacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 1509-1515, 1990.

WILLIAMS, C. et al. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poultry Science**, v.70, p.85–94, 1991.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**, Espanha, Zaragoza: Acribia, 1991, p. 444.

YAMAMURA, S. et al. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 294, p. 1138-1143, 2002.

YAMAUCHI, K. et al. Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v. 31, p. 439-444, 1996.

YANG, X. et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, Oxford, v.78, p. 277-280, 2001.

YU, C. M.; MUN, S.; WANG, N. H. L. Theoretical analysis of the effects of reversible dimerization in size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1132, p. 99-108, 2006.

ZAGHLOUL, T.I.; AL-BAHRA, M.; AL-AZMEH, H. Isolation, identification and keratinolytic activity of a several feather-degrading bacterial isolates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 72, p. 207-213, 1998.

ZERDANI, I.; FAID, M. AND MALKI, A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. in Morocco. **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 3, p. 67-70, 2004.

**APÊNDICE****ÁGAR LEITE (AL)**

Componentes	g L-1
Peptona de carne	5
Extrato de levedura	3
Agar	12
Leite desnatado	100
Água destilada	1000

Obs: Autoclavar por 15 min/121 °C

Ajustar a pH desejado

**BHI**

Componentes	Quantidades
BHI	37 g
Água destilada	900 mL

Obs: Autoclavar por 15 min/121 °C

**CALDO FARINHA DE PENA (CFP) E CALDO PENA (CP)**

Componentes	g L-1
NaCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Farinha de pena e Penas	10,0
Água destilada	1000

Obs: Autoclavar por 15 min/121 °C

Ajustar a pH desejado

**CALDO CABELO (CC)**

Componentes	g L-1
NaCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Cabelo	10,0
Água destilada	1000

Obs: Autoclavar por 15 min/121 °C

Ajustar a pH desejado

**ÁGAR FARINHA DE PENA (AFP)**

Componentes	g L-1
NaCl	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
Farinha de pena	10,0
Ágar	15,0
Água destilada	1000

Obs: Autoclavar por 15 min/121 °C

Ajustar a pH desejado

**COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO GEL DE COMPACTAÇÃO 4%**

Componentes	Quantidades
0.5M tris HCl pH 6.8	1,25mL
Acrilamida(30%)/bis(2,7%)	660µL
SDS 10%	50µL
Água destilada	3.05mL
TEMED	5µL
APS 10%	25µL

**COMPOSIÇÃO DOS COMPONENTES DO GEL DE RESOLUÇÃO 12%**

Componentes	Quantidades
1,5M tris HCl pH 8.8	2,5mL
Acrilamida(30%)/bis(2,7%)	4,0mL
SDS 10%	100µL
Água destilada	3.35mL
TEMED	5µL
APS 10%	50µL



## VITA

- **Nome:** Ana Paula Folmer Corrêa
- **Data e local de nascimento:** 02/01/1973, Santa Maria/RS
- **Filiação:** Wilson Telles Corrêa e Maria Sueli Folmer Corrêa
  
- **Formação**
- **Ensino Fundamental:** Colégio Centenário, Santa Maria/RS
- **Ensino Médio:** Colégio Estadual Manuel Ribas, Santa Maria/RS
- **Ensino superior:**
  - **Graduação:** Química Industrial (Universidade Federal de Santa Maria)
  - **Pós-graduação:** Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
  
- **PRODUÇÃO CIENTÍFICA:**
- 1) **Resumos de trabalhos publicados em anais de eventos:**
  - a) **Título:** Produção de pectinases por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.  
**Autores:** Santi, L.; Silva, W.O.B.; Corrêa, A.P.F.; Vainstein, M.H.  
**Evento:** VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS
  
  - b) **Título:** Atividade Lipolítica de *Metarhizium anisopliae* Durante o Processo de Infecção do Carrapato Bovino *Boophilus microplus*.  
**Autores:** Silva, W.O.B.; Mitidieri, S.; Corrêa, A.P.F.; Schrank, A., Vainstein, M.H.  
**Evento:** VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS
  
  - c) **Título:** Comparação do Perfil Protéico e Tolerância Ácida de Três Sorovares de Salmonella Adaptados e Não-Adaptados ao Ácido.  
**Autores:** Malheiros, P.S.; Perez, K.J.; Corrêa, A.P.F.; Brandelli, A.; Tondo, E.C.  
**Evento:** 44<sup>o</sup> Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – PUC-RS.
  
- 2) **Artigos aceitos para publicação em periódicos:**
  - a) **Título:** Keratinolytic potential of a novel Bacillus sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*.  
**Autores:** Daroit, D. J. ; Corrêa, A. P. F.; Brandelli, A.  
**Periódico:** International Biodeterioration and Biodegradation