

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS CULTIVÁVEIS
PRODUTORES DE PROTEASES PROVENIENTES DA ANTÁRTIDA E
CARACTERIZAÇÃO DA BACTÉRIA QUERATINOLÍTICA *Lysobacter concretionis***

Bióloga Jamile Queiroz Pereira

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Porto Alegre, RS, Brasil

Março, 2012

"There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved."

Charles Darwin, *The Origin of Species*.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sadi e Ziláh, e aos meus irmãos que me motivaram desde cedo pela busca de conhecimento e que sempre foram os melhores exemplos de força de vontade e de índole;

Ao Alexandre, pelo carinho, apoio nos meus momentos de cansaço e irritação, pelas discussões sobre microbiologia e biologia molecular, mesmo não sendo a sua área de formação, pela ajuda com os gráficos e fórmulas e pela parceria com o pessoal do laboratório 218;

À amiga e colega Fê Lopes, por ter sido minha madrinha nesse maravilhoso mundo dos micro-organismos e que esteve, e espero que continue, ao meu lado me ensinando, criticando e apoiando o meu e o nosso trabalho;

À minha eterna IC Michele, que teve muita paciência com o meu TOC por organização e que, além do enorme auxílio no trabalho, se mostrou uma enorme amiga;

Aos amigos e colegas Carlos e Kendi pelas várias conversas sobre os mais diversos temas, às vezes acaloradas, quase chegando à discussão, mas sempre muito produtivas, e também às cervejas que tomamos juntos;

À Stela, ótima companhia para conversar e sempre ajudando a coordenar o laboratório, permitindo que tivéssemos condições de trabalhar;

Aos demais colegas, Daniel, Karla, Renata, Taís, Voltaire pela ajuda com artigos, explicando experimentos e ajudando a clarear os meus caminhos!

À Evelise, pela gentileza da doação de uma cópia da sua dissertação de mestrado, que me deu o rumo para começar os experimentos;

Ao Antônio, revisor do trabalho, que me ajudou com vários esclarecimentos sobre o processo de purificação de proteínas;

Ao professor Adriano Brandelli pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho;

À CAPES pela bolsa de estudos que permitiu a realização do meu mestrado;

Ao PROANTAR pelas amostras das quais foi realizado o isolamento das bactérias utilizadas neste trabalho.

ÍNDICE

	Página
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Micro-organismos Antárticos	13
2.2. Potencial biotecnológico dos micro-organismos antárticos	14
2.3. Enzimas adaptadas ao frio	15
2.4. Enzimas proteolíticas	16
2.5. Proteases bacterianas	19
2.6. Queratinases	19
2.7. Emprego das queratinases	20
2.8. Avaliação da atividade proteolítica e queratinolítica	21
2.9. Identificação molecular de micro-organismos	22
2.10. Purificação das proteases queratinolíticas	23
3 OBJETIVOS	
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1. Coleta dos micro-organismos	27
4.2. Seleção dos micro-organismos	28
4.3. Determinação da capacidade proteolítica	28
4.4. Identificação molecular dos isolados	29
4.4.1. Extração do DNA	29
4.4.2. Amplificação dos fragmentos alvos	30
4.4.3. Sequenciamento	30
4.4.4. Análise das sequências	31
4.5. Substrato para a produção de proteases	31
4.6. Curva de crescimento	32
4.6.1. Preparo do pré-inóculo	32
4.6.2. Preparo dos inóculos	32
4.6.3. Amostragem	33

4.6.4. Quantificação de proteínas solúveis	33
4.6.5. Determinação do número de células viáveis	33
4.7. Quantificação da atividade proteolítica	33
4.8. Determinação da atividade queratinolítica	34
4.8.1. Produção de azoqueratina	34
4.8.2. Ensaio para atividade queratinolítica	35
4.9. Caracterização do extrato bruto enzimático	35
4.9.1. Produção das enzimas	35
4.9.2. Determinação da temperatura ótima	36
4.9.3. Determinação do pH ótimo	36
4.9.4. Efeito de inibidores de proteases	36
4.9.5. Efeito de diferentes sais sobre a atividade enzimática	37
4.9.6. Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática	37
4.9.7. Efeito de NaCl sobre a produção enzimática	38
4.9.8. Zimogramas	38
4.10. Purificação parcial enzimática de <i>Lysobacter concretionis</i> A03	39
4.10.1. Precipitação com sulfato de amônio	39
4.10.2. Cromatografia líquida de filtração em gel	40
4.10.3. Purificação por extração em sistema aquoso bifásico	40
4.10.4. Purificação através da partição em três fases (TPP)	41
4.11. Eletroforese desnaturante em gel de poli(acrilamida)	41
4.12. Caracterização das proteases de <i>Lysobacter concretionis</i> A03	42
4.12.1. Determinação do pH e temperatura ótimos	42
4.12.2. Estabilidade térmica	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Identificação inicial dos micro-organismos	44
5.2. Identificação molecular	46
5.3. Cultivo em CFP	47
5.4. Crescimento em diferentes condições e meios de cultivo	50
5.5. Perfil de crescimento e produção de enzimas proteolíticas	52
5.6. Caracterização do extrato bruto	57
5.6.1. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	57

5.6.2.	Efeito do pH sobre a atividade enzimática	59
5.3.3.	Efeito de NaCl sobre a produção enzimática	61
5.6.4.	Efeito de diferentes sais sobre a atividade enzimática	64
5.6.5.	Efeito de Detergentes sobre a Atividade Enzimática	64
5.6.6.	Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade enzimática	66
5.7.	Zimogramas	68
5.8.	Inferência filogenética	71
5.9.	Purificação parcial das enzimas de <i>Lysobacter concretionis</i> A03	73
5.9.1.	Cromatografia por filtração em gel	75
5.9.2.	Extração através de Sistema aquoso Bifásico (SAB)	78
5.9.3.	Extração através de Partição em Três Fases	80
5.10.	SDS-PAGE	82
5.11.	Determinação das condições ótimas de queratinólise	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8	<i>CURRICULUM VITAE</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP: Ágar Farinha de pena

AL: Ágar Leite

ATCC: American Type Culture Collection

BHA: Brain Heart Agar (Ágar Infusão de Cérebro e Coração)

BHI: Brain heart Infusion (Caldo Infusão de Cérebro e Coração)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CC: Caldo Cabelo

CFP: Caldo Farinha de Penas

CP: Caldo Pena

CU: Caldo Unha

Da: Daltons

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

mM: mili Molar

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEG: Polietilenoglicol

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

rDNA: ribosomal DNA (DNA ribossômico)

SAB: Sistema Aquoso Bifásico

SDS – PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante utilizando SDS (Dodecil Sulfato de Sódio))

TSA: Tryptic Soy agar (Ágar Triptona de Soja)

TSB: Tryptic Soy Broth (Caldo Triptona de Soja)

TPP: Three-Phasic Partitioning (Partição em Três Fases)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

Na Península Antártica, uma grande concentração de aves nidifica anualmente; ainda assim, não é observado o acúmulo de penas no ambiente, sugerindo a ação da microbiota local. As queratinases são o grupo de enzimas capazes de degradar a queratina, identificadas majoritariamente em microorganismos meso e termofílicos. O objetivo deste trabalho foi a identificação de bactérias queratinolíticas psicrófilas ou psicrotolerantes, como uma nova alternativa para o uso de queratinases em processos industriais. Amostras de penas foram coletadas em pinguineiras na ilha Rei George, Antártida, o material semeado em meio ágar farinha de penas (AFP, 10 g L⁻¹) e incubado entre 4 e 30 °C. Seis isolados bacterianos capazes de crescer em AFP foram selecionados e inoculados em meio ágar leite, sendo que três deles formaram halos de proteólise entre 9 e 30 °C, preferencialmente em pH 9,0. Seu DNA foi extraído e o gene do rRNA 16S amplificado e sequenciado. Os isolados proteolíticos foram identificados como *Lysobacter concretionis* (A03), *Arthrobacter* sp. (A08) e *Chryseobacterium* sp. (A17U). O sobrenadante de cultivo das três bactérias foi caracterizado ao longo de 7 dias de incubação em meio caldo farinha de penas (CFP, 10 g L⁻¹), entre 20 °C e 40 °C sendo que todas apresentaram crescimento e produção enzimática ótimos a 20 °C, entre o 3° e o 4° dia. De acordo com os zimogramas, a linhagem A08 foi produtora de uma única protease, A17U de três e A03 de nove enzimas. Esta última se destacou por ser capaz de degradar o substrato farinha de penas quase completamente em 7 dias de cultivo e por tolerar concentrações relativamente altas de NaCl sendo, por isso, selecionada para a análise filogenética, na qual isolado foi identificado como *Lysobacter concretionis*, com um valor de *bootstrap* de 100%, e para a purificação por cromatografia de filtração em gel, Sistema Aquoso Bifásico (SAB) e Partição em Três Fases (TPP). O melhor resultado foi obtido na TPP, com a recuperação de 82% da atividade enzimática e um fator de purificação de 3,59 vezes, sendo possível a detecção de cinco bandas, de aproximadamente 70, 65, 50, 40 e 30 kDa no gel SDS-PAGE. Este é o primeiro trabalho que reporta uma grande capacidade queratinolítica pela linhagem psicrotolerante *Lysobacter concretionis* A03, sendo o seu emprego biotecnológico e industrial compatível com a redução de gastos energéticos para a degradação de resíduos queratinosos.

ABSTRACT

In the Antarctic Peninsula, high concentrations of birds nest every year; nevertheless, their feathers do not accumulate in the environment, suggesting the action of the local microbiota. Keratinases are the enzymes able to degrade keratin, identified mainly in thermophilic and mesophilic micro-organisms. The aim of this work was the identification of psychrophilic or psychrotolerant feather degrading bacteria, in order to reduce the energy consumption for the industrial application of keratinases. Penguin feathers samples were collected in King George Island, Antarctic, the material was spread in feather meal agar plates (FMA 1%) and incubated at 4 – 30 °C. Six isolates capable of growing on FMA were selected and incubated in skimmed milk agar; of these, three formed clear zones indicative of proteolytic activity, between 9 and 30°C, preferable at pH 9.0. Total DNA of isolates was extracted and the rRNA 16S gene was amplified and sequenced. Proteolytic isolates were identified as *Lysobacter concretionis* (A03), *Arthrobacter* sp. (A08) and *Chryseobacterium* sp. (A17U). The crude extract of the three bacteria was characterized along 7 days of cultivation at 20 to 40°C on feather meal broth (FMB, 1%). All bacterial strains showed medium alkalinization, optimum growing and enzymatic production at 20 °C, between third and fourth days, in despite of its optimal enzymatic activity on azocasein and azokeratin have been determined between 35 and 40°C. According to zymography, strain A08 produced only one protease, A17U three and A03 nine proteolytic enzymes, this later standing out due to their high feather meal degradation in 7 days of cultivation and by their tolerance to high salt concentrations, being, therefore, selected for Phylogenetic analysis, purification methods of gel filtration chromatography, aqueous two-phase partition (ATP) and three-phase partition (TPP). The isolate was identified by phylogeny as *Lysobacter concretionis*, with a bootstrap value of 100%. The best results in purification were achieved by TPP, despite has not been possible the isolation of a single protein, with recovery of 82% of enzymatic activity and a purification factor of 3.59. The SDS-PAGE showed the presence of five bands of approximately 70, 65, 50, 40 and 30 kDa. This is the first report of great keratinolytic ability by the psychrotolerant strain of *Lysobacter concretionis* A03, thus, its industrial use its compatible with the reduction of energetic costs for the degradation of keratin wastes by enzymatic digestion.

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de haver um continente situado na porção mais meridional da Terra, aguçou a imaginação dos seres humanos durante anos, até a confirmação da existência, no século XIX, de um maciço de terras com 14 milhões de quilômetros quadrados, denominado Antártida, ou Antártica, devido à sua localização, oposta à região Ártica.

Após a assinatura, em 1959, do tratado da Antártida, pelo qual os países que reclamavam territórios no continente suspenderam suas reivindicações em prol da exploração científica, bases de diversos países, incluindo o Brasil, foram estabelecidas naquela região onde têm realizado inúmeras pesquisas que visam compreender desde a dinâmica do clima da região e do planeta até a biodiversidade nesse ambiente extremamente inóspito e peculiar.

Considerando a sua singularidade, a Antártida oferece uma combinação de condições extremas, como as temperaturas mais baixas do planeta, escassez de nutrientes e de água no estado líquido, grandes períodos de escuridão e alta incidência de radiação ultravioleta. Tais fatores contribuem para que nesta região existam micro-organismos, referidos como extremófilos, com adaptações únicas, que os tornam extremamente relevantes na busca por substâncias de interesse nas áreas farmacêutica, de alimentos, industrial e biotecnológica.

A importância da bioprospecção de compostos úteis produzidos por organismos antárticos tem levado a criação de diversas organizações e projetos internacionais, como o Micromat, fundado pela Comissão Européia em parceria com universidades daquele continente e empresas interessadas na busca por substâncias microbianas com propriedades como capacidade anti-congelamento, resistentes à dessecação, ativas sob baixas temperaturas, em extremos de pH e em altas concentrações de sal.

Entre os compostos microbianos de relevância biotecnológica produzidos por extremófilos estão as enzimas proteolíticas, utilizadas pelas indústrias têxteis, farmacêuticas, cosméticas, de detergentes e de alimentos. Um tipo de protease de particular importância na indústria de alimentos são as queratinases, responsáveis pela hidrólise de resíduos queratinosos altamente recalcitrantes,

como as penas provenientes da avicultura, que são assim convertidas em fonte de aminoácidos, sendo empregadas na produção de rações animais.

No entanto, a maioria das proteases queratinolíticas descritas até o momento provêm de organismos mesófilos e termófilos, como linhagens de *Streptomyces*, que podem crescer e degradar queratina sob temperaturas acima dos 50°C e que, apesar da sua alta capacidade proteolítica, têm aplicação restrita devido à sua estabilidade limitada e custos elevados de utilização.

Desta forma, proteases produzidas por bactérias psicrófilas e psicrotolerantes, cujos ótimos de crescimento e produção enzimática situam-se abaixo dos 30°C, isoladas de ambientes extremos como a Antártida, oferecem uma alternativa promissora aos métodos e enzimas utilizados atualmente em processos como a degradação de compostos como a queratina em climas amenos ou frios, ou mesmo em determinadas estações do ano, como o inverno, pois possuem um requerimento energético inferior às enzimas termofílicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Micro-organismos Antárticos

Apesar da grande quantidade de água no estado sólido, a Antártida é considerada um deserto polar, apresentando um dos menores índices pluviométricos do planeta. Somente 1 a 3% do continente permanece livre de gelo durante certa parte do ano e sua microbiota está restrita a refúgios onde há água disponível e o calor é armazenado, de forma que as flutuações de temperatura são amenas o suficiente para permitir algum crescimento bacteriano. Tais nichos geralmente são comunidades endolíticas que vivem nos grãos de areia, comunidades do solo em geral, especificamente debaixo de rochas de quartzo; comunidades microbianas que dominam os lagos e rios Antárticos e comunidades microbianas que colonizam outras biotas (COWAN & AH TOW, 2004; MATALONI *et al.*, 2010).

O continente Antártico também carece de solos, sendo a maioria deles de origem ornitogênica, ou seja, derivados da deposição de material fecal de várias espécies de aves, ocorrendo principalmente nas regiões costeiras da Antártida. Estes solos, quando comparados com aqueles de origem mineral, apresentam-se mais ricos em carbono orgânico, nitrogênio, fósforo e biomassa microbiana (BOWMAN *et al.*, 1996).

Os micro-organismos representam o maior reservatório de biodiversidade não descrita do planeta e, dessa forma, possuem o maior potencial para a descoberta de novas substâncias, como fármacos, aditivos alimentares e produtos biotecnológicos. Porém, dados de 2002 revelam que menos de 40 espécies microbianas, entre arqueas e bactérias, foram identificados na Antártida, sendo que a maioria delas derivam de estudos realizados somente nos últimos anos e principalmente em ambientes aquáticos como a água do mar e os lagos salinos do leste do continente. Poucos estudos têm concentrado-se nos ambientes terrestres das áreas livres de gelo (NICHOLS *et al.*, 2002).

Além disso, este número, na verdade, representa uma subestimativa do valor real, pois a maioria dos métodos utilizados é dependente de cultivo, e é

reconhecido que apenas cerca de 1% da comunidade microbiana do ambiente possa ser cultivada. Desta forma, métodos para a detecção direta de micro-organismos, como a amplificação do rRNA 16S de amostras de solo, seguida por DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante) com posterior sequenciamento das bandas encontradas, fornecem uma alternativa mais confiável para a quantificação da diversidade bacteriana. Uma comparação entre o número de gêneros bacterianos encontrados na Antártida revelou que, através dos métodos tradicionais cultivo-dependentes, foi possível a identificação de 96 gêneros distintos. Em contraste, com a utilização de abordagens independentes de cultivo, este número foi de 214 gêneros pertencentes a uma diversidade maior de classes/divisões e com representantes de grupos raros como Nitrospira, Verrucomicrobia e Aquificae (COWAN & AH TOW, 2004).

2.2. Potencial biotecnológico dos micro-organismos antárticos

Dadas as severas condições enfrentadas, os micro-organismos antárticos apresentam importantes adaptações ao frio, a escassez de nutrientes e de água no estado líquido, aos altos índices de radiação ultravioleta e salinidade, entre outros (COWAN & AH TOW, 2004).

Em 1902, o termo psicrófilo foi cunhado para descrever bactérias capazes de sobreviver e crescer a 0 °C, e tem sido utilizado desde então para definir os micro-organismos cuja temperatura ótima de crescimento situa-se abaixo dos 15 °C, apresentando inibição total do crescimento acima de 20 °C (NICHOLS *et al.*, 2002). No entanto, uma definição mais restrita tem sido requerida para separar os organismos que necessitam de baixas temperaturas para crescer, referidos como psicrófilos verdadeiros, dos demais, capazes de crescer por volta de 0 °C mas que possuem temperatura ótima de crescimento entre 20-30 °C, definidos como psicrotróficos ou psicrotolerantes (BOWMAN *et al.*, 1996; HERBERT, 1986).

Apesar das limitações impostas pelo ecossistema antártico, representantes psicrófilos tanto de bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas são encontradas nesse ambiente e apresentam adaptações surpreendentes ao frio.

Por exemplo, quando cultivados em meios de cultivo ricos a 4 °C, algumas bactérias psicrófilas possuem um tempo de duplicação aproximado ao de *Escherichia coli* a 37 °C (FELLER & GERDAY, 2003).

O potencial biotecnológico dos micro-organismos psicrófilos e psicrotróficos vem recebendo maior atenção nas duas últimas décadas (BOWMAN *et al.*, 1997; FELLER & GERDAY, 2003). De acordo com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente - UNEP, a bioprospecção de micro-organismos dos ecossistemas do Ártico e, principalmente, do continente Antártico, vem ganhando força com as descobertas realizadas recentemente. Grandes indústrias farmacêuticas de cosméticos e de alimentos já têm utilizado substâncias produzidas, por exemplo, por bactérias e micro-algas adaptadas ao frio. Tais substâncias vão desde cremes para prevenir o envelhecimento da pele e espessantes para tornar sorvetes mais macios até compostos capazes de extrair DNA de diversos tipos de amostras com extrema rapidez e acurácia (UNEP, 2007, 2009).

Outros exemplos vêm de trabalhos como o de Nichols *et al.* (1995), o qual evidenciou a produção, pela linhagem psicrófila ACAM 342 de *Shewanella putrefaciens*, de ácidos graxos do tipo ômega-3 poliinsaturados (PUFA, da sigla em inglês) de importância nutricional e médica. Deppe *et al.* (2005), descreveram um consórcio de nove bactérias psicrotolerantes, entre elas *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Marinobacter*, *Psychrobacter* e *Agreia*, capaz de degradar combustíveis fósseis e seus componentes em temperaturas de 4-27 °C e pH entre 6-9, constituindo-se em uma alternativa promissora para a biorremediação de regiões marinhas contaminadas por derramamentos de petróleo.

2.3. Enzimas adaptadas ao frio

As enzimas adaptadas ao frio são caracterizadas por uma alta eficiência catalítica sob temperaturas baixas a moderadas, nas quais enzimas de organismos mesofílicos não são ativas. Essa propriedade faz com que sejam altamente promissoras biotecnologicamente, pois aceleram o tempo de processos

realizados a baixas temperaturas, reduzem a concentração enzimática requerida, resultam em alta produtividade nas reações com componentes termossensíveis, previnem transformações químicas indesejáveis e a perda de compostos voláteis e ainda diminuem os gastos energéticos (MARGESIN *et al.*, 2002).

Diversos tipos de enzimas, como proteases, lipases e fosfolipases, têm sido isoladas de bactérias psicrófilas e psicrotróficas, apresentando propriedades que as tornam vantajosas para a sua utilização em processos industriais, como ótimos de temperatura abaixo dos 40 °C e baixa energia de ativação requerida; sendo, por essa razão, mais ativas entre 4 e 7 °C do que as enzimas produzidas por micro-organismos mesófilos (BOWMAN *et al.*, 1997; SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

Uma vez que nas enzimas de micro-organismos adaptados ao frio as estruturas terciárias e quaternárias são arranjadas de forma mais aberta e flexível, devido à menor quantidade de ligações dissulfeto e estruturas secundárias rígidas, o substrato tem acesso facilitado ao sítio ativo. Além disso, a presença de grupos de glicinas ao redor do sítio ativo, assim como um conteúdo maior de hidroxilas nos seus resíduos de serina e treonina, auxiliam na solvatação das proteínas, possibilitando o acesso dos substratos ao sítio ativo sob baixas temperaturas. Tais atributos, resultam ainda em uma maior termolabilidade, o que permite a sua inativação em temperaturas mais baixas, sem o comprometimento das características do produto e a inativação seletiva de compostos em misturas complexas (GERDAY & GLANSDORFF, 2007; FELLER & GERDAY, 2003; FELLER *et al.*, 1997).

Dessa forma, as denominadas *extremozimas* possuem uma vasta gama de aplicações industriais como, por exemplo, agentes de limpeza, no processamento de couros, na degradação de compostos xenobióticos, no processamento de alimentos, na biologia molecular e na medicina (NICHOLS *et al.*, 1995; MARGESIN e SCHINNER, 1999).

2.4. Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas, ou simplesmente proteases, são uma classe de

catalisadores biológicos que atuam na clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas, acelerando virtualmente todas as reações químicas dentro das células (COOPER, 2000). Possuem ampla aplicação nos campos comercial e biotecnológico, sendo que, de todas as enzimas utilizadas industrialmente, 75% são proteases. A aplicação atual de enzimas nas indústrias está associada a diversas vantagens. Elas são os principais contribuintes para produtos e processos "limpos" e, comparadas aos métodos químicos convencionais, são muito mais específicas na sua ação e atuam sob condições moderadas. Além disso, são compatíveis com políticas ambientais que promovem a sustentabilidade, uma vez que são produzidas a partir de fontes renováveis e são totalmente biodegradáveis (RAO *et al.*, 1998).

As proteases são ubiquamente encontradas em uma ampla diversidade de organismos vivos, desde animais a micro-organismos, onde desempenham funções fisiológicas vitais, como na manutenção da homeostase e na participação em processos inflamatórios (RAO *et al.*, 1998).

O uso de vegetais como fonte de proteases está sujeito a fatores como disponibilidade de espaço para o cultivo e adequação ao clima regional, além de ser um processo que despende tempo. As principais enzimas de origem vegetal são a papaína (mamão), a bromelina (abacaxi) e a ficina (figo). Já a produção de proteases de origem animal está sujeita a disponibilidade de animais para o abate, o que depende das políticas governamentais e agrícolas. As proteases animais estão principalmente representadas pela tripsina, quimotripsina, pepsina e quimosina (BOYER, 1971).

De acordo com o grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases estão divididas em cinco grupos: serino-proteases, aspartil-proteases, cisteíno-proteases, treonino-proteases e metaloproteases ((EKICI, PAETZEL & DALBEY, 2008; RAO *et al.*, 1998).

As serino-proteases possuem um resíduo de serina no seu sítio ativo. Elas são amplamente encontradas entre vírus, bactérias e eucariotos, o que sugere um papel vital nos organismos. Várias serino-proteases de micro-organismos são conhecidas atualmente, como a subtilisina, a protease α -lítica de *Myxobacter* e a de *Streptococcus griseus*. As serino-proteases são geralmente ativas sob pH

neutro a alcalino, com um ótimo entre o pH 7,0 e 11. As serino-alcalino-proteases representam o maior subgrupo das serino-proteases (YON-KAHN & HERVÉ, 2010).

As aspartil-proteases são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para a ocorrência da sua atividade catalítica. A maioria dessas enzimas contém dois resíduos aspárticos no seu sítio ativo. Elas são ativas em pH ácido e são especificamente inibidas pela pepstatina A. Estão agrupadas em três famílias, sendo elas a da pepsina, retropepsina e a das enzimas de pararetrovírus. As aspartil-proteases microbianas podem ser divididas em dois grupos: as enzimas do tipo pepsina produzidas pelos fungos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Neurospora* e as enzimas do tipo renina produzidas pelos fungos dos gêneros *Endothia* e *Mucor* (CHEN *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 1998).

As cisteíno-proteases tem ocorrência tanto em procariotos quanto em eucariotos, tendo sido reconhecidas cerca de 20 famílias. Sua atividade depende da união catalítica entre a cisteína e a histidina. Geralmente, as cisteíno-proteases são ativas somente na presença de agentes redutores com o ácido cianídrico ou cisteína e são otimamente ativas em pH neutro, havendo algumas exceções (RAO *et al.*, 1998).

As treonino-proteases, cuja função foi descrita pela primeira vez em 1995, possuem uma treonina N-terminal ancorada ao seu sítio ativo, sendo responsáveis pelo funcionamento dos proteassomas, estruturas protéicas intracelulares presentes tanto em procariotos como eucariotos, onde proteínas desnecessárias ou danificadas são degradadas (EKICI *et al.*, 2008).

As metaloproteases são o tipo mais diverso de proteases, já tendo sido reconhecidas cerca de 30 famílias, entre endo e exopeptidases. Elas são caracterizadas por requererem um íon metálico divalente para a sua atividade e incluem enzimas como as collagenases, primeiramente descobertas na bactéria *Clostridium hystolyticum* e depois encontradas também em organismos superiores, as toxinas hemorrágicas do veneno de serpentes e a termolisina das bactérias (RAO *et al.*, 1998).

2.5. Proteases bacterianas

Devido à inabilidade das enzimas vegetais e animais em suprir a demanda do mercado e ao fato de que as enzimas microbianas possuem praticamente todas as características desejadas para seu emprego biotecnológico, sua utilização tem sido alvo de crescente interesse (GUPTA *et al.*, 2002). Os microorganismos representam uma excelente fonte de enzimas, devido ao seu rápido crescimento, pequeno espaço requerido para cultivo, ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética, o que propicia a criação de novas enzimas com propriedades desejadas com vista a várias aplicações (RAO *et al.*, 1998).

A maioria das proteases comerciais é produzida por bactérias do gênero *Bacillus*. São geralmente de natureza neutra ou alcalina, seu pH de atividade situa-se entre 5,0 e 8,0 e têm uma termotolerância relativamente baixa. São atualmente classificadas com base no tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relações evolutivas (BRANDELLI, 2008).

2.6. Queratinases

A queratina é uma proteína insolúvel constituinte de estruturas animais como penas, cascos, unhas, chifres e pelos que, devido ao elevado número de ligações cruzadas na cadeia peptídica causadas pela formação de pontes dissulfeto, não é passível de degradação pela maioria das enzimas proteolíticas comuns como a tripsina, papaína e pepsina (BRANDELLI *et al.*, 2010; ONIFADE *et al.*, 1998).

Apesar da sua alta resistência e estabilidade, os resíduos queratinosos não se acumulam no ambiente, o que sugere a existência de decompositores ou utilizadores naturais (ONIFADE *et al.*, 1998). Evidências adicionais da existência de organismos queratinolíticos são dadas pela ação de dermatófitos patogênicos, principalmente fungos e bactérias, que parasitam substratos queratinosos em animais vivos, como a pele, cabelos e unhas dos seres humanos. Tais microorganismos, quando cultivados em meios contendo queratina, são capazes de utilizá-la como fonte de carbono e nitrogênio (SHARMA *et al.*, 2011).

As enzimas produzidas por esses micro-organismos, capazes de degradar a queratina, são denominadas queratinases e, desde a sua descoberta, diversos organismos, principalmente fungos e bactérias, foram reportados como queratinolíticos. A produção de tais enzimas é amplamente induzível pela presença de queratina como substrato, são na maioria extracelulares e geralmente pertencem a família das serino-proteases, embora também existam exemplos de metaloproteases queratinolíticas (BRANDELLI *et al.*, 2010).

Entre as bactérias, os principais produtores de queratinases pertencem ao grupo das Gram-positivas do gênero *Bacillus* (PILLAI & ARCHANA, 2008), como *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus* e do gênero *Streptomyces*, como *S. pactum* e *S. albidoflavus*. Contudo, na última década, tem aumentado o número de trabalhos que descrevem bactérias Gram-negativas com capacidade queratinolítica pertencentes, por exemplo, aos gêneros *Vibrio*, *Lysobacter* e *Chryseobacterium* (BRANDELLI *et al.*, 2010).

A maioria das queratinases produzidas por linhagens como *Streptomyces* e *Bacillus* são provenientes do solo e apresentam características mesofílicas ou termofílicas, sendo que, essas últimas são promissoras em processos industriais onde são empregadas temperaturas elevadas (BRANDELLI, 2008). Já estudos visando a bioprospecção de enzimas queratinolíticas adaptadas a temperaturas reduzidas são escassos. Tais catalizadores podem representar uma grande vantagem em relação aos demais, devido à redução dos gastos energéticos relacionados à sua utilização, assim como também podem ser mais adequados para a utilização em regiões de clima temperado a frio.

2.7. Emprego das queratinases

Anualmente, a indústria avícola mundial gera milhões de toneladas em resíduos queratinosos, constituídos principalmente por penas. Essas estruturas são compostas por aproximadamente 90% de queratina e representam 10% do peso em frangos adultos; sendo consideradas altamente recalcitrantes e representando um grave problema ambiental quando não tratadas adequadamente (SHIH, 1993). No entanto, esses resíduos podem ser convertidos

em complementos para a ração animal através de processos de cocção sob pressão e moagem. Porém, esses processos são dispendiosos energeticamente, levam a destruição de certos aminoácidos e produzem outros que não são assimilados pelo sistema digestório animal (WANG & PARSONS, 1997).

Uma valiosa alternativa a esses métodos é a utilização das queratinases microbianas, que tem a capacidade de elevar significativamente o valor nutricional das rações de penas. O trabalho de Williams *et al.* (1991), por exemplo, mostrou que a ração de penas hidrolisada por *Bacillus licheniformis* e suplementada com metionina, lisina e histidina produziu uma curva de crescimento em frangos de corte equiparável àquela obtida quando os animais foram alimentados com rações à base de soja.

Ainda, outra questão remanescente é a utilização das queratinases na sua forma purificada ou através da adição direta dos micro-organismos aos resíduos em processos de fermentação. Os trabalhos têm demonstrado que a purificação dessas enzimas leva à diminuição da sua atividade, talvez devido à perda de algum outro componente produzido pela própria bactéria que pode ser importante no processo de queratinólise. Além disso, a queratina é deficiente em alguns aminoácidos essenciais, como metionina e fenilalanina, que poderiam ser supridos pela própria biomassa bacteriana nos cultivos, o que determina a necessidade de prospecção de bactérias queratinolíticas não patogênicas que ainda poderiam reduzir o uso de suplementos como soja e farinha de peixes nas dietas animais (BRANDELLI *et al.*, 2010).

2.8. Avaliação da atividade proteolítica e queratinolítica

As comparações das atividades queratinolíticas com aquelas encontradas na literatura são dificultadas pela variedade de substratos queratinosos empregados nas investigações (ALLPRESS *et al.*, 2002), destacando-se, a utilização da queratina azure e da azoqueratina (ALLPRESS *et al.*, 2002; BRANDELLI & RIFFEL, 2005; SUNTORNSUK *et al.*, 2005).

No entanto, o emprego de tais substratos leva a uma grande margem de erros nos resultados devido à insolubilidade da queratina e variações no preparo

dos reagentes, de forma que, para minimizar tais erros e obter uma quantificação precisa da atividade enzimática, recorre-se ao uso de substratos proteicos solúveis como a azocaseína, que possibilita a verificação da proteólise de uma forma geral, porém mais precisa.

Assim, a identificação da queratinólise *per se* pode ser realizada de forma mais confiável através do monitoramento visual e por microscopia eletrônica de alta resolução, da degradação de substratos queratinosos como penas, lã, cabelo e unhas, através da quantificação de proteínas solúveis por métodos colorimétricos e por meio da liberação de grupos tiol devido ao processo de sulfitolise da queratina (BÖCKLE & MÜLLER, 1997).

2.9. Identificação molecular de micro-organismos

Para a identificação dos micro-organismos, a amplificação e sequenciamento do gene do rRNA 16S ainda é a alternativa mais rápida e mais utilizada, além de existir uma grande quantidade de bactérias com sequências do rDNA 16S depositadas nos bancos de dados, o que facilita a comparação e construção de filogenias (OCHMAN & WILSON, 1987).

O gene do rRNA 16S codifica para o rRNA principal que se liga à diversas proteínas para formar a subunidade menor (30S) dos ribossomos em procariotos. Sua sequência possui aproximadamente 1500 pares de bases (pb) e contém segmentos conservados que são compartilhados por todas as bactérias e regiões divergentes únicas espécie-específicas, o que permite a sua identificação e a inferência das suas relações de parentesco através das ferramentas da bioinformática (WATSON *et al.*, 2004).

As análises filogenéticas para a recuperação das relações de parentesco entre organismos utilizando sequências de DNA configuram-se num recurso relativamente recente. Através da comparação das sequências de DNA, é possível estimar a ordem histórica da ramificação das espécies e também a quantidade de divergência acumulada entre elas ao longo do curso evolutivo (WOESE & FOX, 1977).

Ochman e Wilson (1987) hipotetizaram que uma diferença de 1% entre

sequências do rRNA 16S é aproximadamente igual a um ramo evolutivo de 50 milhões de anos. Essa divergência foi calibrada tomando-se como pontos de partida episódios marcantes na evolução da biota terrestre, como a divergência entre as linhagens de *Escherichia coli* capazes de utilizar lactose daquelas de *Salmonellae* e o aparecimento dos mamíferos. Essa estimativa é aproximada e está baseada em uma série de suposições, cabendo ressaltar que micro-organismos de ambientes frios, com longos tempos de geração, podem possuir uma taxa de mutações na sequência do seu rRNA mais lenta do que aqueles que crescem em ambientes mais quentes, fato que deve ser considerado quando da sua inferência filogenética.

Vários estudos visando investigar a diversidade e relações filogenéticas da microbiota da Antártida têm concluído que uma substancial proporção das sequências de rRNA obtidas não apresentam alta homologia com as sequências de quaisquer linhagens cultiváveis, sugerindo que os solos daquele continente comportam um grande número de genospecies novas e possivelmente endêmicas (AISLABIE *et al.*, 2006; SHIVAJI *et al.*, 2004).

Por exemplo, Nichols e colaboradores (2002), ao avaliar a biodiversidade de actinobactérias isoladas do solo de Vestfold Hills e Macquarie Island, leste da Antártida, encontraram, através do sequenciamento do rDNA 16S, 22 novas sequências pertencentes a nove gêneros distintos e que provavelmente pertencem a novas espécies de actinobactérias, ressaltando a necessidade de esforços a fim de reconhecer não somente a composição da microbiota da Antártida mas também o seu potencial para o emprego biotecnológico.

2.10. Purificação das proteases queratinolíticas

Em muitos processos industriais em que são utilizadas enzimas microbianas, como, por exemplo, na produção de alimentos ou de detergentes domésticos, são requeridos apenas um grau baixo a moderado de pureza dessas proteínas. Entretanto, várias outras indústrias, como a farmacêutica e a de reagentes analíticos, necessitam de um alto grau de pureza, de forma que processos de purificação que mantenham a atividade enzimática devem ser

realizados (QUEIROZ *et al.*, 2001).

Um dos métodos tradicionais para a purificação de proteínas é através da cromatografia líquida. No entanto, esta é uma técnica dispendiosa em termos financeiros e temporais, além de levar a perdas significativas de produtividade (GUPTA *et al.*, 1999). Assim, outras formas de purificação mais rápidas e baratas vem ganhando destaque a fim de suprir a demanda crescente, como a separação por sistemas aquosos bifásicos (SAB) e a extração por partição em três fases (TPP) (RAHIMPOUR & BAHARV, 2009; TUBIO *et al.*, 2009).

A cromatografia por filtração em gel tem a finalidade de separar as proteínas de acordo com o seu tamanho molecular. As moléculas são particionadas entre uma fase móvel e uma estacionária composta por uma matriz que consiste em pérolas porosas, de tamanho definido, de forma que o tamanho desses poros define o tamanho das macromoléculas que podem ser fracionadas (O'FÁGÁIN *et al.*, 2011).

Dessa forma, as proteínas muito grandes para entrar nos poros são "excluídas", sendo eluídas da coluna primeiro. As moléculas um pouco menores conseguem entrar em alguns poros, mas não em todos, e são retidas por um tempo maior. Já as moléculas pequenas são capazes de entrar na maioria dos poros, sendo eluídas por último. As proteínas são eluídas com um tampão aquoso, coletadas como frações cromatográficas individuais e analisadas separadamente (BOLLAG, 1995).

As principais limitações da cromatografia de filtração em gel são a lenta separação das proteínas, pois pode ser necessária a utilização de colunas longas e estreitas, e a resolução dos picos emergentes é limitada devido a possibilidade da amostra não se ligar a resina (BOLLAG, 1995).

O custo final de um produto depende amplamente do gasto envolvido nos processos de extração e purificação. Por exemplo, as técnicas convencionais para a purificação de proteínas, por meio de precipitação e cromatografia em colunas, não são somente custosas financeiramente, mas também resultam em uma baixa produtividade.

A separação de biomoléculas através de sistemas aquosos bifásicos, oferece uma alternativa para os dois problemas mencionados, e, desta forma,

vem ganhando espaço nas indústrias biotecnológicas (GUPTA *et al.*, 1999). Um sistema aquoso bifásico líquido-líquido é obtido através da mistura de duas soluções de dois polímeros ou um polímero e um sal. Neste último, os sais utilizados podem ser os fosfatos, sulfatos ou citratos, que possuem baixa massa molecular. Na formação das duas fases, através de centrifugação, observa-se a concentração do polímero na porção superior, enquanto na inferior, concentra-se o sal. Geralmente, a proteína alvo é recuperada na fase superior e os contaminantes e “debris” celulares são isolados na fase inferior. A retirada do PEG da solução protéica resultante pode ser realizada através de ultrafiltração ou cromatografia, no entanto, estes métodos tendem a aumentar o custo da sua utilização (LIU *et al.*, 2011).

De qualquer forma, esse sistema resulta em uma alta seletividade no particionamento de proteínas e, uma vez que os componentes das duas fases são inertes, não há o risco de sua interação com as biomoléculas. Além disso, devido à baixa tensão superficial entre as duas fases, é possível a recuperação das proteínas sem perdas na sua função (GUPTA *et al.*, 1999).

A partição em três fases tem se mostrado um método rápido e eficiente para a purificação de proteínas. Ela é realizada através da concentração do sobrenadante enzimático com sulfato de amônio (cerca de 50%) e mistura desta solução com um volume igual de um álcool alifático (geralmente o t-butanol). Após centrifugação, ocorre a formação de três fases. A porção superior retém o t-butanol, onde concentram-se também os restos lipídicos das células; na interface entre as duas fases ocorre a formação de um agregado semi-sólido com a maioria das proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas, e a porção aquosa inferior concentra a proteína de interesse (WARD, 2009).

A partição em três fases tem sido o método escolhido por pesquisadores como Sharma e Gupta (2001A), onde a fosfolipase de *Dacus carota* (cenoura) obteve um fator de purificação de 13 vezes com recuperação de 72% da sua atividade, e o de Yakhnin *et al.* (1998), onde foi recuperada cerca de 90% da proteína recombinante verde fluorescente (GFPuv) extraída de células de *Escherichia coli*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é o isolamento e identificação de micro-organismos cultiváveis produtores de proteases, provenientes de amostras de penas de pinguim do continente Antártico, através de métodos bioquímicos e filogenia molecular, bem como a caracterização de uma linhagem microbiana produtora de proteases queratinolíticas ativas sob baixas temperaturas, como uma alternativa às enzimas mesofílicas e termofílicas utilizadas atualmente.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias produtoras de proteases de amostras antárticas através do *screening* de atividade em substratos queratinosos;
- Identificar os isolados com base no sequenciamento do rDNA 16S;
- Estabelecer a identidade, no nível específico, da linhagem melhor degradadora de substratos queratinosos através de análises filogenéticas;
- Identificar, a partir do conjunto de micro-organismos iniciais, aqueles produtores de proteases queratinolíticas;
- Identificar as condições ótimas para a produção de enzimas queratinolíticas extracelulares nos micro-organismos selecionados;
- Caracterizar as condições ótimas para a atividade proteolítica e queratinolítica das proteases produzidas pelos micro-organismos selecionados;.
- Avaliar o melhor método de purificação parcial da(s) protease(s) da bactéria selecionada para essa etapa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta dos micro-organismos

As amostras utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo grupo de pesquisadores do laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS-RS), vinculados ao Projeto Antártico Brasileiro (PROANTAR), coordenado pela professora pesquisadora Maria Virgínia Petry no verão do Hemisfério Sul de 2010. Resíduos de penas foram coletados em pinguineiras abandonadas, próximas à estação brasileira Comandante Ferraz, na ilha Rei George, situada a 120 km da península Antártica e a 849 km do extremo sul da América do Sul (Figura 1). As amostras foram armazenadas em tubos Falcon estéreis, identificadas quanto à espécie de pinguim de procedência (*Pygoscelis papua* ou *Pygoscelis antarctica*) e mantidas sob refrigeração.

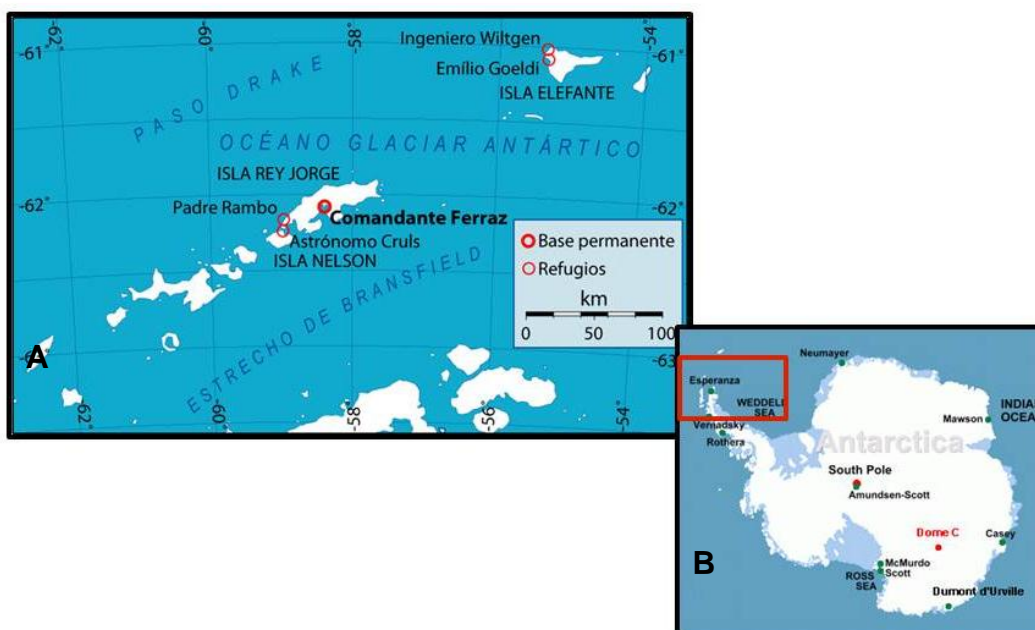


Figura 1. Ilha Rei George, destacando o local da base Almirante Ferraz (A) e localização da ilha (quadrado vermelho) em relação ao continente Antártico (B). Fonte: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA).

4.2. Seleção dos micro-organismos

Em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada, 0,1 g dos resíduos de penas coletados foram misturados a um volume de 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v). A partir desta mistura, foram realizadas diluições seriadas até a concentração 10^{-9} as quais foram semeadas em placas de Petri contendo o meio ágar farinha de pena (AFP 10g L⁻¹, K₂HPO₄ 0,3 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0,4 g L⁻¹, NaCl 0,5 g L⁻¹ e ágar bacteriológico 12g L⁻¹ em água destilada) como única fonte de carbono e nitrogênio.

Após períodos de incubação que variaram de duas a quatro semanas sob as temperaturas de 4 °C, 20 °C ou 30 °C, as colônias individuais formadas em AFP foram selecionadas com base na sua coloração e morfologia distinta em microscopia óptica. Após esse procedimento, foram transferidas para novas placas contendo o meio ágar triptona de soja (TSA) e mantidas a temperatura de 4 °C, sendo retransferidas para novos meios a cada quatro semanas. Como meio definitivo de armazenamento, os micro-organismos foram cultivados em meio caldo triptona de soja (TSB), adicionando-se 20% de glicerol e estocados em nitrogênio líquido.

4.3. Determinação da capacidade proteolítica

Para avaliar a produção de proteases extracelulares, os micro-organismos que apresentaram crescimento em AFP foram testados quanto a sua capacidade de proteólise no meio ágar leite (AL), constituído pelos nutrientes peptona de carne (5,0 g L⁻¹), extrato de levedura (3,0 g L⁻¹) e leite desnatado (100 ml L⁻¹), além de ágar bacteriológico (12 g L⁻¹). O ajuste do pH para 5,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10 ou 11 foi realizado através da adição de NaOH ou HCl 0,1 M L⁻¹ esterilizados, antes da solidificação do meio.

Os isolados foram inoculados com alças puntiformes em placas de Petri contendo o meio AL e incubados nas temperaturas de 9, 24 ou 30 °C. A estimativa da atividade proteolítica dos isolados em AL foi verificada em duplicata no sétimo dia de incubação, através da medição do halo transparente formado em torno do

ponto onde ocorreu a inoculação do microrganismo. O diâmetro do halo, subtraindo-se o diâmetro das colônias, foi medido com o auxílio de um paquímetro, tendo sido utilizado para a estimativa da capacidade proteolítica dos isolados (PILLAI & ARCHANA, 2008).

4.4. Identificação molecular dos isolados

Os isolados que apresentaram crescimento em AFP e/ou proteólise em AL foram identificados através da amplificação e sequenciamento do fragmento do gene ribossomal 16S e posterior construção de árvores filogenéticas para aqueles escolhidos para as etapas de caracterização e purificação das enzimas.

4.4.1. Extração do DNA

Para a extração do DNA total, utilizou-se o método descrito por Casali *et al.* (2003) modificado: uma alçada de cada isolado foi inoculada em meio infusão de cérebro e coração (BHI) e incubada por 24 h em agitador orbital a 125 rpm à temperatura de 30 °C. Após esse período, 1 mL do cultivo foi centrifugado por 10 minutos a 12.900 *g* e o sobrenadante descartado, repetindo-se o procedimento no mesmo microtubo com a adição de mais 1mL de cultivo.

O *pellet* formado foi lavado com 200 µL de água ultrapura e a ele foram adicionados 500 µL do tampão de lise (2% Triton X-100 / 1 mM EDTA/ 200 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl pH 7.5 / 1% SDS) e 200 µL de pérolas de vidro (200 – 300 µm). A mistura foi agitada vigorosamente em vortex durante 2 minutos intercalando com 30 segundos em banho de gelo por quatro vezes. Após, foram adicionados 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio (1:1) e a amostra foi homogeneizada manualmente por dois minutos, sendo então centrifugada por 15 minutos a 12.900 *g*.

O sobrenadante foi coletado em um novo microtubo ao qual foram adicionados 500 µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), repetindo-se o procedimento anterior. Ao sobrenadante coletado, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado e 200 mM de NaCl. A amostra

foi incubada a -20 °C por duas horas e centrifugada por 15 minutos a 12.900 g, descartando-se o sobrenadante e lavando-se o *pellet* formado com 200 µL de etanol 70%. O *pellet* foi seco em estufa ou bloco térmico a 50 °C por meia hora e ressuspenso em 20 µL de água ultrapura.

4.4.2. Amplificação dos fragmentos alvos

Para a reação de PCR do fragmento do gene ribossomal do 16S, utilizou-se os *primers* universais desenhados para *Escherichia coli* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'), senso e antisenso, respectivamente. (LANE, 1991). A amplificação foi realizada em um volume de 25 µL, sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação do DNA a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos, finalizando com a extensão final a 72 °C por 10 minutos.

A purificação do produto de PCR foi realizada através da precipitação com 1,9 µL de acetato de amônio 7,5 M L⁻¹ e 20 µL de isopropanol absoluto, ambos gelados, seguida de centrifugação por 15 minutos a 12.900 g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado com etanol 70% a temperatura ambiente e seco em estufa ou bloco térmico a 50 °C por meia hora, sendo então ressuspenso em 15 µL de água ultrapura. A verificação da amplificação e da purificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4.3. Sequenciamento

As amostras amplificadas foram sequenciadas no laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) no sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e o polímero POP6 (Applied Biosystems). O sequenciamento do fragmento de aproximadamente 1500 pb do rDNA 16S foi realizado utilizando os seguintes conjuntos de *primers*: 27F, 1525R e o senso interno 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'). Os dados do sequenciamento foram

coletados através do *software Data Collection* v1.0.1 (Applied Biosystems).

A fim de evitar artefatos que pudessem levar a erros na edição das sequências, estas foram obtidas de produtos de PCR independentes, sequenciando-se pelo menos três vezes cada fragmento alvo dos isolados.

4.4.4. Análise das sequências

As sequências obtidas foram submetidas ao algoritmo de busca por similaridade BLAST do banco de dados *GenBank* a fim de determinar a sua afiliação genética aproximada. Após, procedeu-se o seu alinhamento no programa CLUSTAL-X (THOMPSON *et al.*, 1997) e edição do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999).

Após a edição, alinhamento e análise prévia das sequências, foi utilizado o programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011) para a elaboração das árvores filogenéticas baseadas no método de *Neighbor-joining* utilizando para a correção o modelo evolutivo de Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980), que distingue entre as taxas de substituições decorrentes de transições daquelas causadas por transversões. A consistência dos nós foi avaliada através da reamostragem por 1000 réplicas de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985).

Para a estimativa da distância genética entre as sequências utilizadas para a reconstrução filogenética, como forma de avaliar a alocação intra ou interespecífica do isolado escolhido, utilizou-se a matriz de distâncias calculada no programa MEGA 5.0, de acordo com o modelo de substituição nucleotídica distância-p, utilizado para distâncias genéticas menores do que 0,2.

Quando disponíveis, foram utilizadas como referências as linhagens ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) e ACAM (Australian Collection of Antarctic Micro-organisms, Universidade de Tasmânia, Austrália) depositadas no *GenBank* mais similares a cada isolado.

4.5. Substrato para a produção de proteases

Após a identificação molecular dos micro-organismos capazes de hidrolisar

a caseína em AL, os isolados produtores dos maiores halos neste meio foram cultivados em Erlenmeyers contendo o meio Caldo Farinha de Penas (CFP), Caldo Pena (CP), Caldo Unha (CU) ou Caldo Cabelo (CC) composto por um dos substratos queratinosos desengordurados acima (10g L^{-1}), K_2HPO_4 ($0,3\text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,4\text{ g L}^{-1}$) e NaCl ($0,5\text{ g L}^{-1}$) em água destilada.

A farinha de penas foi fornecida em amostras de 1 kg pela empresa Bunge (Esteio, RS), tendo sido produzida por cocção sob pressão e moagem e desengordurada em laboratório através de lavagens repetidas com éter de petróleo seguido de lavagem com água destilada e secagem em estufa a $50\text{ }^\circ\text{C}$, mesmo processo utilizado para a limpeza dos demais substratos queratinosos..

O pH inicial dos meios foi ajustado com NaOH e HCl $0,1\text{ M L}^{-1}$ antes da esterilização em autoclave por 15 minutos a $121\text{ }^\circ\text{C}$. Frascos de 250 mL contendo 50 mL de CFP foram inoculados com 1% (v/v) de pré-inóculos, também em CFP, de 3, 4 ou 5 dias de crescimento bacteriano e incubados em agitador orbital a 125 rpm sob temperaturas que variaram de 20 a $40\text{ }^\circ\text{C}$ por até 7 dias. Alíquotas de 1 mL dos cultivos foram retiradas a cada 24 h, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm e estocadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, sendo utilizadas como fonte de enzima para as análises de atividade proteolítica e quantificação de proteínas. Todas as inoculações e demais procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical, marca Pachane, modelo PA-115.

4.6. Curva de crescimento

4.6.1. Preparo do pré-inóculo

Para cada um dos isolados selecionados, foi realizada a inoculação em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de CFP 1% a partir da raspagem de colônias puras crescidas em placas de AFP. Esses pré-inóculos foram incubados a $24\text{ }^\circ\text{C}$ em agitador orbital a 125 rpm por 48h.

4.6.2. Preparo dos inóculos

Após 48h de cultivo, alíquotas de 5% dos pré-inóculos foram adicionadas em duplicata a Erlenmeyers de 300 mL contendo 100 mL de CFP, sendo incubados a 24 °C em agitador orbital a 125 rpm por 7 dias.

4.6.3. Amostragem

Dado o crescimento lento dos isolados bacterianos em CFP, alíquotas do meio de cultivo foram retiradas a cada 12 ou 24h, procedendo-se a avaliação da curva de crescimento através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio ágar infusão de cérebro e coração (BHA), através do pH do meio CFP e da atividade enzimática como descrito no item 4.7. Devido à natureza insolúvel do meio CFP, optou-se pela não realização da medição da densidade óptica (OD) do cultivo, uma vez que tal fato leva a interpretação errônea da leitura da absorbância a 600 nm.

4.6.4. Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação das proteínas solúveis foi realizada através do método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se 100 µL de sobrenadante de cultivo centrifugado por 5 minutos a 9.900 g.

4.6.5. Determinação do número de células viáveis

A determinação do número de células viáveis foi estimada pela contagem das Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC mL⁻¹). Para cada ponto de coleta, uma alíquota de 100 µL do cultivo em CFP foi diluída serialmente em solução salina (NaCl 0,85%) da concentração 10⁻¹ até 10⁻¹⁰. De cada diluição, 20 µL foram inoculados em triplicata na forma de *spots* em placas contendo ágar BHI. As placas foram incubadas por 3 ou 5 dias a temperatura ambiente, período após o qual realizou-se a contagem das colônias individuais. Os resultados foram expressos como o valor médio da contagem viável das três repetições.

4.7. Quantificação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica, foi utilizado o substrato azocaseína (Sigma). Em tubos de microcentrífuga, foram misturados 100 μL do sobrenadante obtido no processo anterior, 100 μL de tampão fosfato dissódico ($0,1 \text{ M L}^{-1}$), tampão citrato ($0,1 \text{ M L}^{-1}$) ou tampão Tris-HCl ($0,1 \text{ M L}^{-1}$), com o pH ajustado de acordo com o melhor para a ação da enzima, e 100 μL de uma solução de azocaseína (10 mg mL^{-1}). Tal mistura foi incubada em banho-maria sob temperaturas que variaram de 20 a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Após, foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para parar a reação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 9.900 g e ao sobrenadante obtido foi adicionado a 200 μL de uma solução de NaOH $1,8 \text{ M L}^{-1}$.

Os ensaios foram feitos em duplicata, sendo que os brancos foram preparados adicionando-se TCA 10% antes do período de incubação. A leitura das amostras foi efetuada em espectrofotômetro a 420 nm, sendo uma unidade de atividade enzimática definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 sob as condições do ensaio.

4.8. Determinação da atividade queratinolítica

Para quantificar a atividade queratinolítica das enzimas dos isolados, foi utilizado o substrato insolúvel azoqueratina que, apesar da grande margem de erros, permite a certificação da queratinólise por meio da liberação dos grupamentos azo associados à queratina.

4.8.1. Produção de azoqueratina

A azoqueratina foi sintetizada de acordo com o protocolo de Savitha *et al.* (2007), com modificações. Foram feitas duas soluções, A e B, separadamente. Para a solução A, quatro gramas de farinha de penas previamente desengorduradas foram maceradas até tornarem-se pó, sendo adicionadas a um béquer contendo 80 mL de água deionizada. Esta mistura foi mantida sob

agitação e a ela foram adicionadas 8 mL de uma solução de NaHCO_3 10% (m/v). Para a solução B, em outro recipiente, foram dissolvidos 696 mg de ácido sulfanílico em 20 mL de uma solução de NaOH $0,2 \text{ M L}^{-1}$, adicionando-se ainda 276 mg de NaNO_2 . Tal solução foi acidificada acrescentando-se 1,6 mL de HCl 5 M L^{-1} , misturando-se por 2 minutos. Transcorrido esse tempo, neutralizou-se a solução adicionando-se 1,6 mL de NaOH 5 M L^{-1} . A solução B foi adicionada à solução A e a reação resultante foi agitada durante 10 minutos.

A azoqueratina, caracterizada por um substrato queratinoso de coloração vermelho-alaranjado, foi filtrada a vácuo, lavada várias vezes com água destilada e em seguida com tampão fosfato dissódico ($0,1 \text{ M L}^{-1}$, pH 7,0) até que o pH do filtrado atingisse um valor entre 6,0 e 7,0 e a absorbância a 450nm fosse menor do que 0,01, sendo finalmente seca em estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.8.2. Ensaio para atividade queratinolítica

Para a determinação da atividade queratinolítica, utilizou-se o método descrito por Macedo *et al.* (2008), com modificações. Os ensaios foram conduzidos durante 1 hora sob diferentes temperaturas incubando-se 100 μL do sobrenadante enzimático com 200 μL de uma suspensão de 10 mg de azoqueratina nos mesmos tampões e nas mesmas condições dos ensaios em azocaseína. A reação foi parada pela adição de 500 μL de uma solução de ácido tricloroacético 10%. Os ensaios foram feitos em quadruplicatas, sendo que os controles foram preparados pela adição do ácido tricloroacético antes da enzima.

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a $9.900g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi considerada a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,1 nas condições do ensaio.

4.9. Caracterização do extrato enzimático bruto

4.9.1. Produção das enzimas

Alíquotas do cultivo em CFP foram coletadas no tempo máximo de atividade enzimática em azocaseína, de acordo com o item 4.7, e utilizadas para a caracterização do extrato bruto para as amostras dos três isolados proteolíticos. Todos os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata.

4.9.2. Determinação da temperatura ótima

A determinação da temperatura ótima de ação enzimática foi realizada utilizando-se o sobrenadante do cultivo em CFP no tempo de atividade proteolítica máxima em azocaseína, pH 7,0. Foram testadas as temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 °C, sendo que, na temperatura onde foi observada a maior atividade, foram realizados ensaios diminuindo-se e acrescentando-se em 5 °C a temperatura do experimento.

4.9.3. Determinação do pH ótimo

Para a determinação do pH ótimo de atividade enzimática, foi utilizado o substrato azocaseína diluído em diferentes tampões e pH, procedendo-se os ensaios conforme o descrito no item 4.7, de acordo com a temperatura ótima determinada no ensaio anterior. Para pH entre 5,0 e 7,0, empregou-se o tampão Citrato 0,1 M L⁻¹ e para pH entre 7,0 e 9,5 o tampão Tris-HCl 0,1 M L⁻¹. O ensaio com ambos tampões no pH 7,0 deu-se para avaliar possíveis efeitos dos reagentes tamponantes sob a atividade enzimática em condições idênticas. Os resultados foram expressos como atividade absoluta e relativa, considerando-se o pH de ocorrência da melhor atividade como 100%.

4.9.4. Efeito de inibidores de proteases

Para determinar a natureza das proteases presentes no extrato bruto do cultivo das três bactérias antárticas, foram utilizados reagentes inibidores específicos para diferentes classes de enzimas. Para a detecção de serino

proteases, foi utilizado o seu inibidor fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) na concentração final de 1 mM; para a avaliação da presença de metaloproteases, foram utilizados os agentes quelantes de íons metálicos ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 1,10-fenantrolina, também na concentração final de 1 mM; para a detecção específica de aspártico proteases, foi utilizado o inibidor pepstatina A, na concentração final de 5 µM. Os inibidores, pouco solúveis ou instáveis em água, foram dissolvidos em acetonitrila ou isopropanol, de forma que foram realizados controles incubando-se as enzimas com estes solventes orgânicos, na concentração de 1% (v/v), na ausência de qualquer inibidor para avaliar os seus efeitos sobre a atividade enzimática.

Os ensaios para testar o efeito dos reagentes acima foram realizados em azocaseína, como descrito no item 4.7, com o tampão de melhor atividade e o sobrenadante do ponto ótimo de atividade proteolítica, adicionando-se o reagente a ser testado 10 minutos antes da incubação em banho-maria sob a temperatura ótima de atividade enzimática. O controle foi elaborado procedendo-se o ensaio sem a adição de nenhum reagente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que os resultados foram expressos em termos de atividade relativa, considerando-se o controle como 100%.

4.9.5. Efeito de diferentes sais sobre a atividade enzimática

Para verificar o efeito de sais sobre a atividade enzimática, procedeu-se com os ensaios para atividade proteolítica em azocaseína, como no item 4.7, de acordo com o melhor pH e temperatura, adicionando-se 5 mM (concentração final) dos seguintes sais: CaCl₂, MgSO₄, FeSO₄ e CuSO₄. Os resultados foram expressos como atividade relativa, considerando-se os controles, sem a adição de nenhum sal, como 100%.

4.9.6. Efeito de detergentes sobre a atividade enzimática

A fim de determinar o efeito de substâncias surfactantes sobre a atividade enzimática dos isolados antárticos, foi realizada a pré-incubação das enzimas

com um dos seguintes detergentes durante 10 minutos antes do ensaio de atividade enzimática, realizado de acordo com o item 4.7: Triton X-100 (0,1%), Tween 20 (1%) e SDS (1%). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo que os resultados foram expressos em termos de atividade relativa, considerando-se o controle, sem a adição de nenhum detergente, como 100%.

4.9.7. Efeito de NaCl sobre a produção enzimática

Para determinar o efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a produção de proteases, realizou-se o cultivo dos isolados antárticos no meio CFP como descrito no item 4.5, de acordo com a temperatura ótima de cultivo, acrescentando-o de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 1 M L⁻¹ de sal. Os cultivos foram realizados de acordo com as temperaturas e pH ótimos por até 7 dias, procedendo-se os ensaios enzimáticos em azocaseína como descrito no item 4.7.

4.9.8. Zimogramas

Para a análise da atividade proteolítica dos três isolados bacterianos, foram realizados zimogramas de acordo com o método de Sharma e Gupta (2010), com modificações. Vinte microlitros do sobrenadante de cultivo em CFP de acordo com as condições ótimas determinadas nos ensaios anteriores, foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12%, acrescido de 1 mg L⁻¹ de gelatina, sem desnaturação por calor.

Depois da eletroforese, realizada a 150 V, 23 mA, o gel foi submetido à lavagem por duas vezes com o tampão Tris-HCl 0,1 M L⁻¹ contendo o detergente Triton X-100 (2,5%) por 30 minutos. Foi realizada uma última lavagem somente com o tampão por 1 hora sendo o gel incubado no tampão de desenvolvimento a 30°C *overnight*, composto por Tris-HCl 0,1 M L⁻¹, 5 mM L⁻¹ CaCl₂ e 100 mM L⁻¹ de NaCl. Após esse período, o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250 e descorado com uma solução de ácido acético 10% e metanol 50% em água destilada. As bandas de proteólise são visualizadas como zonas claras no gel corado de azul.

A fim de avaliar o efeito de inibidores de proteases, outros zimogramas foram realizados da mesma maneira, porém com a adição de 10 mM (concentração final) de PMSF ou EDTA aos tampões de lavagem e de incubação dos géis.

4.10. Purificação parcial enzimática de *Lysobacter concretionis* A03

A linhagem bacteriana que apresentou os melhores resultados visuais na degradação dos substratos queratinosos, maior quantidade de proteína solúvel no sobrenadante de cultivo e as maiores atividades proteolítica e queratinolítica, foi escolhida para a etapa de purificação parcial da(s) sua(s) enzima(s). A fim de avaliar o melhor método, do ponto de vista de rendimento e demanda de tempo, três abordagens foram utilizadas.

4.10.1. Precipitação com sulfato de amônio

O isolado bacteriano foi cultivado sob condições ótimas para a produção da enzima em frascos contendo CFP com volume de 50 mL. O sobrenadante do tempo ótimo para a produção da protease foi centrifugado por 10 minutos a 9.900 g e utilizado para a precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 30 e 60%. O cálculo da quantidade de sulfato de amônio necessário para a faixa de saturação escolhida foi realizado com base no volume de sobrenadante obtido, de acordo com Scopes (1994).

Após a adição de sulfato de amônio na quantidade calculada, a solução foi incubada sob agitação a 4 °C por 1 hora, sendo então centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em tampão fosfato dissódico 0,1 M L⁻¹ pH 7,0 em um volume final de até 2 mL, procedendo-se a sua diálise contra o mesmo tampão por um período de 12h a 4 °C sob agitação.

A atividade proteolítica e queratinolítica foram avaliadas em azocaseína e azoqueratina como nos itens 4.7 e 4.8.2, respectivamente, sendo a fração com a melhor atividade sob o substrato testado utilizada para a cromatografia de filtração em gel e para a purificação por partição em três fases (TPP).

4.10.2. Cromatografia líquida de filtração em gel

A fração precipitada que apresentou a melhor atividade proteolítica obtida na etapa anterior foi aplicada em colunas para cromatografia líquida de filtração em gel (20 X 0,8 cm), cada uma contendo as seguintes resinas para a separação das proteínas: Sephadex G-75, G-100 e G-200. Aplicou-se um volume de até 5 % do volume total da coluna e eluiu-se com o mesmo tampão da amostra ressuspendida (Fosfato dissódico, pH 7,0, 0,1 M L⁻¹). Foram coletadas 25 frações de 1 mL, as quais foram submetidas à leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm para a estimativa da concentração de proteínas e testadas quanto à atividade proteolítica em azocaseína (item 4.7). As frações coletadas na coluna que apresentou o melhor resultado de acordo com o valor da atividade específica, dado pela razão entre a atividade enzimática e a quantidade de proteínas, e de acordo com o rendimento da purificação, foram selecionadas para a realização do SDS-PAGE.

4.10.3. Purificação por extração em sistema aquoso bifásico

A purificação parcial através da extração bifásica das proteínas foi realizada segundo o método de Lima *et al.* (2002). Foram preparadas as seguintes soluções estoque, todas na concentração de 50% (m/v): polietilenoglicol (PEG 4000), citrato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de magnésio e sulfato de zinco.

Em tubos para centrífuga de 15 mL, foram adicionados 4 mL da solução de PEG 4000, 4 mL da solução de um dos sais e, por último, 2 mL de sobrenadante bruto obtido de acordo com o item 4.7. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 4 °C por 10 minutos a 2.800 g, sendo então incubados sob refrigeração por até 12 horas até a obtenção do total equilíbrio entre as fases, quando estas foram finalmente separadas cuidadosamente e aliqüotadas em tubos para microcentrífuga.

A atividade proteolítica de ambas as fases das extrações com os diferentes sais foi avaliada, assim como a quantidade de proteínas solúveis, e o coeficiente

de partição, definido como a concentração de proteínas (K_p) ou atividade enzimática (K_c) na fase superior dividido pelo valor correspondente obtido na fase inferior, foi calculado, de acordo com a seguinte fórmula:

$$K = \frac{K_T}{K_B}$$

onde K_T e K_B são os valores da concentração de proteínas ou atividade enzimática nas fases superior e inferior, respectivamente (TUBIO *et al.*, 2009).

4.10.4. Purificação através da partição em três fases (TPP)

A extração enzimática através da partição em três fases foi realizada baseando-se no método descrito por Chiarini e Penna (2003) com modificações. A um volume de 1 mL de sobrenadante precipitado com sulfato de amônio (seção 4.10.1) adicionou-se 500 μ L de n-butanol a temperatura ambiente. Após agitação em vórtex, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos e procedeu-se a centrifugação a 3.800 g durante 10 minutos. As três fases formadas (superior contendo o n-butanol, intermediária contendo proteínas e outros contaminantes desidratados e inferior aquosa) foram separadas, sendo realizados os ensaios de atividade enzimática e quantificação de proteínas pelo método de Lowry *et al.* (1951) a fim de determinar o coeficiente de partição do sistema, conforme o item 4.10.3, e recuperação das enzimas.

4.11. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

Após as etapas de purificação parcial do extrato bruto do isolado bacteriano selecionado, os padrões protéicos obtidos através dos diferentes métodos testados foram analisados através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

As amostras obtidas através dos métodos de purificação por cromatografia líquida, extração aquosa bifásica e extração por partição em três fases foram quantificadas através do método de Lowry *et al.* (1951). Uma concentração de aproximadamente 20 μ g de proteína de cada amostra foi precipitada através da

adição de uma solução de ácido tricloroacético 20% em acetona. A mistura foi mantida sob refrigeração *overnight* e então centrifugada por 15 minutos a 12.900 g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspendido em acetona 100% e centrifugado por 5 minutos a 12.900 g duas vezes, a fim de retirar possíveis impurezas.

O *pellet* resultante foi ressuspendido em 25 µL de tampão de amostra (1 mL de Tris-HCl 500 mM pH 8,0; 0,8 mL de glicerol; 1,6 mL de solução de SDS 100 g L⁻¹; 0,4 mL de β-mercaptoetanol; 0,4 mL de solução de azul de bromofenol 10 g L⁻¹ e 3,8 mL de água destilada) e a mistura foi incubada por 5 minutos em bloco térmico na temperatura de 100 °C. A seguir, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12 % contendo 0,1% de SDS 10%.

A separação das proteínas, de acordo com o seu peso molecular foi realizada através da aplicação de campo elétrico (150 V, 25 mA) e a visualização das bandas foi possível através da coloração do gel com Comassie coloidal. Para determinar o tamanho das bandas proteicas, foi utilizado o marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), com proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

4.12. Caracterização das proteases de *Lysobacter concretionis* A03

Após a etapa de purificação através dos diferentes métodos utilizados, procedeu-se a caracterização do produto obtido com o maior rendimento e fator de purificação.

4.12.1. Determinação do pH e temperatura ótimos

Para determinar o pH e temperatura ótimos, foram realizados ensaios de atividade enzimática em azoqueratina, de acordo com os itens 4.9.2 e 4.9.3.

4.12.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas produzidas pela bactéria caracterizada

foi realizada pela incubação das amostras nas temperaturas de 37, 55 e 70 °C, retirando-se alíquotas nos intervalos de tempo 0, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Em seguida, procederam-se os ensaios enzimáticos em azocaseína de acordo com o tempo e temperatura ótimos determinados.

5. Resultados e Discussão

5.1. Identificação inicial dos micro-organismos

Dez isolados morfológicamente distintos foram capazes de crescer no meio AFP. Através das observações iniciais por microscopia óptica, seis isolados foram identificados como bactérias, 4 Gram-negativas (nomeadas como A03, A04, A05 e A17U) e 2 Gram-positivas (nomeadas como A01 e A08). Os demais 4 isolados foram identificados como leveduras (nomeadas como A06, A09, A10U e A12U).

Brandelli (2008) destaca que a maioria das queratinases descritas têm sido identificadas em bactérias Gram-positivas como *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Streptomyces pactum* e *Microbacterium*. Contudo, exemplos de micro-organismos Gram-negativos com potencial queratinolítico, como *Vibrio.*, *Lysobacter* e *Chryseobacterium*, têm se tornado mais frequentes.

Os testes quanto à capacidade proteolítica em AL evidenciaram que apenas três isolados, todos bacterianos (A03, A08 e A17U), produziram halos de proteólise neste meio, em diferentes temperaturas, preferencialmente entre o pH 7,0 e 9,0 (Figura 2). A preferência por meios alcalinos é amplamente relatada para as queratinases, sendo que a maioria delas possuem ótimos entre pH 7,5 e 10 (BRANDELLI, 2008). A relação entre o diâmetro dos halos e o diâmetro das colônias, após 7 dias de crescimento variou de 0,11 cm para o isolado A03, a 9 °C a 1,78 cm para o isolado A17U a 24 °C (Tabela 1). O crescimento bacteriano ocorreu em todos os isolados entre pH 5,0 e 11, porém, neste último, não houve a formação de halos indicativos de proteólise.

Brandelli e Riffel (2006) descreveram uma relação halo/crescimento de 0,1 cm e 0,5 cm, após 24h de crescimento a 22 e 30 °C, respectivamente, para o isolado Kr6, pertencente ao gênero de bactérias Gram-negativas *Chryseobacterium*. O isolado mostrou-se capaz de degradar penas completamente entre as temperaturas de 25 a 37 °C e pH entre 6,0 e 8,0. Tork *et al.* (2010), trabalhando com amostras coletadas na indústria avícola da Arábia Saudita, isolaram uma linhagem de *Pseudomonas* cuja relação halo/crescimento foi de 2,8 cm quando incubada em ágar leite a 37 °C por 24h. Através da

precipitação e purificação, foi possível a identificação de uma protease de 30 kDa com capacidade de degradar penas preferencialmente a 37 °C e pH 8,0.

Tabela 1. Atividade proteolítica em AL sob diferentes temperaturas, pH 7,0, dos isolados antárticos após 7 dias de incubação. Valores são referentes à relação diâmetro dos halos/ diâmetro das colônias.

Isolados	Identificação inicial	Hidrólise em AL	Tamanho do halo de proteólise		
			9°C	24°C	30°C
A01	Bactéria Gram +	Não	0	0	0
A03	Bactéria Gram –	Sim	0,11	1,5	1,6
A04	Bactéria Gram –	Não	0	0	0
A05	Bactéria Gram –	Não	0	0	0
A06	Levedura	Não	0	0	0
A08	Bactéria Gram +	Sim	0,48	0,45	0,7
A09	Levedura	Não	0	0	0
A10	Levedura	Não	0	0	0
A12	Levedura	Não	0	0	0
A17U	Bactéria Gram –	Sim	1,19	1,78	1,55

Diâmetro dos halos expresso em centímetros. Resultados são a média de dois experimentos.

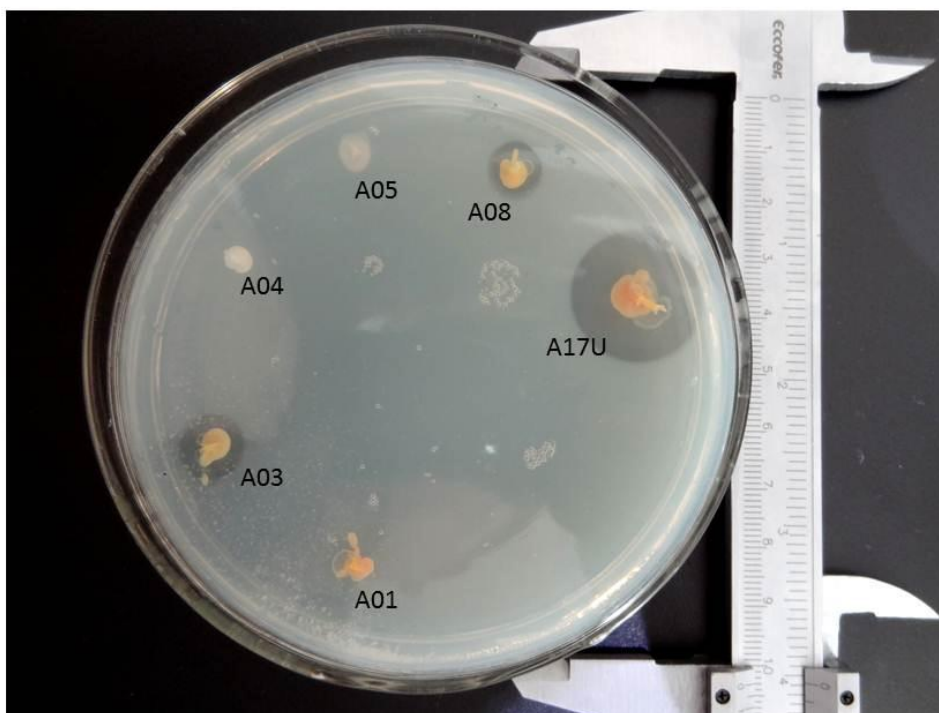


Figura 2. Produção de zonas claras em placa de ágar leite pelos isolados antárticos após 7 dias de cultivo. Foto reletiva a placa cultivada a 4 °C, pH 7,0.

5.2. Identificação molecular

Os seis isolados bacterianos que apresentaram crescimento em AFP e em AL, mesmo aqueles não formadores de halos de proteólise, foram submetidos à amplificação e sequenciamento do gene do rRNA 16S. A identificação inicial das amostras, até o nível taxonômico de gênero, foi realizada através da ferramenta BLAST do NCBI, utilizando as sequências já verificadas e editadas manualmente no programa *Bioedit*.

De acordo com os resultados da busca por similaridade do BLAST (Tabela 2), todos os isolados foram identificados como pertencentes a gêneros distintos, sendo que três deles (*Rhodococcus*, *Burkholderia* e *Aranicola*) nunca foram antes associados à presença de proteases queratinolíticas.

O gênero *Arthrobacter* foi relatado como produtor de queratinases pelos trabalhos de Nilegaonkar *et al.* (2002) e Lucas (2003), enquanto o gênero *Lysobacter* sp. foi reportado como produtor de proteases queratinolíticas extracelulares por Allpress *et al.* (2002). O gênero *Chryseobacterium* sp. teve a sua capacidade proteolítica avaliada por Riffel *et al.* (2007) e Brandelli (2005), que constataram uma alta capacidade de degradação de substratos queratinosos pelo isolado da linhagem kr6 pertencente a esse gênero. Wang *et al.* (2008) identificaram três metaloproteases extracelulares com atividades de queratinase e elastase no isolado identificado como *C. indologens* TKU014, quando cultivado em farinha de casca de camarão.

Tabela 2. Identificação molecular dos isolados bacterianos através do sequenciamento do rDNA 16S.

Isolado	Identificação 16S rDNA	pb	Nº Acesso GenBank	Similaridade	Classe
A01	<i>Rhodococcus</i> sp.	935pb	DQ530478.1	94%	Actinobacteria
A03	<i>Lysobacter</i> sp.	1150pb	AM111012.1	99%	Gammaproteobacteria
A04	<i>Burkholderia</i> sp.	1246pb	AB622682.1	99%	Betaproteobacteria
A05	<i>Aranicola</i> sp.	1396pb	AM398227.1	100%	Gammaproteobacteria
A08	<i>Arthrobacter</i> sp.	1224pb	FR682677.1	97%	Actinobacteria
A17U	<i>Chryseobacterium</i> sp.	1278pb	AJ495802.1	98%	Flavobacteria

5.3. Cultivo em CFP

Os isolados A03, A08 e A17U, identificados respectivamente como *Lysobacter* sp., *Arthrobacter* sp. e *Chryseobacterium* sp. foram selecionados para a prospecção por atividade queratinolítica em meio CFP, dada a sua capacidade de formação de halos indicativos de proteólise em AL.

Os ensaios iniciais em azocaseína e azoqueratina demonstraram que os três isolados são produtores de proteases queratinolíticas, sendo que a linhagem *Lysobacter* A03 se destacou por apresentar as maiores atividades proteolítica e queratinolítica, de 4,99 e 3,62 U mL⁻¹, respectivamente, assim como a maior quantidade de proteínas solúveis no sobrenadante, após 7 dias de cultivo (Tabela 3). O isolado *Arthrobacter* A08 apresentou atividades um pouco abaixo daquelas registradas para A03, enquanto a linhagem *Chryseobacterium* A17U foi o terceiro isolado em atividade enzimática tanto em azocaseína quanto em azoqueratina.

A partir de 48h de cultivo a 20 °C, foi possível observar a alcalinização dos meios do pH inicial 7,0 para 8,0-8,5 para as três bactérias (Tabela 3). Essa alcalinização manteve-se constante, não passando do pH 9,0 durante todo o cultivo. Daroit e colaboradores (2009) ressaltam que a alcalinização do cultivo em CFP, devida às reações de deaminação dos polipeptídeos, é um importante indicativo da hidrólise dos substratos queratinosos.

Tabela 3. Avaliação das atividades proteolítica, queratinolítica e proteína solúvel dos três isolados antárticos após 7 dias de cultivo em CFP a 20 °C, pH inicial 7,0. Ensaio realizado por 1 hora a 30°C, pH 7,0. Desvio padrão entre parênteses.

Isolado	Azocaseína (U/mL)	Azoqueratina (U/mL)	Proteína Solúvel mg/mL	pH Final
A03	4,99 (± 0,2051)	3,62 (± 1.2335)	1,13 (± 0,3339)	8,5
A08	0,665 (± 0,9291)	0,365 (± 0,2026)	1,11 0,047)	8
A17U	0,65 (± 0,02082)	0,77 (± 0,2082)	0,73 (± 0,086)	8

Na avaliação visual dos cultivos em CFP (Figura 3) foi possível constatar que a bactéria *Lysobacter* A03 foi a mais efetiva na degradação do substrato, seguida por *Arthrobacter* A08. *Chryseobacterium* A17U mostrou-se menos eficiente na degradação da farinha de penas, não sendo percebida uma grande diferença em relação aos controles não inoculados, apesar de nos ensaios em AL esse isolado ter se mostrado o produtor dos maiores halos indicativos de hidrólise da caseína do leite (Figura 2).

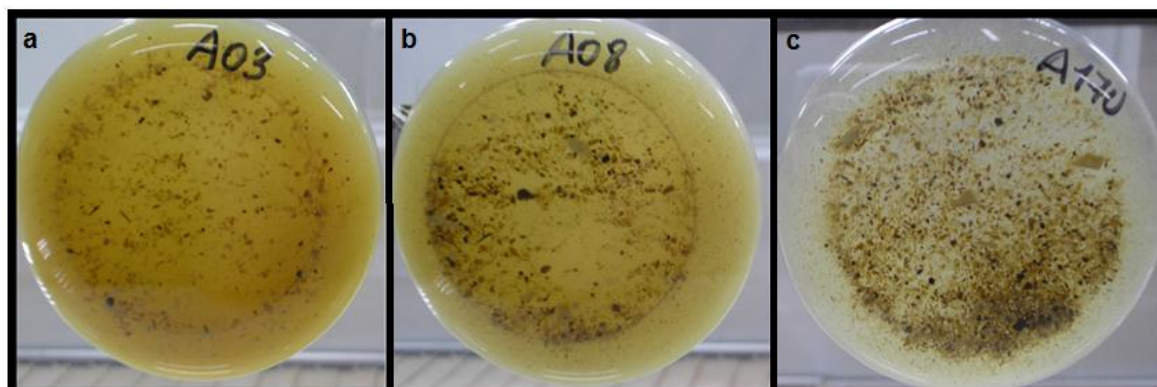


Figura 3. Aspecto visual do meio CFP inoculado com *Lysobacter* A03 (a), *Arthrobacter* A08 (b) e *Chryseobacterium* A17U (c) após 7 dias de cultivo a 20 °C, pH 7,0 (inicial), 125rpm. ICTA-UFRGS, 2011.

A atividade inicial em azocaseína, conduzida a 30°C, pH 7,0 (Figura 4), demonstrou que as três linhagens foram capazes de produzir uma maior quantidade de proteases sob a temperatura de cultivo de 20°C, sendo que na temperatura de 30 °C a atividade enzimática foi reduzida em cerca de 50% para as três bactérias. O crescimento bacteriano e hidrólise da farinha de penas foram gradativamente reduzidos com o aumento da temperatura de cultivo até a sua quase ou completa inibição à temperatura de 40 °C, quando não foi observada turbidez no meio nem pode ser detectada atividade proteolítica significativa em azocaseína.

A temperatura ótima de cultivo, de 20 °C encontra-se dentro da faixa de crescimento dos micro-organismos psicotróficos. De acordo com Denner *et al.* (2001) no ambiente antártico, as bactérias psicotróficas e psicofílicas são predominantes e desempenham papel crucial na reciclagem de nutrientes, de forma que a preferência por temperaturas reduzidas para a queratinólise pelas

bactérias Antárticas, em relação às bactérias queratinolíticas meso e termofílicas descritas, era, de certa forma, esperado. No entanto, Gushterova *et al.* (2005), trabalhando com amostras de solo da ilha Livingston, península Antártica, detectaram a presença de dezenove linhagens de actinomicetos termófilos e mesófilos, entre elas, *Streptomyces flavis* e *Microbispora aerata*, um resultado inesperado, como argumentado pelos próprios autores, que afirmam ainda que tais linhagens podem ser originadas da poluição no continente ou mesmo que tais linhagens sejam relíquias das eras Paleozóica e Mesozóica, quando as temperaturas na Antártida eram bem superiores às registradas atualmente.

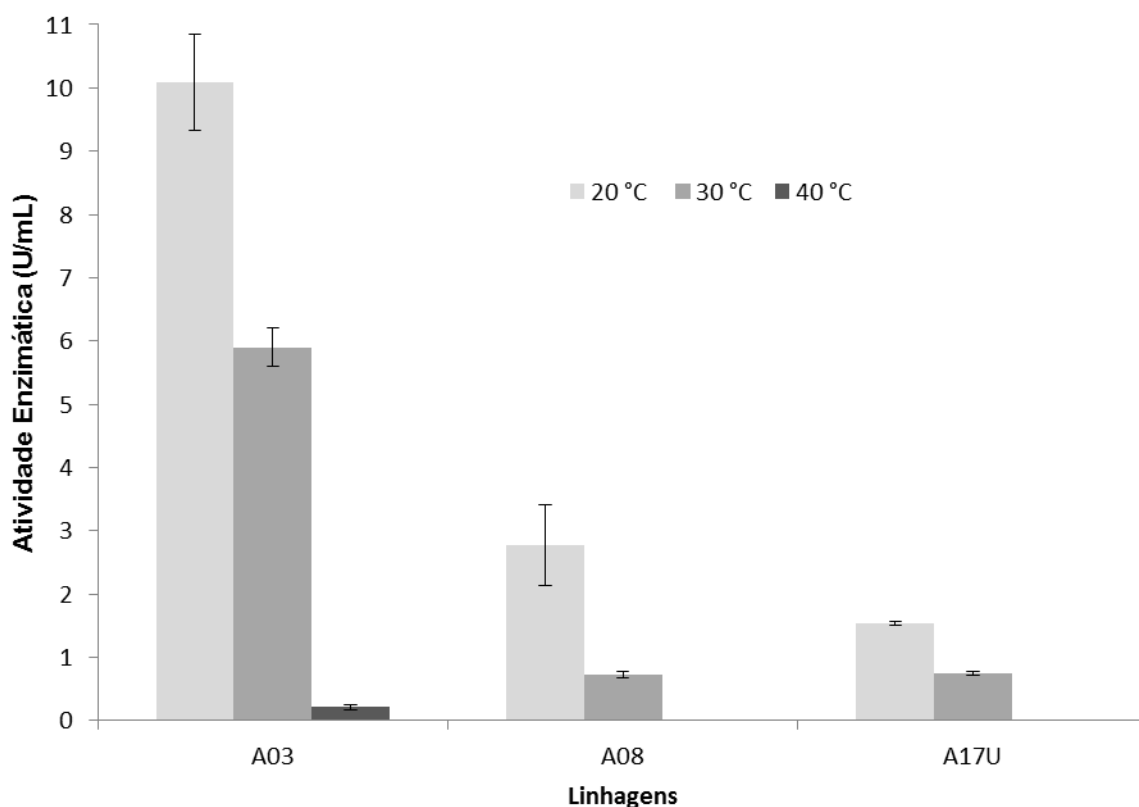


Figura 4. Atividade enzimática em azocaseína, 30°C, pH 7,0, dos isolados *Lysobacter* sp. (A03), *Artthrobacter* sp. (A08) e *Chryseobacterium* sp. (A17U) no tempo ótimo de cultivo, pH 7,0 (inicial), 125rpm e diferentes temperaturas.

5.4. Crescimento em diferentes condições e meios de cultivo

Os isolados *Lysobacter* sp. A03, *Arthrobacter* sp. A08 e *Chryseobacterium* sp. A17U foram inoculados em diferentes substratos queratinosos, sendo eles Caldo pena (CP), Caldo Cabelo (CC) e Caldo Unha (CU), na temperatura de 20°C, 125 rpm, sendo retiradas alíquotas dos meios de cultivo após 15 e 30 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da proteína solúvel nos substratos queratinosos após 15 e 30 dias de cultivo sob agitação a 20 °C.

Isolado	Proteína solúvel (mg mL ⁻¹)					
	CP		CC		CU	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
A03	0,51	0,61	0,18	0,11	0,078	0,49
A08	0,09	0,14	0	0,2	0,25	0,43
A17U	0,31	0,44	0,082	0,1	0,25	0,37

Os resultados são a média de duas repetições.

No cultivo de 15 dias em CP, foi possível observar o aumento da turbidez do meio e a degradação visual das penas somente pelo isolado A03, sendo que após 30 dias de cultivo, ainda foi possível verificar a presença das ráquis inteiras das penas. A quantidade de proteína solúvel foi de 0,51 mg mL⁻¹ após 15 dias de cultivo a 20 °C e de 0,61 mg mL⁻¹ após 30 dias de incubação, o que representa um aumento de aproximadamente 20% na degradação do meio em relação as primeiras duas semanas de cultivo.

O isolado A17U foi o segundo isolado com maior liberação de proteínas solúveis no meio CP, apresentando leve turvamento do cultivo, mas somente foi possível observar o desprendimento de parte das barbas e bárbulas das ráquis das penas. A quantidade de proteína solúvel foi de 0,31 mg mL⁻¹ e 0,44 mg mL⁻¹ após 15 e 30 dias de cultivo a 20 °C, respectivamente, o que significa um aumento de cerca de 41% na degradação das penas.

Já para o isolado A08U, não houve modificação visual do meio CP quando

comparado ao cultivo controle (não inoculado). A quantidade de proteína solúvel foi de 0,09 mg mL⁻¹ e 0,14 mg mL⁻¹ para 15 e 30 dias, respectivamente, o que significa um aumento de mais de 50% nas duas últimas semanas de cultivo.

Nagal e Jain (2010) testaram oito linhagens de *Bacillus*, isoladas de penas em decomposição, quanto à sua capacidade de degradar resíduos queratinosos. Em 24h de cultivo em substratos queratinosos, a quantidade de proteínas solúveis variou de 0,49 mg mL⁻¹ para *Bacillus* sp. KB087 a 1,294 mg mL⁻¹ para *B. licheniformis* Kb059.

Os cultivos realizados em CU por 30 dias apresentaram a segunda maior quantidade de proteínas solúveis, de 0,49 mg mL⁻¹ e 0,37 mg mL⁻¹ para os isolados A03 e A17U, respectivamente. Para o isolado A08, o meio CU foi o mais responsivo para a degradação da queratina, com uma liberação de 0, mg mL⁻¹ em 30 dias de incubação.

Uma interessante aplicação médica para as enzimas queratinolíticas em unhas humanas foi reportada por Mohorcic e colaboradores (2007). Argumentando que a terapia tópica de doenças nas unhas é limitada devido à baixa permeabilidade das drogas através da camada de queratina, os autores utilizaram queratinases para auxiliar na difusão dos medicamentos através das unhas. As análises de permeação demonstraram que a abordagem foi eficaz no aumento da distribuição de drogas tópicas graças à hidrólise promovida pelas enzimas.

Nos cultivos das três bactérias em CC, houve a menor produção de proteína solúvel entre os substratos queratinosos avaliados, mesmo a turbidez dos meios não foi visualmente diferente entre os inóculos e o controle, sendo que a maior quantidade de peptídeos liberados foi medida para o isolado *Arthrobacter* sp. A08 (0,2 mg mL⁻¹) em 30 dias de cultivo, seguido pelo isolado *Lysobacter* sp. A03, que produziu uma quantidade de 0,18 mg mL⁻¹ de proteína solúvel no sobrenadante de 15 dias de cultivo.

Quando comparados aos cultivos em CFP apresentados na tabela 3, tais valores são bastante inferiores, provavelmente pelo fato de que neste meio a queratina está numa forma mais biodisponível para a ação das proteases microbianas, devido ao pré-tratamento sobre altas temperaturas e pressão, que

levam à quebra de parte das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína das penas (BRANDELLI *et al.*, 2010).

Mazotto *et al.* (2011), estudando o efeito do cultivo sob diferentes substratos de três linhagens de *Bacillus* sp., concluíram que o CFP foi o melhor meio para a produção de queratinases quando comparado aos cultivos realizados em CP das linhagens 1270 e 1273 de *B. subtilis*. O mesmo foi observado pelo trabalho de Son *et al.* (2008), no qual a linhagem F3-4 de *B. pumilis* foi mais efetiva na degradação de farinha de pena (97%) do que das penas inteiras levando a uma alta produção de proteases queratinolíticas.

5.5. Perfil de crescimento e produção de enzimas proteolíticas

A produção de proteases extracelulares é altamente induzível pelo cultivo em substratos protéicos, sendo que ela comumente ocorre durante a fase estacionária de crescimento bacteriano. Os componentes do meio, as variações na razão Carbono/Nitrogênio, a presença de carboidratos mais facilmente metabolizáveis e de íons metálicos influenciam na produção de peptidases, assim como a presença de fontes para a assimilação rápida de nitrogênio, como aminoácidos solúveis (GUPTA *et al.*, 2002).

Ainda, considerando-se organismos psicrófilos e psicrotróficos, a síntese de enzimas está intimamente vinculada à temperatura do cultivo, sendo que para compensar as taxas de reação reduzidas em baixas temperaturas, a produção enzimática por micro-organismos adaptados ao frio possui uma especificidade cerca de dez vezes maior nesse intervalo de temperatura quando comparados aos mesofílicos (FELLER & GERDAY, 2003). Tal fato torna qualquer aumento de temperatura um evento dramático para a redução da atividade enzimática.

O delineamento da curva de crescimento das bactérias antárticas está demonstrado nas figuras 5, 6 e 7. Enquanto o isolado *Lysobacter* A03 apresentou seu pico de crescimento por volta de 100 horas de cultivo, o isolado *Arthrobacter* A08 teve seu ápice de crescimento aproximadamente na metade desse tempo, em 50 horas, mantendo um platô até cerca de 120 horas de cultivo, quando a população bacteriana começou a entrar na fase de declínio. Para a linhagem

Chryseobacterium A17U, o pico de crescimento populacional se deu por volta das 80 horas de cultivo, declinando rapidamente após esse período. Um fator interessante a ser notado refere-se ao fato de que, apesar de possuidor da maior atividade proteolítica, *Lysobacter* A03 apresentou a menor contagem de células viáveis quando inoculada em meio BHA a temperatura de cerca de 20°C.

A linhagem *Lysobacter* sp. A03 apresentou as maiores atividades proteolítica e queratinolítica, de 11,59 mg mL⁻¹ e 2,58 mg mL⁻¹, respectivamente, sendo que o pico de atividade enzimática em azocaseína foi coincidente com o início da fase de crescimento exponencial e o pico da fase estacionária, entre 72 e 96 horas de cultivo em meio CFP a 20 °C. Especificamente, a atividade queratinolítica teve seu ápice logo após, no quinto dia de cultivo, durante a fase de declínio populacional (Figura 5).

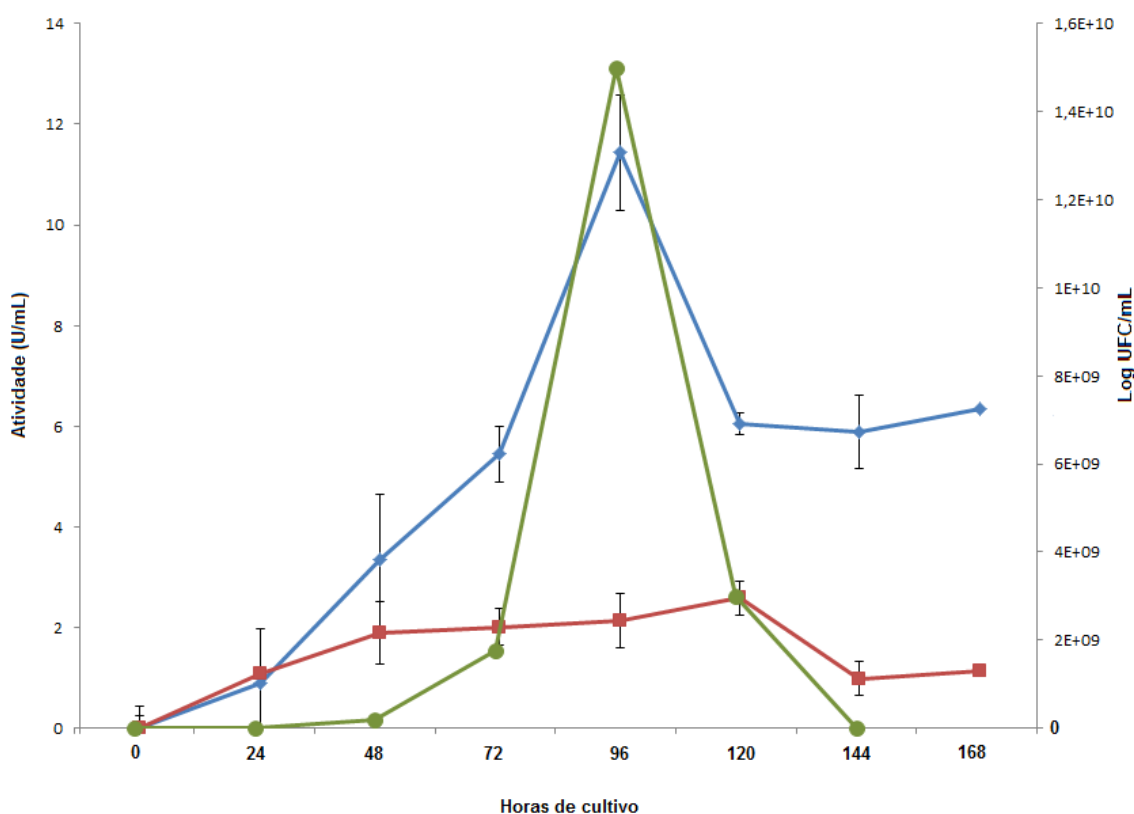


Figura 5. Perfil de crescimento (●), atividade proteolítica em azocaseína (◆) e queratinolítica em azoqueratina (■) do isolado *Lysobacter* sp. A03 durante o cultivo em CFP a 20°C, pH 7,0 (inicial), 125 rpm. Curva de crescimento representa o resultado de duas repetições. ICTA-UFRGS, 2011.

O isolado *Arthrobacter* sp. A08 apresentou o pico de atividade proteolítica e queratinolítica coincidentes, durante a fase estacionária de crescimento, entre 48 e 96 horas de cultivo. Esse comportamento pode indicar a presença de uma protease com propriedade proteolítica e queratinolítica ou a ação de proteases menos específicas que atuam em conjunto com uma queratinase, aproveitando-se dos resíduos de queratina previamente hidrolisados por ela, de forma a facilitar a degradação das cadeias polipeptídicas (Figura 6).

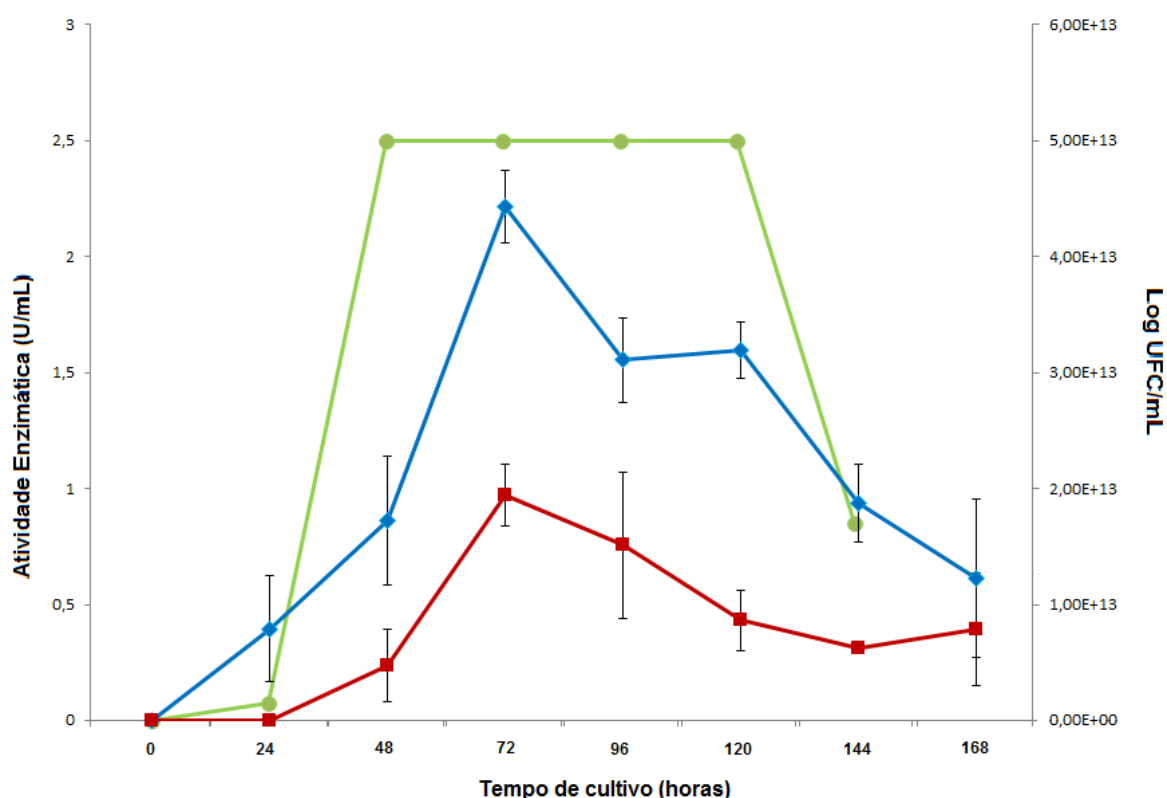


Figura 6. Perfil de crescimento (●), atividade proteolítica em azocaseína (◆) e queratinolítica em azoqueratina (■) do isolado *Arthrobacter* sp. A08 durante o cultivo em CFP a 20°C, pH 7,0 (inicial), 125 rpm. Curva de crescimento representa o resultado de duas repetições. ICTA-UFRGS, 2011.

Em contrapartida, *Chryseobacterium* sp. A17U apresentou uma baixa atividade enzimática tanto sobre o substrato azocaseína quanto em azoqueratina, durante todo o período de cultivo, independente da fase de crescimento bacteriano. Ainda assim, a produção ótima de proteases foi coincidente com o pico de crescimento populacional, em aproximadamente 72 horas de cultivo

(Figura 7). Similarmente, no estudo de Brandelli e Riffel (2005), a linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 atingiu a fase estacionária de crescimento após 24h de cultivo em caldo peña entre temperaturas de 25 a 37 °C, também coincidindo com a sua atividade proteolítica máxima.

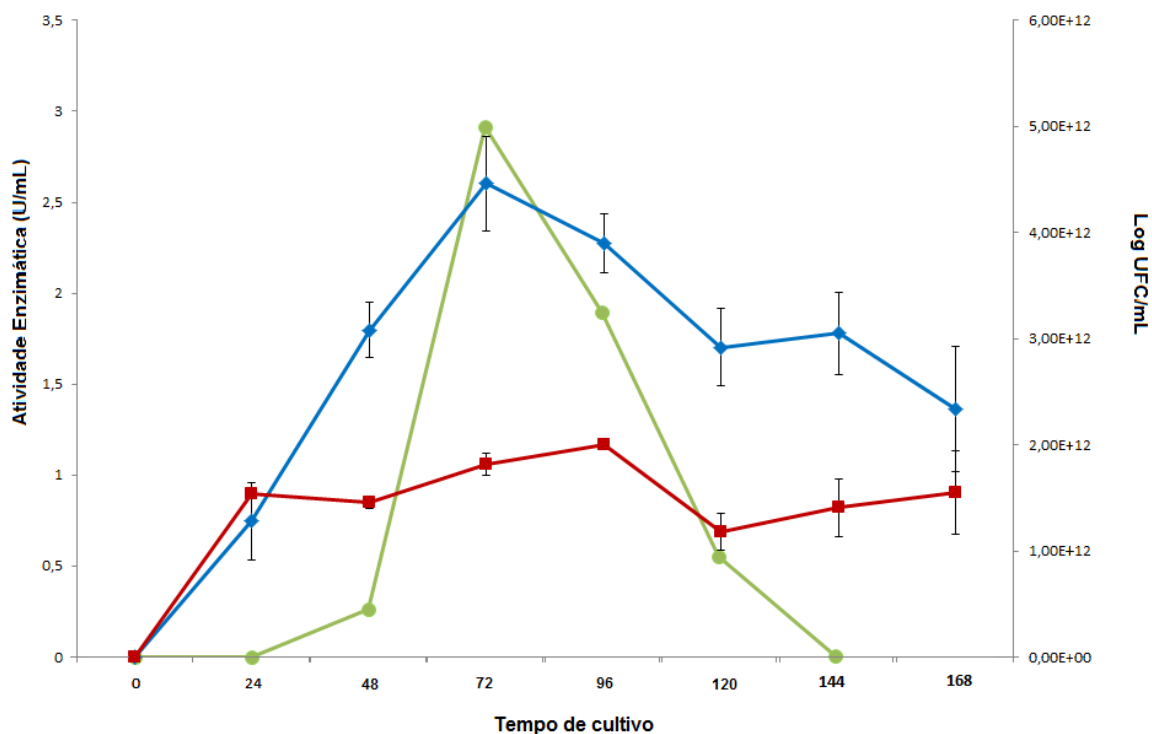


Figura 7. Perfil de crescimento (●), atividade proteolítica em azocaseína (◆) e queratinolítica em azoqueratina (■) do isolado *Chryseobacterium* sp. A17U durante o cultivo em CFP a 20°C, pH 7,0 (inicial), 125 rpm. Curva de crescimento representa o resultado de duas repetições. ICTA-UFRGS, 2011.

A produção de uma enzima está relacionada com a fase de crescimento do organismo que a produz. Em *Bacillus*, por exemplo, a síntese de proteases é constitutiva ou parcialmente induzida, sendo controlada por mecanismos complexos que operam durante a transição entre a fase de crescimento exponencial para a estacionária (PRIEST, 1977). Várias espécies de bactérias têm a produção de proteases vinculada à fase de crescimento estacionária, havendo pouca ou nenhuma produção enzimática durante a fase de crescimento exponencial. Algumas exceções são as linhagens de *B. subtilis* ATCC 14416 e *B. sphaericus* BSE 18, nas quais a produção máxima de enzimas está associada ao meio da fase de crescimento exponencial (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Szabo *et al.* (2000), a fim de avaliar o potencial queratinolítico de uma linhagem termotolerante de *Streptomyces graminofaciens*, utilizaram a comparação entre a composição dos aminoácidos liberados dos fragmentos de penas hidrolisados pelo isolado com fragmentos intactos como medida da degradação dos resíduos queratinosos, concluindo que a liberação de peptídeos e aminoácidos é um bom indicativo de proteólise.

A quantificação das proteínas solúveis revelou que o isolado *Lysobacter sp.* A03 apresentou a maior liberação de peptídeos no sobrenadante, com um aumento gradual até o pico, no sexto dia de cultivo em CFP, quando foram registrados $2,39 \text{ mg mL}^{-1}$, um dia após o seu tempo máximo de atividade enzimática em azoqueratina.

A curva de proteínas solúveis para *Arthrobacter sp.* A08 comportou-se de maneira muito similar àquela de *Lysobacter*, porém, o pico de proteínas solúveis no sobrenadante situou-se três dias depois do ponto máximo de atividade proteolítica e queratinolítica, no sexto dia de cultivo, com a liberação de um máximo de $2,05 \text{ mg}$ de proteínas por mL . Já para o isolado *Chryseobacterium* A17U, a quantidade de proteínas liberadas no sobrenadante foi bastante inferior e bastante estável em todo o período, não passando de 1 mg mL^{-1} no quinto dia de cultivo (Figura 8).

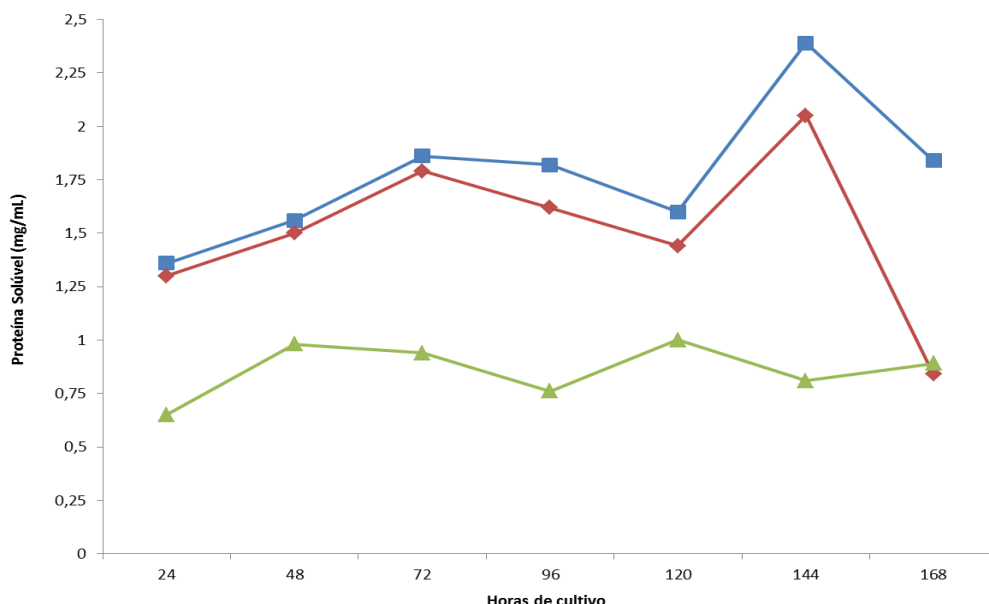


Figura 8. Quantificação de proteínas solúveis no sobrenadante dos três isolados antárticos durante o cultivo em CFP a 20°C, 125 rpm: (■) *Lysobacter sp.* A03; (♦) *Arthrobacter sp.* A08; (▲) *Chryseobacterium sp.* A17U. Resultados são a média de duas renetições

Nagal e Jain (2010) testaram oito linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* com capacidade queratinolítica. Destas, o isolado *B. cereus* KB043 foi considerado o melhor degradador de penas, tendo liberado a maior quantidade de proteína solúvel (1,2 mg/mL) e apresentando também o maior nível de atividade queratinolítica (39,1 U/mL) em seis dias de cultivo a 37 °C.

5.6. Caracterização do extrato bruto

5.6.1. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A temperatura ótima reportada para a maioria das queratinases situa-se entre 30 a 80 °C, mas há relatos de micro-organismos cujas proteases são otimamente ativas a 100 °C (GUPTA & RAMMANI, 2006). Já entre as enzimas adaptadas ao frio, a atividade catalítica máxima tipicamente situa-se abaixo dos 40 °C (NICHOLS *et al.*, 2002). Neste trabalho, os sobrenadantes enzimáticos brutos apresentaram picos de atividade em temperaturas mesofílicas a levemente termofílicas, apesar de a melhor temperatura de cultivo ter sido determinada dentro da faixa dos organismos psicrotróficos, ou seja, entre 20 e 30 °C.

As linhagens *Lysobacter* sp. A03 e *Chryseobacterium* sp. A17U produziram enzimas otimamente ativas na faixa dos 40 °C, enquanto as proteases de *Arthrobacter* sp. A08 apresentaram seu pico de atividade a 35 °C. Na faixa dos 30 aos 50 °C, os três sobrenadantes enzimáticos conservaram aproximadamente 60% da sua atividade máxima. (Figura 9).

Esse resultado pode ser explicado por meio da equação de Arrhenius, que permite calcular a variação da constante de velocidade de uma reação química com a temperatura, descrita por:

$$K=Ae^{-E_a/RT}$$

onde K é a constante de velocidade, A é a constante pré-exponencial, E_a é a energia de ativação, R é a constante dos gases e T refere-se à temperatura

absoluta. Assim, ocorre o aumento exponencial da taxa de reação K de acordo com a elevação da temperatura.

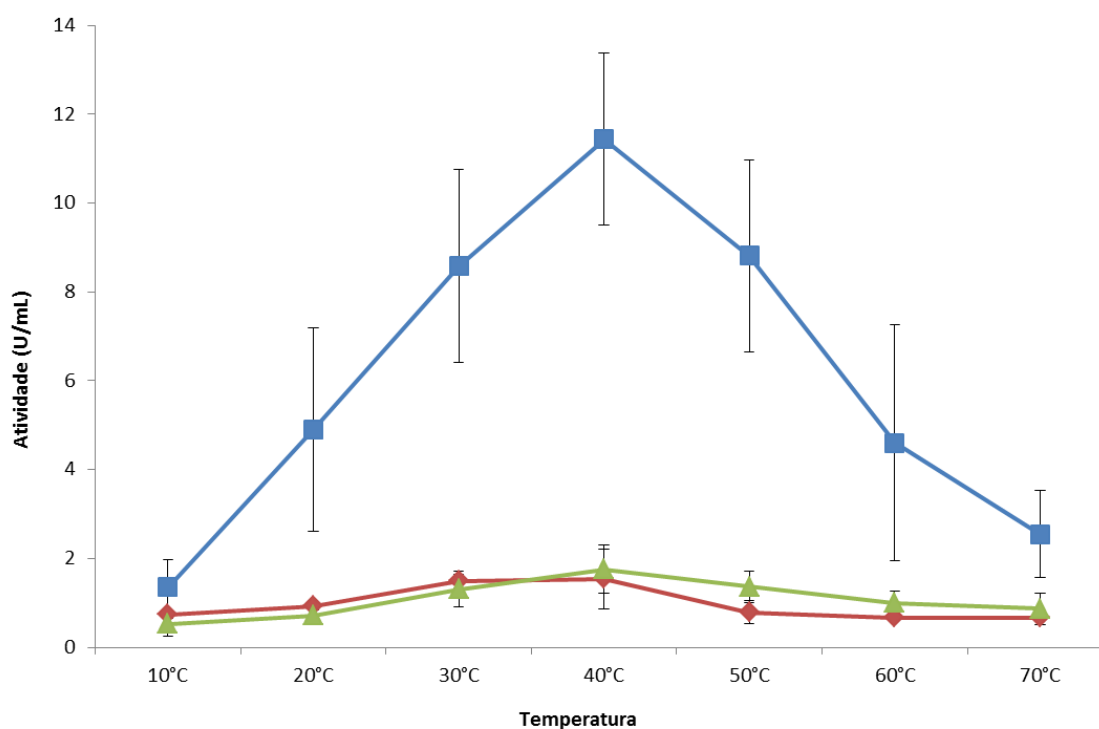


Figura 9. Efeito da temperatura sobre as proteases brutas produzidas por (■) *Lysobacter* sp. A03; (◆) *Arthrobacter* sp. A08 e (▼) *Chryseobacterium* sp. A17U em ensaio enzimático sobre o substrato azocaseína, pH 7,0.. ICTA-UFRGS, 2011.

Em micro-organismos psicrófilos e psicrotópicos, as taxas reduzidas de atividade em baixas temperaturas são compensadas por uma maior flexibilidade do sítio ativo das enzimas. Com o aumento da temperatura, a probabilidade de colisão entre as moléculas é maior. No entanto, devido à própria flexibilidade da enzima, passado um determinado limite, a taxa de reação K rapidamente cai por consequência da inativação enzimática devido à sua baixa estabilidade térmica (FELLER & GERDAY, 2003).

Além disso, a otimização da reação enzimática em organismos adaptados ao frio depende do alvo do catalisador: enzimas extracelulares devem ter uma maior flexibilidade para adotar uma estratégia própria de ajuste aos parâmetros catalíticos do meio do que enzimas intracelulares, das quais depende a sobrevivência celular e que devem por isso ter uma maleabilidade menor

(FELLER & GERDAY, 2003). Dessa forma, ao se trabalhar com o sobrenadante bruto enzimático, é razoável que ocorra um desvio do que seria a temperatura ótima na situação de cultivo, no caso, de 20 °C para a faixa dos 30-40 °C, como observado com os isolados antárticos estudados.

5.6.2. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

Para avaliar o efeito do pH, os cultivos nos tempos de atividade enzimática ótima das três bactérias selecionadas foram submetidos a ensaios sob o substrato azocaseína a 30 °C para *Arthrobacter* sp. A08 e a 40 °C para *Lysobacter* sp. A03 e *Chryseobacterium* sp. A17U.

As três bactérias antárticas possuem proteases com características neutras a alcalinas (Figura 10). Para o extrato bruto do isolado *Lysobacter* sp. A03 observou-se um aumento de aproximadamente 40% na atividade proteolítica entre o pH 7,0 e 8,5 em relação ao pH 6,5. Sua atividade máxima foi alcançada em pH 9,5, mantendo-se relativamente estável na amplitude de entre 7,0 e 9,5, com uma ligeira queda em pH 9,0. Esse comportamento pode ser devido à presença de mais de uma protease no extrato bruto, com ótimos em diferentes pH.

A linhagem *Arthrobacter* sp. A08 comportou-se de maneira similar, porém suas proteases demonstraram-se um pouco mais alcalofílicas, com o aumento na atividade das proteases vinculado à elevação do pH, sendo que entre o pH 7,0 e 9,5 foi observada 75% da atividade enzimática total. Seu pico de proteólise se deu por volta do pH 8,0, com a atividade mantendo-se estável até o pH 9,5.

Para a bactéria *Chryseobacterium* sp A17U a elevação do pH foi acompanhada pelo aumento na atividade proteolítica, sendo que entre pH 7,0 e 8,5 ocorreu um aumento de 37% na atividade proteolítica em relação aos pH ácidos testados. A atividade máxima das suas proteases foi observada em um pico bem definido sob pH 8,5. A partir de pH mais alcalinos, sua atividade enzimática foi rapidamente reduzida.

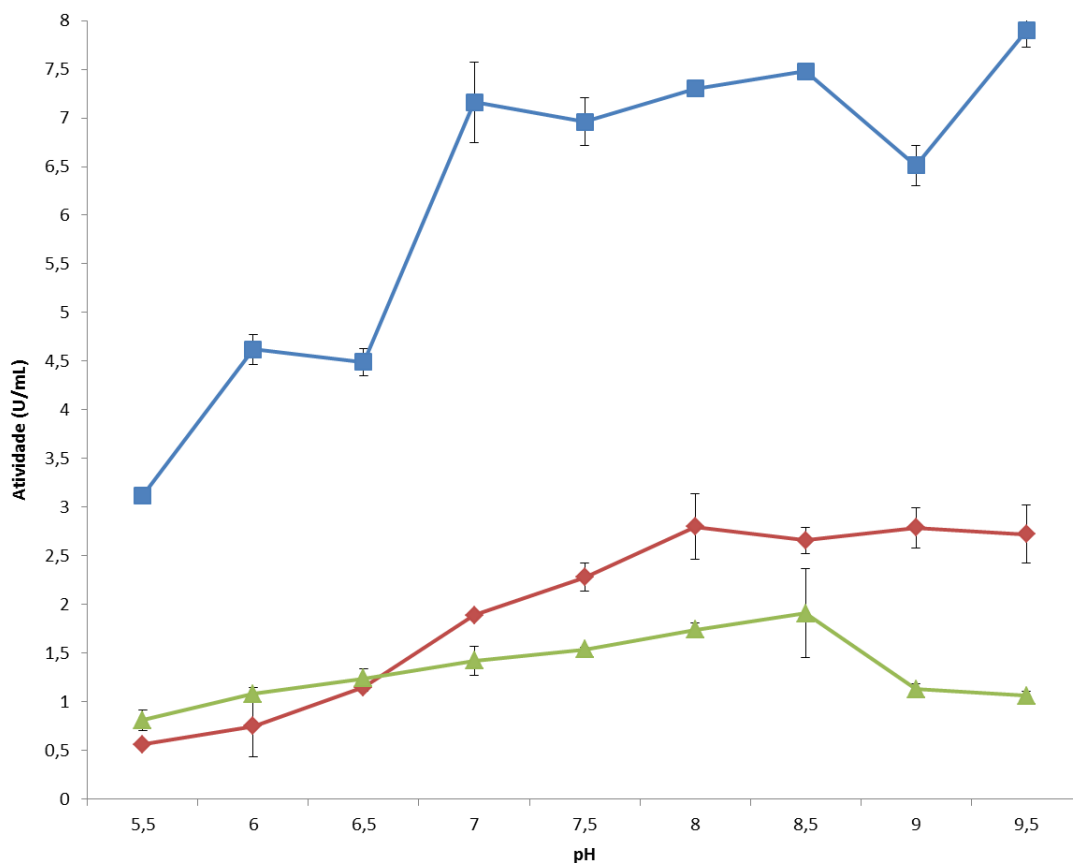


Figura 10. Efeito do pH sobre as proteases brutas produzidas por (■) *Lysobacter* sp. A03; (♦) *Arthrobacter* sp. A08 e (▼) *Chryseobacterium* sp. A17U em ensaio enzimático sobre o substrato azocaseína. Temperatura do ensaio de 35°C para A08 e de 40°C para A03 e A17U. ICTA-UFRGS, 2011.

De acordo com a revisão de Brandelli (2008), a maioria das queratinases descritas é de natureza neutra a alcalina. Por exemplo, as enzimas dos isolados *Fervidobacterium pennavorans* (FRIEDRICH & ANTRANIKIAN, 1996) e *Kocuria rosea* (BERNAL *et al.*, 2006), ambos produtores de serino proteases, tiveram suas atividades máximas em pH 10, enquanto uma metaloprotease produzida por *Chryseobacterium* Kr6 (RIFFEL *et al.*, 2007), foi otimamente ativa em pH 7,5.

Tendo em vista os processos industriais, enzimas ativas em uma ampla faixa de pH possuem uma notável vantagem, pois não requerem um grande controle para esse parâmetro, o que leva a uma diminuição nos gastos com agentes tamponantes. Proteases alcalinas possuem um grande potencial principalmente na indústria de detergentes, pois sua atividade em pH elevado é compatível com outros agentes quelantes e oxidantes adicionados a estes

produtos. A Esperase e a Savinase, produzidas por linhagens alcalofílicas de *Bacillus* spp., são exemplos comerciais de duas enzimas com um ponto isoelétrico extremamente alto, este talvez o parâmetro mais importante para a sua utilização (RAO *et al.*, 1998).

5.6.3. Efeito de NaCl sobre a produção enzimática

Uma vez que as amostras das quais foram isolados os micro-organismos antárticos procedem de uma região insular, as três bactérias selecionadas foram testadas quanto à sua tolerância a diferentes concentrações de NaCl.

Kushner (1978) definiu halófilos moderados como organismos cujo crescimento ótimo se dá em concentrações entre 0,5 e 2,5 M de NaCl, enquanto bactérias capazes de crescer tanto na ausência quanto em altas concentrações de sal foram denominadas halotolerantes ou extremamente halotolerantes, neste último caso, quando o crescimento se estende em concentrações superiores a 2,5 M.

O isolado *Chryseobacterium* A17U teve a sua atividade proteolítica inibida já na concentração final de 0,05 M de NaCl, com uma redução de 27 % na sua atividade enzimática no tempo ótimo de cultivo, em relação àqueles realizados sem sal. Nas concentrações entre 0,1 e 0,5 M, a atividade se manteve relativamente estável, com uma redução de 56% em relação aos cultivos sem a adição do sal.

A linhagem *Arthrobacter* A08 manteve a atividade estável até a concentração de 0,05 M de NaCl, sendo que a proteólise foi reduzida em aproximadamente 40% na concentração de 0,1 M do sal. Curiosamente, na concentração de 0,5 M, a atividade enzimática sofreu um aumento de cerca de 44% em comparação aos cultivos entre 0,1 e 0,4 M, o que pode dever-se a outros fatores não detectados.

O isolado *Lysobacter* A03 apresentou um leve aumento na sua atividade enzimática até a concentração de 0,05 M de NaCl. Foi observado o turvamento dos meios de cultivo logo nas primeiras 24h de incubação, assim como foi constatada visualmente a hidrólise da farinha de penas. Nessa concentração de

sal, a atividade enzimática chegou a um pico máximo de 11,37 U/mL no tempo ótimo de cultivo. Entre as concentrações de 0,1 M a 0,2 M de NaCl, foi registrada a diminuição na atividade enzimática de *Lysobacter* A03, sendo que entre 0,3 e 0,5 M a atividade enzimática se manteve estável (Figura 11).

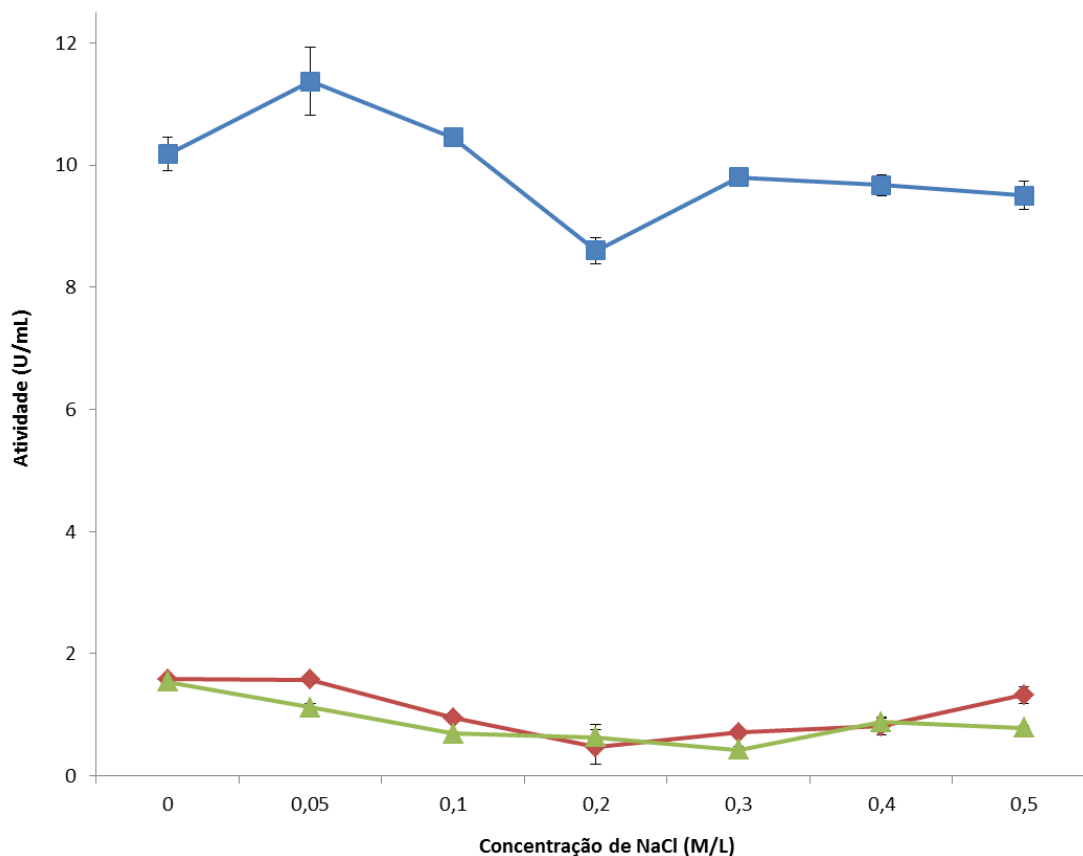


Figura 11. Efeito de NaCl sobre a produção de proteases por: (■) *Lysobacter* sp. A03; (◆) *Arthrobacter* sp. A08 e (▼) *Chryseobacterium* sp. A17U nos ensaios enzimáticos realizados em substrato azocaseína, temperatura dos ensaios de 35°C para A08 e de 40°C para A03 e A17U, pH 8,0.

Uma vez que *Lysobacter* A03 teve a melhor resposta nos cultivos com NaCl, foi realizada uma curva de atividade enzimática durante uma semana de cultivo nas concentrações de sal entre 0 e 0,2 M (Figura 12).

Constatou-se que até 0,1 M, a atividade enzimática aumentou mais rapidamente nos primeiros 3 dias do que nos cultivos sem a adição de sal, apesar de o máximo de atividade enzimática ter sido observada para a concentração de 0,05 M de NaCl. Porém, nas concentrações de 0,1 e 0,2 M, a atividade enzimática se manteve mais estável e próxima àquela observada nos cultivos sem a adição

de sal.

Ventosa *et al.* (1998) destacam que, curiosamente, a requisição e tolerância ao sal variam de acordo com as condições de crescimento como temperatura e composição do meio, como no exemplo da bactéria *Marinococcus halophilus*, a qual se desenvolve em concentrações de sal tão baixas quanto 0,01 M a 20 °C, mas que necessita de pelo menos 0,5 M de NaCl a 25 °C.

De forma semelhante, nos cultivos sem sal, ocorreu a redução de aproximadamente 43% da atividade enzimática de *Lysobacter* A03 com o aumento da temperatura de incubação de 20 °C para 30°C, enquanto nos cultivos realizados com 0,1 M de NaCl, essa redução foi menos expressiva, ficando em torno de 30%. Dessa forma, há a sugestão de que a adição de sal aos cultivos exerce um efeito protetor sobre as enzimas do isolado A03, fator que pode ser explorado quando do seu emprego em larga escala.

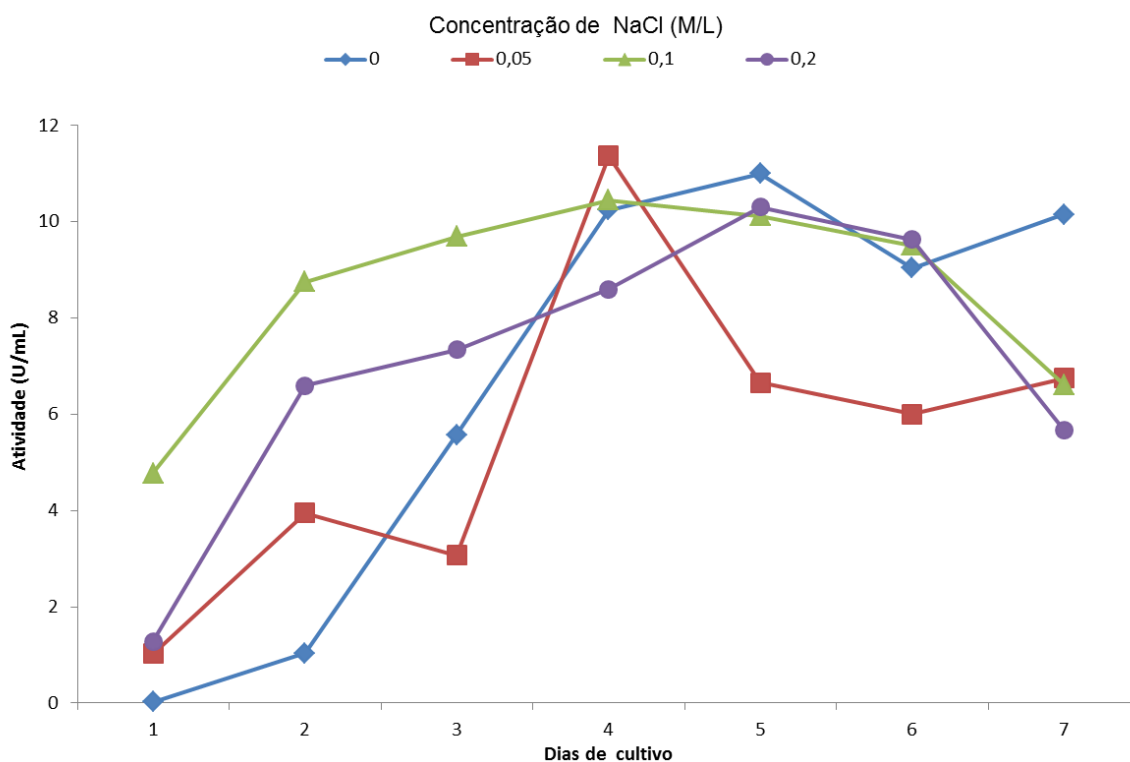


Figura 12. Efeito de NaCl sobre a produção de proteases em *Lysobacter* sp. A03. Ensaio enzimático realizado sobre o substrato azocaseína a 40°C, pH 8,0. Resultados são a média de duas repetições. ICTA-UFRGS, 2011.

5.6.4. Efeito de diferentes sais sobre a atividade enzimática

Substâncias como íons metálicos, são conhecidas por exercer efeitos variados sobre a atividade de proteases. Entre as quatro substâncias testadas, somente o íon Cu^{2+} exerceu ação inibitória sobre as proteases dos três isolados, reduzindo em 25%, 18% e 25% a atividade enzimática dos isolados A03, A08 e A17U, respectivamente. Os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} provocaram o aumento na atividade enzimática das três linhagens entre 110% para o íon Mg^{2+} e até 368% para o íon Fe^{2+} (Tabela 5).

A presença de cátions, como o Ca^{2+} , no meio reacional, tem sido relacionada à proteção das enzimas contra a desnaturação térmica, autólise e à uma maior estabilização da estrutura terciária em metaloproteases (KUMAR & TAKAGI, 1999).

Tabela 5. Efeito de sais sobre a atividade proteolítica em azocaseína das enzimas do sobrenadante bruto produzido pelos isolados antárticos. Resultados são a média de duas repetições. ICTA-UFRGS 2011.

Substância	Concentração	A03	A08	A17U
Controle	-	100%	100%	100%
CaCl_2	5mM	120%	152%	127%
MgSO_4	5mM	110%	121%	110%
FeSO_4	5mM	341%	368%	331%
CuSO_4	5mM	25%	18%	25%

5.6.5. Efeito de Detergentes sobre a Atividade Enzimática

O efeito de surfactantes sobre a atividade enzimática dos três isolados está representado na Tabela 6. Os detergentes não iônicos Triton X-100 e Tween-20 levaram a redução da atividade proteolítica nas linhagens *Lysobacter* sp. A03 e *Arthrobacter* sp. A08. Pelo contrário, no isolado *Chryseobacterium* sp. A17U, Tween-20 levou a um aumento de 62% na atividade proteolítica.

O detergente iônico SDS foi responsável pelo aumento de até 649% na

atividade enzimática para o isolado *Lysobacter* sp. A03. Aumentos menores, mas também muito expressivos, de 228 e 323% foram observados para *Arthrobacter* A08 e *Chryseobacterium* A17U, respectivamente.

Tabela 6. Efeito de detergentes sobre a atividade proteolítica das enzimas do sobrenadante bruto produzido pelos isolados antárticos sobre o substrato azocaseína. Resultados são a média de duas repetições. ICTA-UFRGS 2011.

Substância	Concentração	A03	A08	A17U
Controle	-	100%	100%	100%
Triton X-100	0,1%	77%	71%	71%
Tween 20	1,0%	75%	86%	162%
SDS	1,0%	649%	228%	323%

Apesar do efeito inibitório no crescimento bacteriano causado por surfactantes, como no estudo de Chen *et al.* (2000), onde demonstrou-se que Triton X-100 em concentrações de até 0,024 mM inibiu a taxa de crescimento de *Mycobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp., vários outros trabalhos relatam uma acentuação na atividade proteolítica dos extratos de cultivo brutos e das enzimas parcialmente purificadas. Por exemplo, a enzima queratinolítica *Ker 1*, isolada de *Bacillus pumilus*, mostrou-se altamente estável quando incubada com detergentes não iônicos assim como demonstrou ser relativamente estável na presença de SDS (ZOUARI, *et al.*, 2010). De forma semelhante, a linhagem KS12, pertencente à mesma espécie, produtora de uma queratinase de 45 kDa, teve a sua atividade enzimática aumentada em até duas vezes por detergentes como Triton X-100, SDS e Tween-80 (RAJPUT, *et al.*, 2010).

Surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de diminuir a tensão superficial através do seu acúmulo na interface de fluídos imiscíveis, levando ao aumento da solubilidade, motilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação de compostos hidrofóbicos ou insolúveis (SINGH *et al.*, 2007). Dessa forma, um possível mecanismo que levaria ao aumento da atividade proteolítica pela ação de surfactantes seria através do aumento da biodisponibilidade do substrato, devido à diminuição da tensão superficial e

consequente aumento da sua área de contato para atuação das enzimas (VOLKERING *et al.*, 1995).

5.6.6. Efeito de inibidores de proteases sobre a atividade enzimática

A atividade enzimática do extrato bruto das três bactérias foi avaliada na presença de diferentes substâncias a fim de caracterizá-las quanto à natureza do seu sítio catalítico (Tabela 7).

O sobrenadante enzimático de *Lysobacter* sp. A03 foi inibido em 77 % na presença de PMSF, e em menor grau pela adição de EDTA. No entanto, o inibidor específico de metaloproteases 1,10-fenantrolina praticamente não interferiu na ação enzimática, o que sugere a presença de serino proteases que requerem íons metálicos no meio, os quais são quelados pelo EDTA. Já a adição do inibidor de aspártico proteases pepstatina A na concentração de 5 μ M e dos solventes orgânicos acetonitrila e isopropanol, ambos na concentração de 1% (v/v), induziram o aumento da atividade enzimática em até 23%.

A linhagem 16 de *Streptomyces* sp. foi reportada como produtora de quatro queratinases, todas as quais foram significativamente inibidas por PMSF a 1 mM, indicando tratarem-se de serino proteases. Contudo, três dessas enzimas também foram fortemente inibidas por EDTA a 1 mM, sugerindo tratarem-se de catalizadores relacionados a íons metálicos (XIE *et al.*, 2010).

Suntornsuk *et al.* (2005) obtiveram resultados semelhantes com uma linhagem termotolerante de *Bacillus licheniformis* produtora de uma queratinase cuja atividade foi significativamente inibida por PMSF e parcialmente por EDTA, possuindo, no entanto, afinidade por íons metálicos, sugerindo tratar-se de uma serino protease.

A linhagem *Arthrobacter* sp. A08 teve a atividade enzimática do seu sobrenadante bruto consideravelmente inibido por EDTA (64%) e em menor grau por PMSF (25%). Considerando que 1,10-fenantrolina também inibiu a ação proteolítica, em 18%, é possível a produção de pelo menos uma metaloprotease extracelular pelo isolado, não descartando-se também a presença de serino proteases.

De forma similar, *Chryseobacterium* sp. A17U mostrou-se produtor de metaloproteases, pois a atividade enzimática do seu sobrenadante bruto foi inibida fortemente pela adição de EDTA (82%) e de 1,10-fenantrolina (25%). A incubação com PMSF reduziu a sua atividade em um pouco mais de 25%, indicando a presença também de serino proteases no sobrenadante do cultivo bacteriano. Por outro lado, a adição do inibidor de aspártico proteases pepstatina A (5 μ M) não provocou efeitos significativos em nenhum dos dois extratos enzimáticos.

Tabela 7. Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica das enzimas do sobrenadante bruto produzido pelos isolados antárticos sobre o substrato azocaseína. Resultados são a média de duas repetições. ICTA-UFRGS 2011.

Inibidor	Concentração	A03	A08	A17U
Controle	-	100%	100%	100%
PMSF	1mM	23%	75%	73%
EDTA	1mM	55%	36%	18%
1,10-Fenantrolina	1mM	95%	82%	75%
Pepstatina A	5 μ M	89%	106%	100%
Isopropanol	0,01	117%	92%	92%
Acetonitrila	0,01	123%	99%	89%

Brandelli (2008) destaca que a maioria das queratinases bacterianas pertence ao grupo das serino proteases, mas dados acerca de metaloproteases, principalmente produzidas por bactérias Gram-negativas, têm se tornado disponíveis. Recentemente, uma queratinase de *Microbacterium* sp. foi purificada. A enzima foi totalmente inibida por EDTA e por 1,10-fenantrolina, ambos na concentração de 5 mM, sendo caracterizada como uma metaloprotease de aproximadamente 42 kDa (THYS & BRANDELLI, 2006). Trabalhando com a linhagem de *Bacillus subtilis* MTCC (9102), Balaji *et al.* (2008) purificaram uma metaloprotease de massa molecular entre 64 e 69 kDa com uma grande capacidade de degradar o meio farinha de chifres, com potencial para a bioconversão de resíduos queratinosos derivados de atividades industriais.

5.7. Zimogramas

Os zimogramas dos extratos brutos enzimáticos das três bactérias cultivadas em caldo farinha de penas, nas condições ótimas determinadas, estão apresentados nas figuras 13, 14 e 15 representando o resultado de, no mínimo, três repetições.

O isolado *Lysobacter* sp. A03 produziu nove zonas claras, indicativas de proteólise no gel copolimerizado com gelatina (Figura 13). Na incubação por aproximadamente 12 horas com o inibidor PMSF (10 mM) foi verificado o desaparecimento de uma banda relativamente forte de atividade proteolítica e outra de massa molecular um pouco inferior, que podem corresponder a inibição observada nos ensaios enzimáticos. Similarmente, no gel incubado com EDTA (10 mM), as mesmas duas bandas desapareceram, o que corrobora a natureza de serino protease com requisição de íons metálicos também observado através dos ensaios enzimáticos neste trabalho e por trabalhos como o de Suntornsuk *et al.* (2005) e de Xie *et al.* (2010).

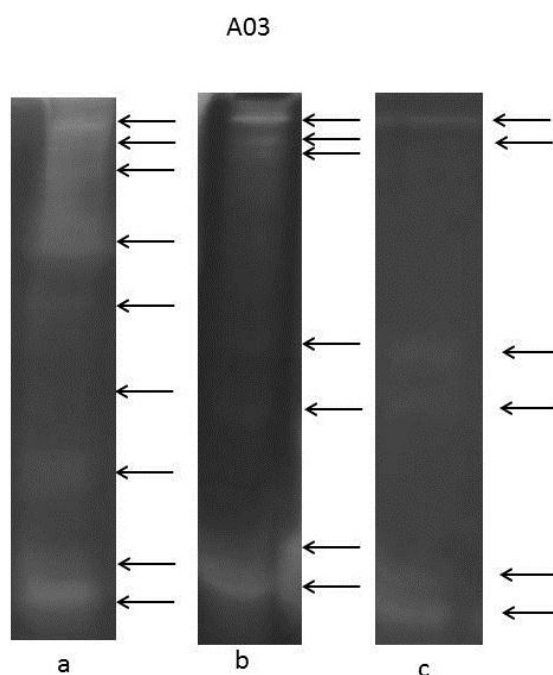


Figura 13. Zimogramas das proteases brutas produzidas por *Lysobacter* sp. A03 no tempo ótimo de cultivo em CFP a 20°C. Controle (a), PMSF 1mM (b) e EDTA 1mM (c). ICTA-UFRGS, 2011.

Bressolier e colaboradores (1999) ao estudarem o potencial queratinolítico de *Streptomyces albidoflavus* K₁₋₀₂ observaram que a linhagem secretou pelo menos seis proteases extracelulares quando cultivada em meio farinha de penas. Quatro dessas enzimas foram inibidas na presença de EDTA (10 mM) e nenhuma atividade residual foi observada na presença de PMSF, tanto na concentração de 1 quanto 10 mM. A principal enzima foi identificada com sendo uma serino protease de 18 kDa que exibiu 37% da atividade queratinolítica total identificada no sobrenadante bruto.

Para a linhagem *Arthrobacter* sp. A08 foi possível a identificação de uma única banda proteolítica, a qual foi parcialmente inibida pela adição de PMSF e totalmente inibida pela incubação com EDTA, resultado em concordância com aquele obtido nos ensaios enzimáticos com inibidores, sugerindo a presença de uma metaloprotease no sobrenadante bruto da bactéria (Figura 14).

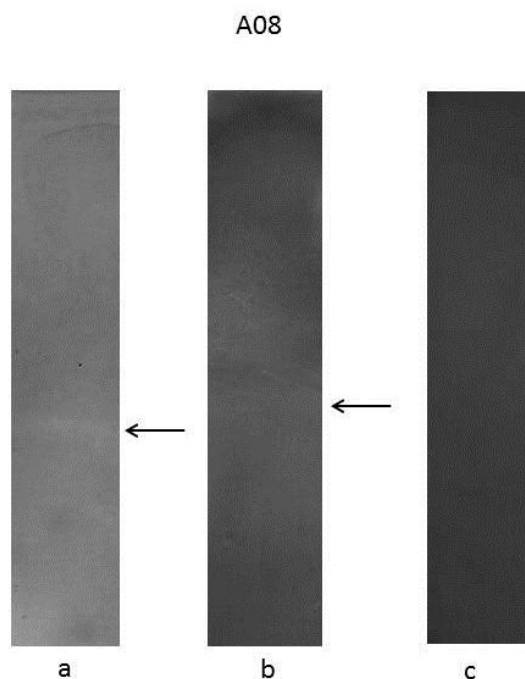


Figura 14. Zimogramas das proteases brutas produzidas por *Arthrobacter* sp. A08 no tempo ótimo de cultivo em CFP a 20°C. Controle (a), PMSF 1mM (b) e EDTA 1mM (c). ICTA-UFRGS, 2011.

Para *Chryseobacterium* sp. A17U foram observadas três bandas claras indicativas da ação de proteases, sendo que a atividade enzimática foi inibida somente na incubação com EDTA, situação na qual foi observada a presença de apenas uma das bandas visíveis no controle (Figura 15). Tal resultado é similar àquele observado por Riffel *et al.* (2007) no estudo no qual os autores relataram a produção de uma metaloprotease pela linhagem *Chryseobacterium* sp. kr6, a qual foi purificada e o seu peso molecular determinado em aproximadamente 64 kDa. Silveira *et al.* (2010), relataram a purificação de outra metaloprotease de 20 kDa pela mesma linhagem. Ainda, Riffel *et al.* (2011) reportaram a produção de diversas proteases por esta linhagem quando cultivada em caldo pena e outros meios.

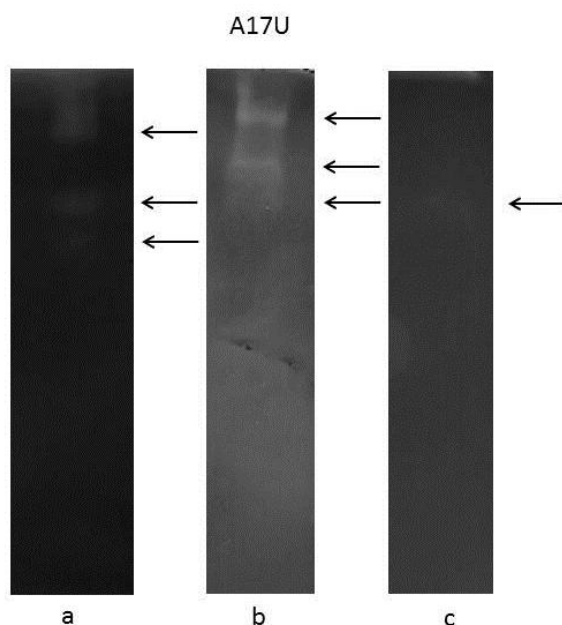


Figura 15. Zimogramas das proteases brutas produzidas por *Chryseobacterium* sp. A17U no tempo ótimo de cultivo em CFP a 20°C. Controle (a), PMSF 1mM (b) e EDTA 1mM (c). ICTA-UFRGS, 2011.

Proteases queratinolíticas, especialmente as do tipo metaloprotease, podem ser de grande utilidade devido à sua facilidade de imobilização em suportes, o que diminui a ocorrência de autólise, facilita a separação dos produtos e permite que a enzima seja reutilizada. Lin e colaboradores (1996) testaram a imobilização covalente da queratinase purificada de *Bacillus licheniformis* PWD-1 em pérolas de vidro. A queratinase imobilizada manteve 40% da sua atividade

depois de 7 dias e foi capaz de hidrolisar tanto caseína quanto queratina.

Em adição, as metaloproteases também apresentam a vantagem de poderem ser inativadas temporariamente através de agentes quelantes durante sua estocagem (BRANDELLI, 2008).

5.8. Inferência filogenética

Dado o maior potencial biotecnológico das proteases produzidas por *Lysobacter* sp. A03, o isolado foi submetido à construção de árvores filogenéticas para estabelecer a sua identidade no nível de espécie. Um total de 1150 pares de bases foram utilizadas para a construção da matriz de dados, juntamente com, no mínimo, uma sequência do gene ribossomal 16S de cada espécie do gênero *Lysobacter*, reconhecidas de acordo com o trabalho de Weon *et al.* (2007).

Como grupo externo, foram utilizadas as sequências de *Thermomonas haemolytica*, *Luteimonas mephitis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudoxanthomonas broeghemensis* e *Xylella fastidiosa*, também de acordo com a revisão de Weon *et al.* (2007).

A reconstrução filogenética revelou que o isolado *Lysobacter* sp. A03 foi recuperado em um ramo com 100% de suporte juntamente com *Lysobacter concretionis*, espécie bacteriana nunca antes descrita como produtora de proteases queratinolíticas (Figura 16).

A distância genética, dada pela distância p entre a linhagem *Lysobacter concretionis* A03 e a linhagem Ko07 da mesma espécie, descrita por BAE *et al.* (2005) foi de $0,014 \pm 0,003$, enquanto a divergência entre as sequências de Ko07 e *Lysobacter brunescens*, uma das espécies mais próximas a ela, também de acordo com a filogenia de BAE *et al.*, foi de 0,056. Adicionalmente, a distância genética total da matriz de dados foi de $0,041 \pm 0,003$. Dessa forma, a distância entre as sequências do rRNA 16S de A03 e Ko07 pode ser considerada dentro daquela devida à divergência intraespecífica das espécies do gênero.

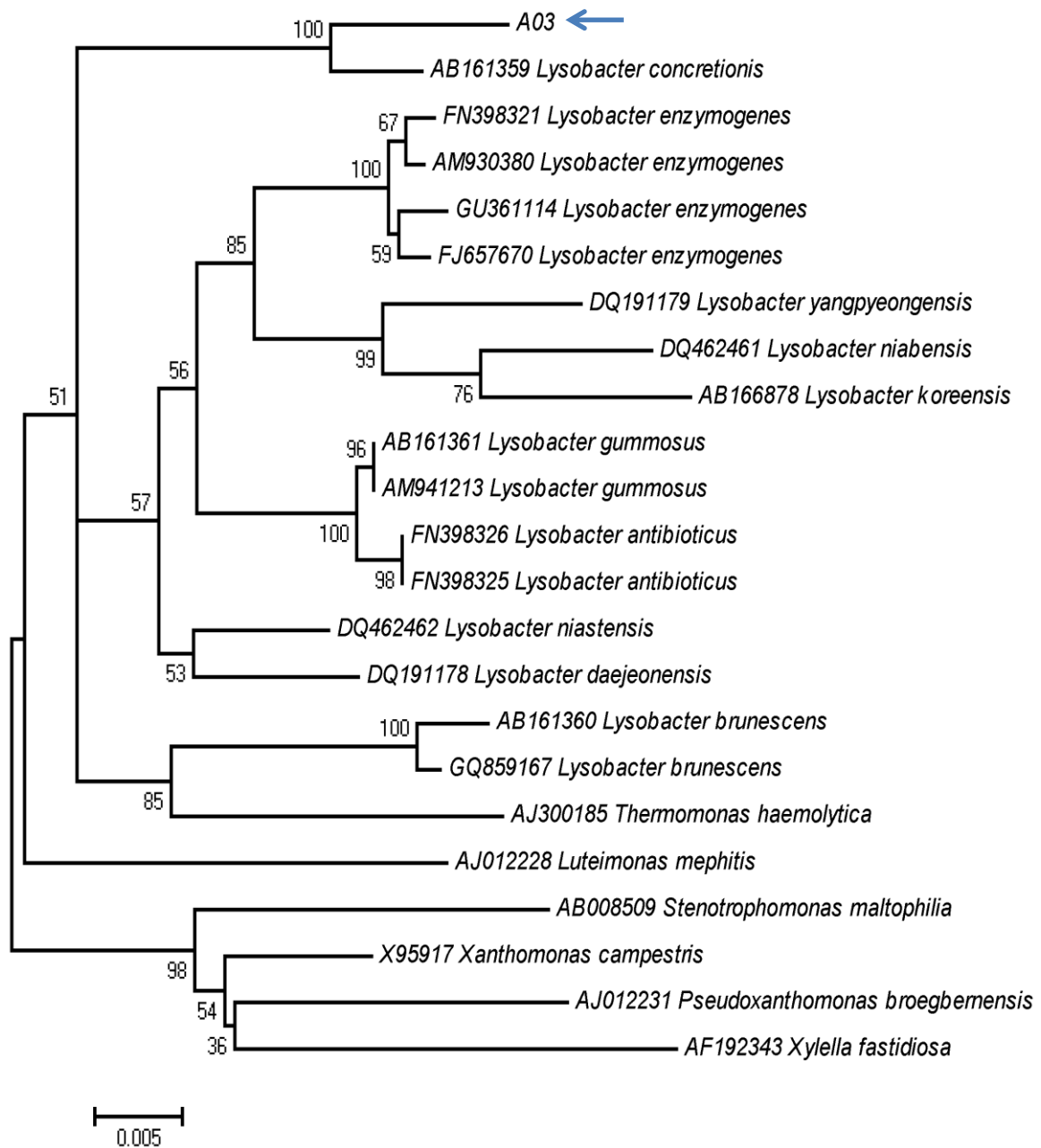


Figura 16. Árvore de Neighbor-joining construída no programa MEGA segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros mostrando as relações filogenéticas da linhagem *Lysobacter* A03 (seta azul) com as espécies reconhecidas para o gênero e outras espécies relacionadas. Os valores nos nós representam 1000 réplicas de *bootstrap*. A barra abaixo indica o número de substituições por posição nucleotídica.

Christensen e Cook (1978) estabeleceram o gênero *Lysobacter*, pertencente à classe Gammaproteobacteria, caracterizando-o como bactérias Gram-negativas não produtoras de corpos de frutificação, cuja movimentação se dá por deslizamento e que possuem um alto conteúdo de G+C. Atualmente, o gênero conta com 10 espécies com nomes válidos, de acordo com Bae *et al.* (2005): *L. enzymogenes* (espécie tipo), *L. antibioticus*, *L. brunescens*, *L. concretionis*, *L. koreensis*, *L. daejeonensis*, *L. yangpyeongensis* e *L. gummosus*, sendo que Weon *et al.* (2007) descreveram mais duas espécies: *L. niabensis* e *L. niastensis* identificadas com base em reconstruções filogenéticas e análises do perfil de ácidos graxos.

Estudos demonstram alta capacidade proteolítica para os isolados do gênero, como o trabalho de Folman *et al.* (2003) no qual foi observada a produção de proteases extracelulares e lipases por *L. enzymogenes*, além de altos níveis de resistência a antibióticos como estreptomicina, canamicina e tetraciclina.

Allpress *et al.* (2002), ao investigarem o potencial proteolítico de uma série de proteases extracelulares bacterianas, observaram que a linhagem de *Lysobacter* NCIMB9497 apresentou uma taxa relativamente alta de atividade queratinolítica, com temperatura ótima de atividade a 50°C.

L. concretionis (BAE *et al.*, 2005) foi isolada pela primeira vez da camada de lodo do reator utilizado no tratamento da água de uma cervejaria, sendo caracterizada morfológicamente como bactérias aeróbicas, com formato de bastões e de coloração amarelo opaco mudando para um tom castanho em períodos de incubação maiores do que três semanas. Os testes quanto à capacidade proteolítica revelaram que a linhagem é capaz de degradar gelatina em 24 horas. As análises filogenéticas, perfil de ácidos graxos e testes bioquímicos comprovaram a sua alocação dentro do gênero como uma nova espécie do gênero *Lysobacter*.

5.9. Purificação parcial das enzimas de *Lysobacter concretionis* A03

O cultivo de 4 dias em CFP a 20 °C do isolado *Lysobacter concretionis* A03 foi centrifugado e submetido a precipitação com sulfato de amônio na

concentração de 60%. Nesta faixa de saturação, a precipitação resultou na recuperação de aproximadamente 94% da atividade proteolítica total presente no extrato bruto. A atividade específica, calculada pela razão entre a atividade proteolítica pela quantidade de proteínas solúveis foi de 4,1 mg mL⁻¹, resultando num fator de purificação de 1,1 vezes no precipitado. (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade proteolítica, queratinolítica e quantidade de proteínas solúveis recuperadas após a precipitação do sobrenadante do cultivo da amostra *Lysobacter concretionis* A03.

Etapa Da Purificação	Atividade proteolítica				
	Atividade Azocaseína U/mL	Proteína Solúvel (mg/mL)	Atividade Azoqueratina U/mL	Atividade Específica U/mg	Fator de Purificação
Extrato bruto	7,34	1,89	3,04	3,88	1
Precipitação	6,935	1,69	2,95	4,1	1,1

O sucesso do processo de precipitação de proteínas depende da otimização de parâmetros como a faixa de saturação a ser utilizada. Para avaliar a melhor quantidade de sulfato de amônio necessária para precipitar uma queratinase produzida pela linhagem 50-3 de *Bacillus* sp., o sobrenadante do cultivo em CFP foi submetido a precipitação com o sal em várias faixas de saturação. Determinou-se que a concentração entre 40-80% de (NH₄)₂SO₄, foi a mais eficiente na recuperação da atividade queratinolítica, com a melhor remoção de proteínas não desejadas, sendo obtido um fator de purificação de 4,9 vezes e uma atividade em azoqueratina de 679 U mL⁻¹. Através da cromatografia por filtração em gel e posterior realização de SDS-PAGE foi possível determinar a massa da enzima em aproximadamente 30 kDa (ZHANG *et al.*, 2009)

Já para uma linhagem degradadora de penas do fungo *Aspergillus oryzae*, a fração precipitada com 75-85% de sulfato de amônio apresentou a maior atividade queratinolítica, com uma purificação de 3,3 vezes, tendo sido purificada posteriormente, uma queratinase de 60 kDa através de técnicas de cromatografia

líquida (FARAG e HASSAN, 2004).

5.9.1. Cromatografia por filtração em gel

A amostra protéica resultante da etapa de concentração com sulfato de amônio foi fracionada e aplicada em colunas para cromatografia por filtração em gel Sephadex G-100, G-200 e G-75. Em cada uma delas, foram coletadas 25 frações de 1 mL cada, eluídas no tampão fosfato dissódico ($0,1 \text{ M mL}^{-1}$, pH 7,0).

No perfil de eluição da cromatografia realizada na coluna G-100 (figura 17) é possível observar que não houve a separação satisfatória das proteínas, uma vez que o pico de absorbância a 280 nm coincidiu com o pico de atividade proteolítica. Além disso, os dois picos foram detectados a partir da terceira fração de 1 mL coletadas da coluna, atestando o fracionamento insatisfatório dos polipeptídeos.

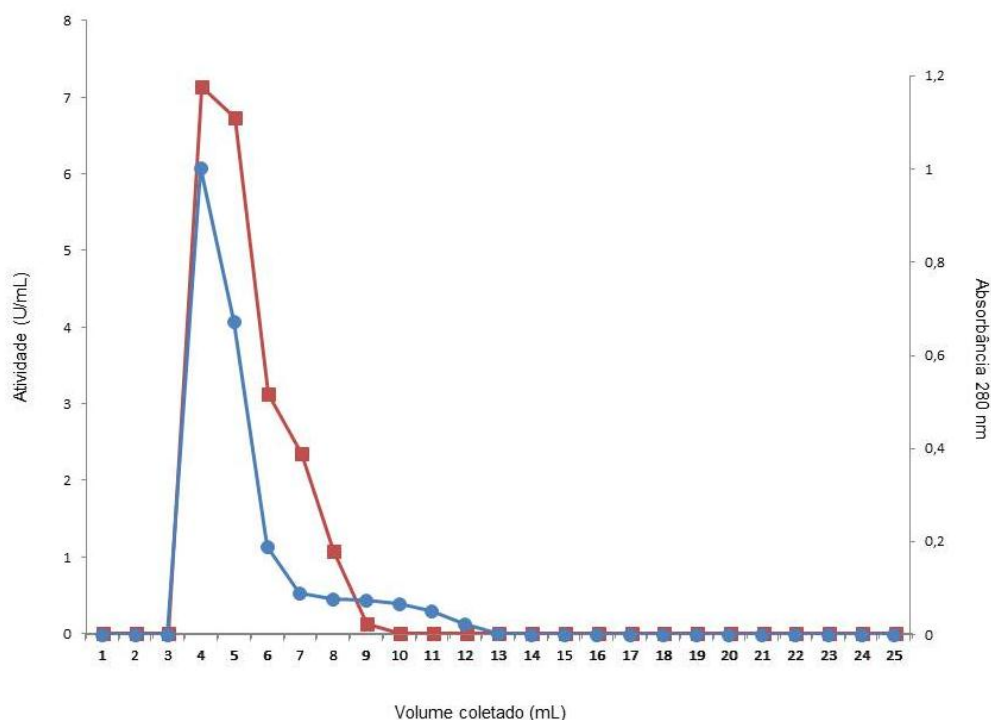


Figura 17. Perfil de eluição em coluna de filtração em gel G-100 de *Lysobacter concretionis* A03: (●) absorbância a 280nm, (■) atividade enzimática em azocaseína (U mL^{-1}). ICTA-UFRGS, 2011.

Na cromatografia realizada na coluna contendo a resina G-200 (figura 18), o resultado foi inverso: houve uma boa separação das proteínas, sendo

observados dois picos bem definidos, o primeiro coincidente com o pico único do perfil de eluição da coluna G-100 e o segundo localizado entre as frações nove e quatorze. No entanto, a atividade enzimática foi muito reduzida, ficando em menos de 1 U/mL, espalhou-se entre as frações quatro e 18, ficando diluída em excesso para a sua utilização nas demais etapas.

Ao purificarem a queratinase de *Bacillus subtilis* MTCC (9102), Balaji *et al.* (2008) obtiveram um fator de purificação de 45 vezes através das cromatografias de gel filtração e troca iônica. A massa molecular da enzima foi determinada como tendo por volta de 64 a 69 kDa. No entanto, essa linhagem é conhecida por produzir grande quantidade de queratinase, de forma que a diluição provocada pela cromatografia não foi um impedimento para a utilização da técnica.

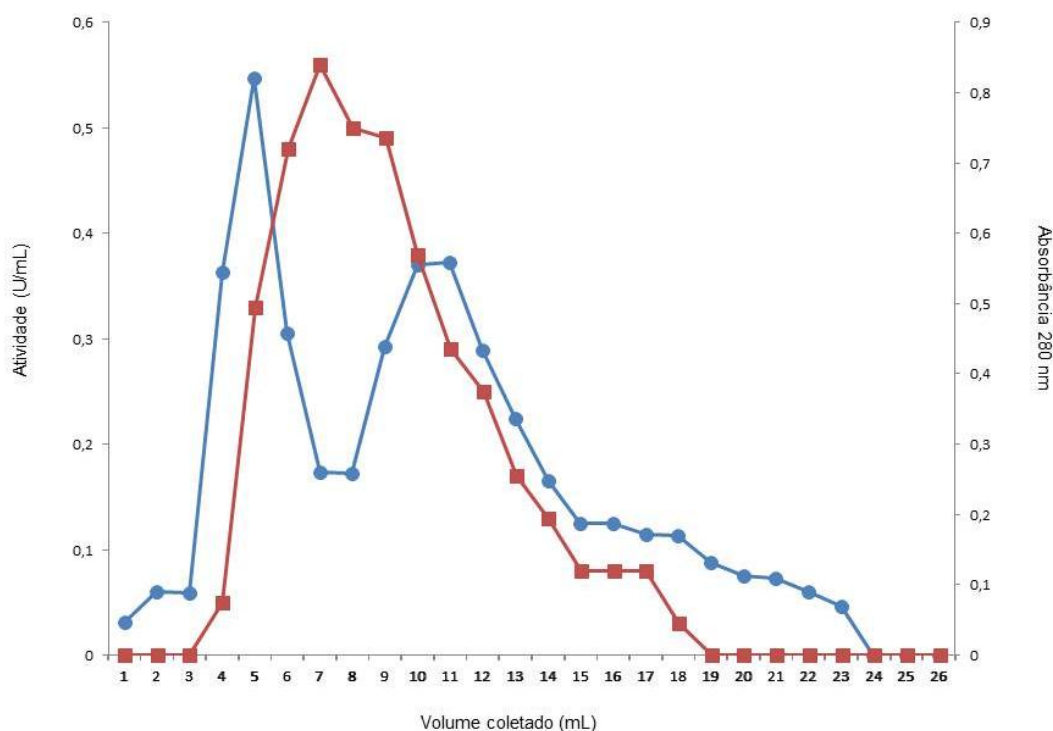


Figura 18. Perfil de eluição em coluna de filtração em gel G-200 de *Lysobacter concretionis* A03: (●) absorvância a 280nm, (■) atividade enzimática em azocaseína (U mL⁻¹). ICTA-UFRGS, 2011.

Por outro lado, na cromatografia realizada na coluna contendo a resina G-75, foi possível aliar uma boa separação das proteínas com uma menor diluição da atividade enzimática, apesar desta também ter sido bastante reduzida, havendo a formação de um pico entre as frações quatro a dez (Figura 19). Dessa

forma, as frações com atividade enzimática da coluna G-75 foram reunidas e utilizadas para a elaboração do gel SDS-PAGE.

Avaliando-se o padrão de eluição das três colunas utilizadas, é possível sugerir que a enzima responsável pela maior parte da atividade proteolítica na linhagem *Lysobacter concretionis* A03 é de elevado peso molecular, pois em todas as diferentes resinas empregadas, a atividade enzimática foi observada aproximadamente entre as frações 3 e 9 a 11. Mas tal confirmação dependeria da utilização de proteínas de peso molecular conhecido, como marcadores para eluição nas colunas. Além disso, o processo de precipitação das proteínas pode levar à formação de agregados protéicos que acabam por ser eluídos logo nas primeiras frações da cromatografia.

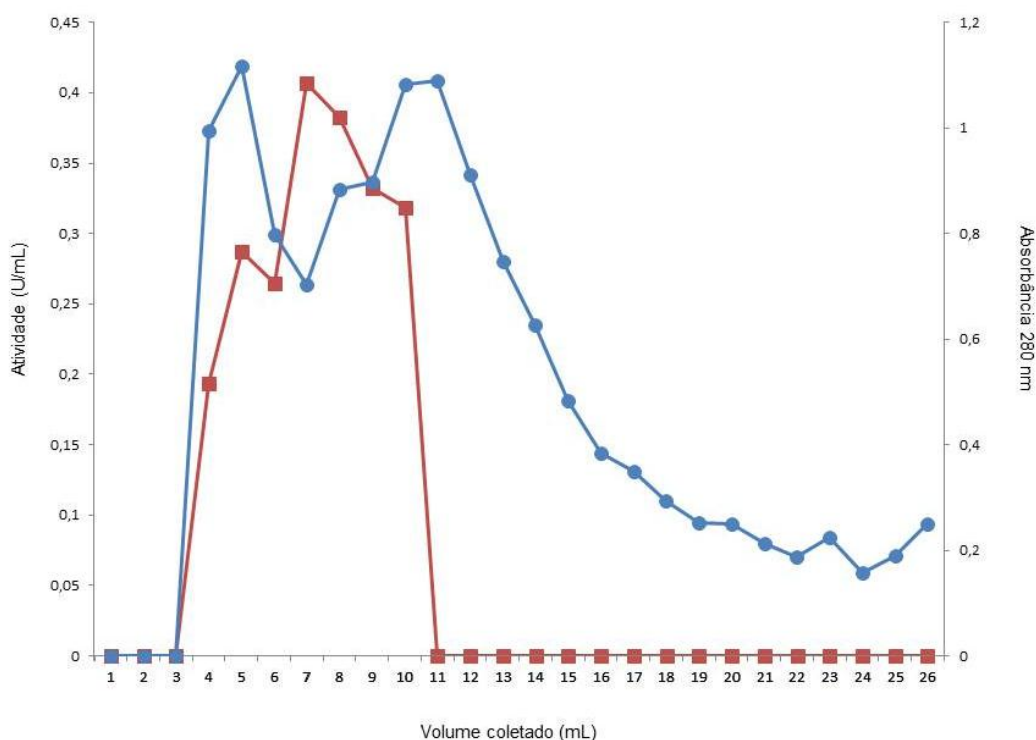


Figura 19. Perfil de eluição em coluna de filtração em gel G-75 de *Lysobacter concretionis* A03: (●) absorvância a 280nm, (■) atividade enzimática em azocaseína ($U mL^{-1}$). ICTA-UFRGS, 2011.

5.9.2. Extração através de Sistema aquoso Bifásico (SAB)

A partição através do sistema aquoso bifásico (SAB) oferece um meio simples e eficiente para a recuperação de produtos em biotecnologia. Seu principal uso tem sido na concentração e separação de proteínas e na bioconversão de enzimas. O SAB se forma quando dois polímeros solúveis em água, ou um polímero e um sal inorgânico, são adicionados à água, levando à separação do sistema em duas fases imiscíveis (RAHIMPOUR & BAHARVAND, 2009).

A fim de avaliar o melhor sistema polímero/sal, foram testados diferentes sais em combinação com PEG. Dos quatro sais experimentados, somente o citrato de sódio e o sulfato de amônio, ambos na concentração de 50% em água, apresentaram uma boa separação visual do PEG, com o polímero na porção superior e o sal na inferior.

A atividade enzimática foi avaliada em ambas as fases, sendo 100% recuperada na fração contendo o PEG para o sulfato de amônio e 74%, também na porção com o polímero, para o citrato de sódio (Tabela 9). As proteínas solúveis foram recuperadas principalmente nas porções contendo os sais também nos dois sistemas avaliados (Tabela 9).

Tabela 9. Atividade proteolítica e quantificação das proteínas solúveis do extrato bruto e das frações originárias do SAB da amostra *Lysobacter concretionis* A03.

	Extrato Bruto	Citrato de Sódio		Sulfato de Amônio	
		PEG	Sal	PEG	Sal
Atividade Proteolítica (U/mL)	6,09	2,45	0,63	3,28	0
Proteína Solúvel (mg/mL)	1,57	0,24	0,41	0,08	0,15

Considerando a atividade enzimática do extrato bruto com 100%, o rendimento da purificação no sistema contendo citrato de sódio foi de 40%, enquanto naquele contendo sulfato de amônio foi de 54%. A atividade queratinolítica na porção superior do sistema sulfato de amônio/ PEG foi a maior, de $1,91 \text{ U mL}^{-1}$, mais do que o dobro daquela observada para o citrato de sódio, que ficou em $0,74 \text{ U mL}^{-1}$. O fator de purificação do sistema contendo citrato de sódio foi de 2,63 vezes, enquanto para o sulfato de amônio foi atingido um valor de 10,57 vezes, sendo este escolhido para a realização do SDS-PAGE (Tabela 10).

Os coeficientes de partição K_c de ambos os sais indicam uma tendência das enzimas em migrar para a porção superior do SAB, onde encontra-se o polímero. Contrariamente, o coeficiente de partição K_p de ambos os sistemas mostram uma tendência da maior parte das demais proteínas a se deslocar para a porção inferior aquosa. Tal fato é extremamente favorável, pois propicia a recuperação das enzimas livres de grande parte dos constituintes indesejáveis (Tabela 10).

Tabela 10. Atividade queratinolítica e específica (em azocaseína), fator de purificação, rendimento e coeficientes de partição do extrato bruto e das frações originárias do SAB da amostra *Lysobacter concretionis* A03.

Sal	Atividade Queratinolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)	K_c	K_p
Extrato bruto	1,84	3,88	1	100	-	-
Citrato de sódio	0,74	10,21	2,63	40	3,89	0,59
Sulfato de amônio	1,91	41	10,57	54	3,28	0,53

Com o objetivo de determinar as condições ótimas para a separação da tripsina de pâncreas bovino da alfa-quimiotripsina, Tubio *et al.* (2009) empregaram o sistema aquoso bifásico misturando PEG de diferentes pesos moleculares com citrato de sódio de diferentes pH. Utilizando-se PEG3550 e citrato de sódio pH

5,2, foi possível a recuperação de 60% da tripsina em uma forma concentrada na fase superior sendo atingido um fator de purificação da enzima de três vezes.

Outro tipo de combinação, contendo PEG e um polissacarídeo microbiológico foi utilizado para a purificação por SAB da lipase extracelular de *Burkholderia pseudomallei*, simultaneamente a etapa de cultivo. O sistema contendo 9,6% de PEG8000 e 1% de Dextran T500 proporcionou as melhores condições para a produção extrativa da enzima, que foi recuperada na fase superior, juntamente com o polímero, com produtividade em torno de 92%, enquanto a biomassa foi acumulada na fase inferior (OOI *et al.*, 2011).

Outras substâncias adicionadas ao sistema, como o sal NaCl, também podem interferir no particionamento por SAB. Para a purificação das enzimas pectinolíticas *endo-PG*, *exo-PG*, PL PE, foi utilizado o sistema aquoso bifásico PEG/fosfato de potássio com a adição de 6% de NaCl. Foi observado que para três enzimas, o sal teve efeito redutor sobre o coeficiente de partição, com exceção de *exo-PG*, onde o maior coeficiente foi atingido com a adição de NaCl (LIMA *et al.*, 2002).

5.9.3. Extração através de Partição em Três Fases

O particionamento em três fases (TPP) em misturas aquosas com butanol pode ser utilizado para o fracionamento e concentração de proteínas, sendo um método relativamente recente. O butanol é miscível em água, mas pode ser induzido a formar uma fase separada através da adição de sal. Na presença de proteínas, pode-se formar uma terceira fase, intermediária entre o butanol e a aquosa, que consiste em polipeptídeos concentrados e desidratados (PIKE & DENNISON, 1987).

O método foi avaliado utilizando-se a fração precipitada com 60% de sulfato de amônio em mistura com meio volume de n-butanol. Após a separação das fases, a atividade enzimática tanto em azocaseína quanto em azoqueratina, foi detectada majoritariamente na fração inferior aquosa. Os coeficientes de partição $K_c=0,056$ e $K_p=0,086$ indicam uma tendência das proteínas a migrarem para a porção inferior aquosa, enquanto a porção lipofílica da mistura tende a

migrar para a porção superior, onde está o álcool. Tal situação pode comprometer a purificação das enzimas pois, apesar de uma grande quantidade de impurezas terem sido retidas na fase intermediária formada, quase a totalidade das proteínas foi recuperada na mesma fase onde verificou-se a maior atividade enzimática.

O fator de purificação da porção inferior foi de 1,1 vezes, ou seja, cerca de 90% inferior àquele obtido no SAB PEG/Sulfato de amônio. No entanto, foi possível a recuperação de aproximadamente 82% da atividade proteolítica do precipitado, representando um rendimento 28% maior do que o obtido na extração por SAB com o melhor sal. Além disso, a atividade queratinolítica na fração inferior do TPP foi 46,5% maior do que aquela obtida no SAB com o sal Sulfato de Amônio (Tabela 11).

Tabela 11. Atividades enzimáticas, proteína solúvel, fator de purificação e atividade específica (em azocaseína) do precipitado e das frações originárias do TPP da amostra *Lysobacter concretionis* A03.

	Atividade Azocaseína (U/mL)	Atividade Azoqueratina (U/mL)	Proteína Solúvel (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação
Precipitado	6,94	0,995	1,810	3,830	1
Fração superior	0,3192	0	0,119	2,68	0,7
Fração inferior	5,71	3,57	1,380	4,14	1,1

Com o objetivo de purificar um inibidor de proteases/amilases de germe de trigo, Sharma & Gupta (2001B) utilizaram a técnica de TPP. As melhores condições especificadas para esta finalidade foram uma mistura de 1:1 de t-butanol e extrato bruto, 30 % de sulfato de amônio (m/v) e temperatura de 20 °C, nas quais foi recuperada 85 % de atividade com um fator de purificação de 25 vezes.

A inulinase de *Aspergillus niger* foi submetida à purificação através de TPP. As condições ótimas encontradas foram uma relação de 1: 0,5 v/v de t-butanol para o extrato bruto, 30% de sulfato de amônio, pH 4 e temperatura de 25 °C,

sendo possível a recuperação de 88% da sua atividade com um fator de purificação de 10,2 vezes KUMAR *et al.*, 2011).

5.10. SDS-PAGE

A Figura 20 mostra os resultados obtidos nas diferentes abordagens de purificação utilizadas para as enzimas de *Lysobacter concretionis* A03. Não foi possível a detecção de bandas no gel SDS-PAGE das purificações realizadas através de cromatografia líquida e SAB, provavelmente devido ao excesso de diluição das enzimas nos processos de filtração e diálise do PEG, de forma que nem mesmo a concentração através da precipitação com TCA 10% em acetona foi satisfatória para essa finalidade. Foi possível observar que na etapa de precipitação com 60% de sulfato de amônio ocorreu uma grande concentração das proteínas em relação ao extrato bruto.

Por outro lado, a purificação através da TPP foi o método mais eficiente, apesar de não ter sido possível a purificação de uma única banda de proteína. Porém, a maior parte da atividade queratinolítica foi conservada, com a visualização de cinco bandas na eletroforese desnaturante de aproximadamente 70, 65, 50, 40 e 30 kDa.

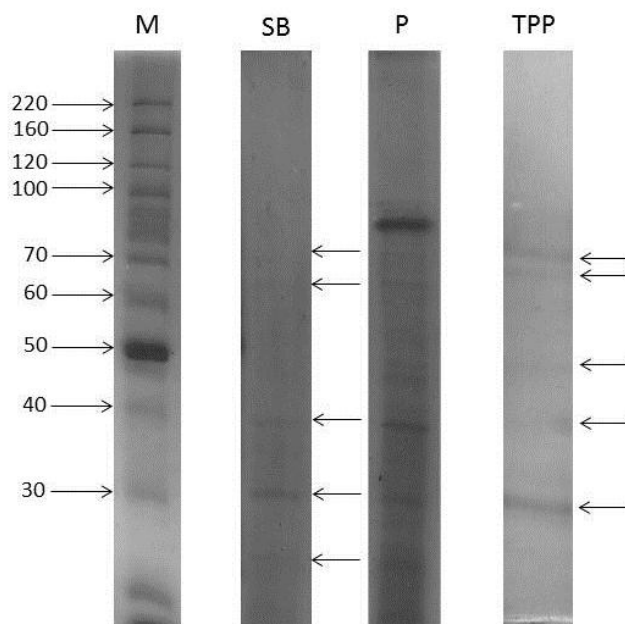


Figura 20. SDS-PAGE do extrato bruto (SB) precipitado com sulfato de amônio (P) e purificação por partição em três fases (TPP) de *Lysobacter concretionis* A03. M: marcador de peso molecular. ICTA-UFRGS, 2011.

A massa molecular das queratinases é bastante diverso, podendo variar entre menos de 20 até 240 kDa; no entanto, a maioria é monomérica e possui menos de 50 kDa, sendo que as de maior massa estão geralmente classificadas como metaloproteases ou pertencentes a micro-organismos termófilos (BRANDELLI *et al.*, 2010). Uma queratinase de aproximadamente 66 kDa foi purificada a partir do sobrenadante do cultivo em penas do isolado *Bacillus* sp. JB 99. A enzima foi identificada como uma serino protease monomérica, sendo completamente inibida por PMSF; sua atividade foi estimulada pela presença dos íons metálicos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} e Ba^{2+} e seu pH e temperatura ótimos foram de 10 e 65 °C, respectivamente (KAINOOR & NAIK, 2010). Já para *Bacillus subtilis* MTCC (9102), uma metaloprotease queratinolítica de peso molecular entre 64 e 69 kDa foi purificada. Sua atividade máxima foi atingida sob pH 6,0 e temperatura de 40°C (BALAJI *et al.*, 2008).

A necessidade de purificação de uma enzima depende da sua finalidade: enquanto aquelas utilizadas na área médica e na pesquisa necessitam de um alto grau de pureza, enzimas de emprego industrial não tem esse requerimento, de forma que muitas vezes o próprio extrato bruto do cultivo microbiano pode ser utilizado (RAO *et al.*, 1998).

Em relação à elaboração de rações animais através da degradação dos resíduos queratinosos promovida por micro-organismos, a biomassa formada pelo seu crescimento pode servir como meio de enriquecimento do hidrolisado, adicionando aminoácidos pouco encontrados, como metionina e fenilalanina, frutos do metabolismo microbiano (NAM *et al.*, 2002). Além disso, muitos trabalhos relatam uma maior degradação da queratina pelo extrato bruto do cultivo. Esse fato pode ser devido a constituintes do cultivo requeridos pelas queratinases ou à ação conjunta dessas enzimas com outras proteases generalistas, que podem atuar sobre o substrato, após o ataque inicial queratinolítico que leva à quebra das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína da queratina (BRANDELLI *et al.*, 2010).

5.11. Determinação das condições ótimas de queratinólise

Para determinar a temperatura e pH ótimos de ação da(s) queratinase(s) de *Lysobacter concretionis* A03, foram realizados ensaios com o substrato azoqueratina com o produto da purificação parcial. O gráfico apresentado na figura 21 mostra que o ótimo de temperatura de atividade queratinolítica manteve-se próximo ao determinado nos ensaios em azocaseína, em torno de 45°C. De forma similar, o pH ótimo também situou-se acima de 7,0, com a atividade queratinolítica aumentando com a elevação do pH, mantendo-se estável até o pH 10 (Figura 22).

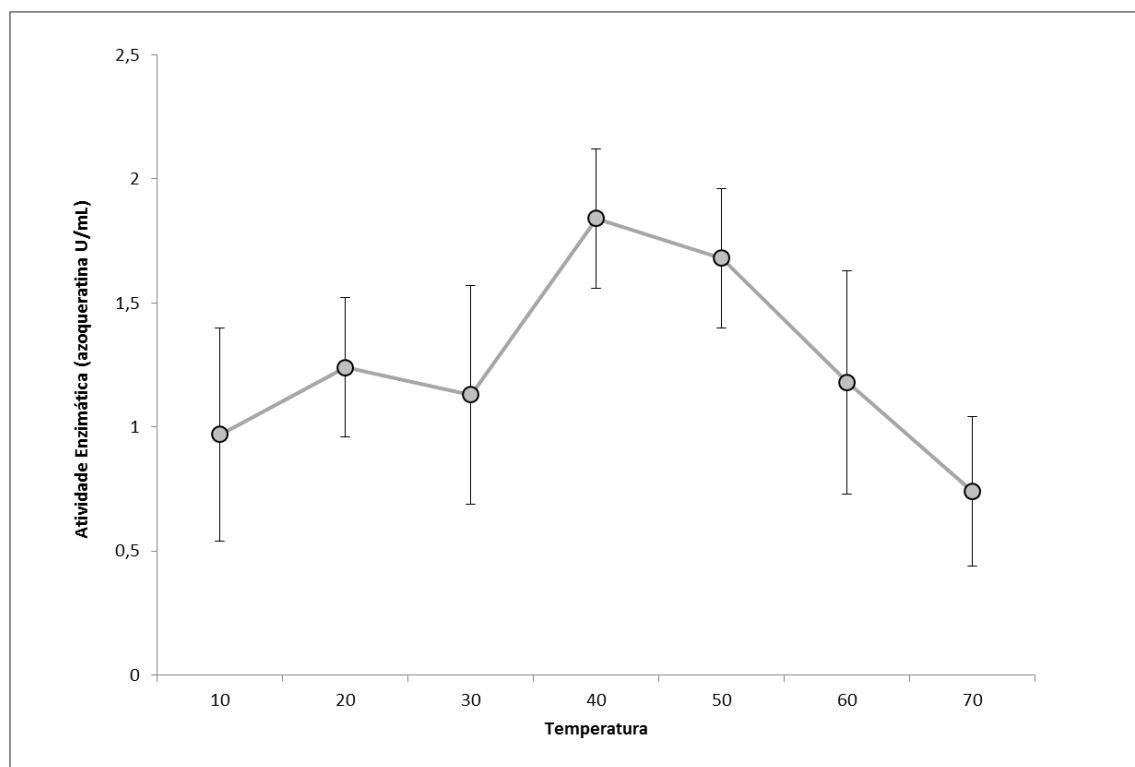


Figura 21. Efeito da temperatura sobre a atividade queratinolítica em azoqueratina de *Lysobacter concretionis* A03. ICTA-UFRGS, 2011.

Micro-organismos alcalofílicos crescem vigorosamente sob pH 9 a 11 e requerem Na^+ para seu crescimento; por exemplo, esse íon é essencial para o transporte efetivo de solutos através da membrana de linhagens alcalofílicas de *Bacillus* sp. (HORIKOSHI, 1999). Sendo assim, a melhor resposta da linhagem

Lysobacter concretionis A03 quando incubada em meio contendo NaCl pode dever-se a sua característica de afinidade por meios alcalinos.

Proteases queratinolíticas alcalofílicas são de grande interesse comercial, uma vez que a degradação da queratina é facilitada em pH elevado, provavelmente porque essa condição favorece a ação de redutases sobre as pontes dissulfeto (YAMAMURA *et al.*, 2002). Além do já descrito emprego na indústria avícola, as queratinases alcalofílicas podem ser úteis no processo de depilação de couros. A linhagem S14 de *Bacillus subtilis* mostrou ser produtora de uma queratinase, denominada *KerS14*, com ótimo de pH entre 8,0 e 9,0 com potencial aplicação para a depilação de couros sem afetar a sua qualidade, devido à sua ausência de atividade na degradação de colágeno (MACEDO *et al.*, 2008).

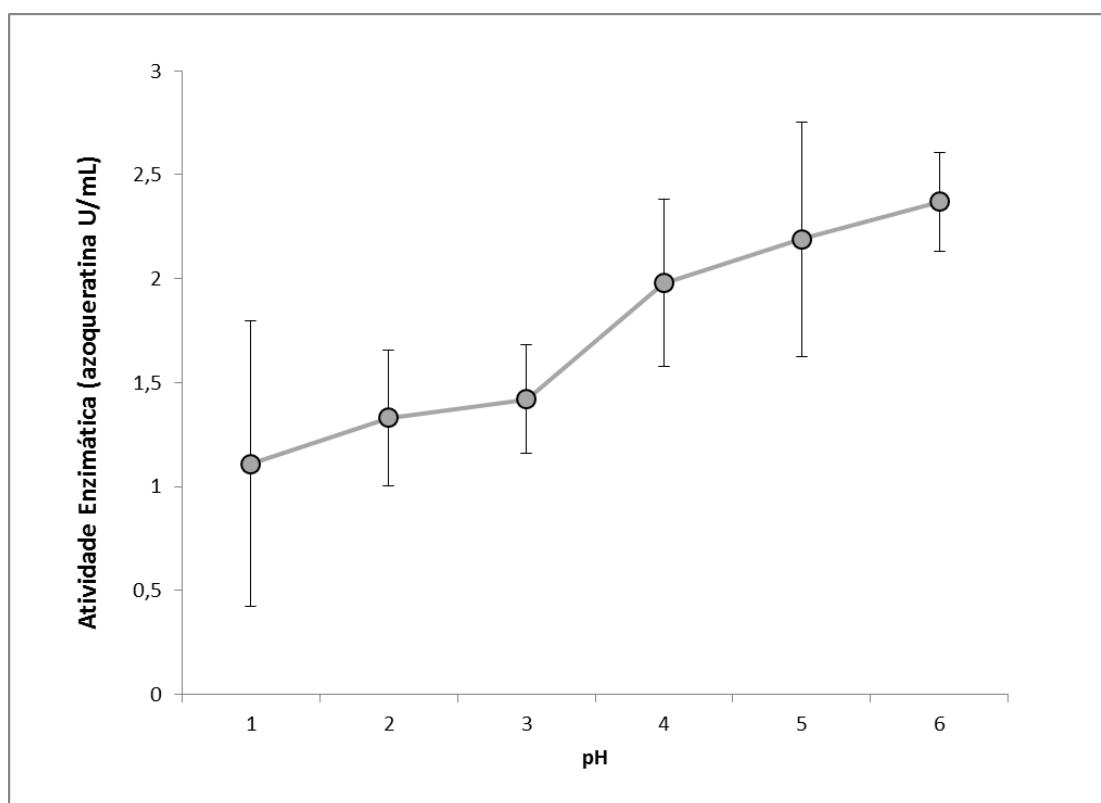


Figura 22. Efeito do pH sobre a atividade queratinolítica de *Lysobacter concretionis* A03. ICTA-UFRGS, 2011.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica das enzimas de *Lysobacter concretionis* A03 foi determinada (Figura 23). Sob a temperatura de 37 °C houve a manutenção de aproximadamente 72% da atividade enzimática inicial mesmo após duas horas de incubação. Já na temperatura de 55 °C, a proteólise sofreu uma redução de 66% logo nos primeiros 20 minutos de incubação. Após duas horas a 55 °C, 78% da atividade inicial havia sido perdida. A temperatura de 70 °C, quase 83% da atividade enzimática foi inibida em 5 minutos de incubação. Depois de duas horas, foi detectada menos de 5% da atividade enzimática inicial.

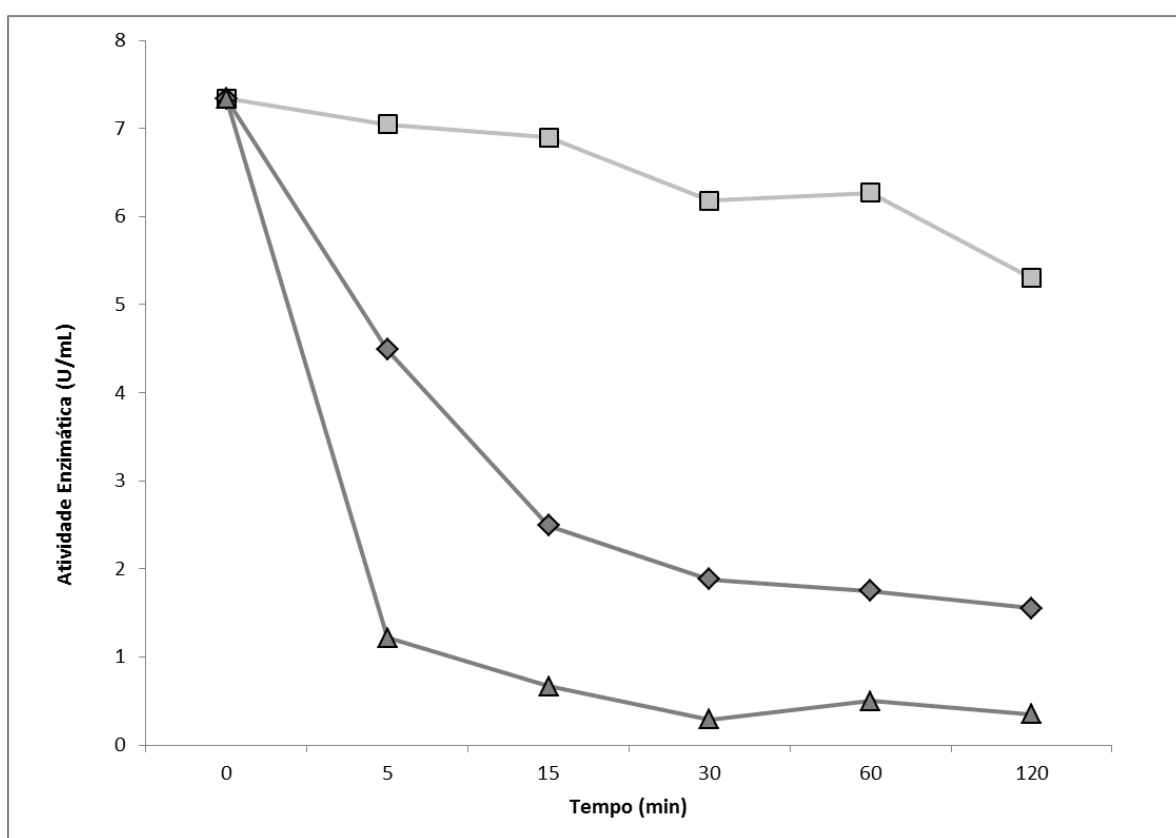


Figura 23. Estabilidade térmica do extrato bruto de *Lysobacter concretionis* A03 nas temperaturas de 37°C (■), 55°C (◆) e 70°C (▼) ao longo de 120 minutos de incubação. ICTA-UFRGS, 2011.

A termolabilidade pode ser uma característica favorável para o controle da atividade enzimática em processos industriais, pois permite que as enzimas sejam facilmente inativadas após sua ação. Visto que grande parte da atividade

enzimática de *Lysobacter concretionis* A03 é inibida a 37°C, bastante superior a sua temperatura ótima de cultivo e próxima da sua temperatura ótima de atividade enzimática, pode-se utilizar tal característica para o manejo dos cultivos, regulando-se a atividade catalítica e crescimento populacional conforme o necessário.

Adicionalmente, graças à sua inativação sob temperaturas não muito elevadas, seu uso em alimentos pode ser feito sem o emprego de altas temperaturas que podem interferir nas propriedades nutricionais e organolépticas, também diminuindo o *input* de energia necessário para atingir esse objetivo.

6. Considerações finais

A Antártida é um continente de extremos. Nela, são registradas as temperaturas mais baixas, os menores índices pluviométricos, os ventos mais fortes e os maiores índices de radiação ultravioleta da Terra. Neste habitat, milhões de anos de evolução moldaram formas de vida com adaptações surpreendentes, que vão desde peixes produtores de glicoproteínas anticongelamento até bactérias pigmentadas tolerantes à radiação UV.

Apesar de condições severas do ponto de vista antropocêntrico, a região polar abriga uma vasta biodiversidade ainda inexplorada, e a bioprospecção de micro-organismos antárticos tem demonstrado um grande potencial para o seu emprego biotecnológico, principalmente no que se refere a duas substâncias: os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, da sigla em inglês) e as enzimas adaptadas ao frio.

Entre as enzimas, as queratinases, capazes de degradar os resíduos queratinosos, tem ganhado destaque nas últimas décadas, de forma que vários trabalhos visando o isolamento de micro-organismos produtores dessas proteases têm sido realizados. A maioria deles, contudo, tem tido sucesso no isolamento principalmente de bactérias termófilas e mesófilas com grande capacidade queratinolítica. Ainda assim, existe uma lacuna no conhecimento sobre bactérias com essa propriedade que tenham características de tolerância ou afinidade ao frio.

Neste estudo, três bactérias isoladas do ambiente Antártico foram capazes de degradar resíduos queratinosos, preferencialmente farinha de penas, em temperaturas na faixa dos micro-organismos psicrotolerantes.

A identificação molecular e análise filogenética identificaram as bactérias como *Lysobacter concretionis* (A03), *Arthrobacter* sp. (A08) e *Chryseobacterium* sp. (A17U), sendo que para a espécie de *L. concretionis* não existem relatos de atividade queratinolítica e para o gênero *Arthrobacter* sp. há somente um estudo reportando a uma linhagem como degradadora de penas.

O meio caldo farinha de penas foi o substrato preferencial para o cultivo das três bactérias, que atingiram o seu ótimo de crescimento e atividade

proteolítica a 20 °C, dentro da faixa dos micro-organismos psicrotolerantes. A alcalinização do meio, os ensaios em azocaseína, azoqueratina e a liberação de proteínas solúveis corroboraram a capacidade queratinolítica de todos os isolados.

Devido à maior capacidade queratinolítica da linhagem *Lysobacter concretionis* A03, esta foi escolhida para as análises subsequentes e para a etapa de purificação, na qual três métodos diferentes foram avaliados, visando otimizar o processo de purificação enzimática, aumentando a sua rapidez e rendimento.

Dentre os três métodos de purificação testados, a partição em três fases (TPP) foi a mais efetiva no isolamento das proteases de *Lysobacter concretionis* com um rendimento satisfatório e temporalmente eficiente, ao contrário do método de cromatografia, no qual a demanda de tempo e diluição das proteases foi excessiva, e ao método de extração por partição em duas fases (SAB), que, apesar de rápido, também levou à excessiva diluição das enzimas devido à necessidade de diálise para a retirada do polietilenoglicol. Portanto, o emprego da TPP pode ser uma boa alternativa, quando houver a necessidade de purificação parcial dessas proteases, devendo-se ajustar os parâmetros como a concentração de sulfato de amônio e quantidade de butanol, para que seja possível a melhora na purificação parcial das queratinases da bactéria.

Lysobacter concretionis A03 mostrou-se halotolerante, crescendo e produzindo proteases até a concentração de 0,5 M de NaCl, psicrotolerante, com ótimo de crescimento a 20 °C e produtora de pelo menos nove enzimas, com características de serino proteases com requisição de íons metálicos, assim como de metaloproteases, de acordo com os zimogramas realizados.

Considerando a ausência de relatos de patogenicidade das espécies de *Lysobacter* sp. para animais e o melhor desempenho sob temperaturas reduzidas do sobrenadante bruto do cultivo em meios queratinosos, a linhagem *Lysobacter concretionis* A03 configura-se numa alternativa viável para a hidrólise de resíduos de penas gerados pela indústria avícola com a redução dos gastos energéticos.

7. Referências Bibliográficas

AISLABIE, J.M. *et al.* Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica, *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, p.3041-3056, 2006.

ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G. & GOWLAND, P. C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. *Letters in Applied Microbiology*, n. 34, p.337-42, 2002.

BAE, H-S.; IM, W-T. & LEE, S-T. *Lysobacter concretionis* sp. nov., isolated from anaerobic granules in a upflow anaerobic sludge blanket reactor, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.55, p.1155-1161, 2005.

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

BERNAL, C.; CAIRÓ, J. & COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*, *Enzyme and Microbial technology*, v.38, p.49-54, 2006.

BOLLAG, D.M. Gel-Filtration Chromatography. In: DUNN, B.M. e PENNINGTON, M.W. Peptide Analysis Protocols. *Methods in Molecular Biology*, v. 36, p.1-9, 1995.

BÖCKLE, B. & MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers, *Applied and Environmental Microbiology*, p.790-792, 1997.

BOWMAN, J.P.; MCCAMMON, S.A.; BROWN, M.V.; NICHOLS, D.S. & MCMEEKIN, T.A. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 3068–3078, 1997 .

BOWMAN, J.P.; CAVANAGH, J.; AUSTIN, J. J. & SANDERSON K. Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, p. 841-848, 1996.

BOYER, P.D. The enzymes, ed.3, *Academic Press*, New York, 1971.

BRANDELLI, A; DAROIT, D.J. & RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.85, p.1735–1750, 2010.

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

BRANDELLI. A. & RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers, *Electronic Journal of Biotechnology*, v.8, p.35-42, 2005.

BRESSOLIER, P.; LETORNEOU, F.; URDACI, M. & VERNEUIL, B. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, v.65 n.6, p.2570-2576, 1999.

CASALI, A.K. *et al.* Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul, *FEMS Yeast Research*, v.3, p.405-415, 2003.

CHEN, P. PICKARD, M.A. & GRAY, M.R. Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation*, v.11, n.5, p. 341-347, 2000.

CHEN, J.; OUYANG, Y.; WANG, L. XIE, W. & ZHANG. Aspartic proteases gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and

phylogenetic relation, *Gene*, v. 442, p.108-118, 2009.

CHIARINI, E. B. & PENNA, T. C. V. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n.4, p. 457-466, 2003.

CHRISTENSEN, P. & COOK, F. D. *Lysobacter*, a new genus of nonhiting, gliding bacteria with a high base ratio. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 28, n. 3, p. 367-393, 1978.

COOPER, G.M. *The Cell: A Molecular Approach*. 2 ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.

COWAN, D. A. & AH TOW, L. Endangered Antarctic environments. *Annual Reviews in Microbiology*, v.58, p.649–690, 2004.

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 & Biodegradation*, v.63, p.358-363, 2009.

DENNER, E.B.M., *et al.* *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Systematic and Applied Microbiology*, n.24, p.44–53, 2001.

DEPPE, U.; RICHNOW, H.; MICHAELIS, W & ANTRANIKIAN, G. Degradation of crude oil by an artic microbial consortium, *Extremophiles*, v. 9, p.461-470, 2005.

ECIKI, O. D.; PAETZEL, M. & DALBEY, R. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser;His:Asp triad configuration, *Protein Science*, v. 17, p. 2023-2037, 2008.

FARAG, A.M. & HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.34, n.2, p. 85-93, 2004.

FELLER, G. & GERDAY, C. Catalysis and low temperatures: molecular adaptations. In: GERDAY, C. & GLANSDORFF, N. (eds) *Extremophiles: life under extreme environmental conditions*, *Encyclopedia of Life Support Systems*, Oxford, UK, 2003.

FELLER, G.; ZEKHNINI, Z.; LAMOTTE-BRASSEUR, J. & GERDAY, C. Enzymes from cold-adapted microorganisms. The class C beta-lactamase from the Antarctic psychrophile *Psychrobacter immobilis* A5. *European Journal of Biochemistry*, v. 244, p. 186-191, 1997.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution*, v.39, p.783–791, 1985.

FOLMAN, L. B.; POSTMA, J. & VAN VEEN, J. A. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiological Research*, n.158, v.2, p.107-15, 2003.

FRIEDRICH, A. B. & ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2875–2882, 1996.

GERDAY, C. & GLANSDORFF, N. (eds) *Physiology and Biochemistry of extremophiles*, ASM Press, Washington, USA, 2007.

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

GUPTA, R.; BEG, Q.K. & LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n. 59, p.15-32, 2002.

GUPTA, R.; BRADDOO, S. & SAXENA, R.K. Aqueous two phase systems: an attractive technology for downstream processing of biomolecules, *Current Science*, v. 77, p.520-523, 1999.

GUSHTEROVA, A. *et al.* Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, p. 831-834, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v.41, p: 95-98, 1999.

HERBERT, R.A., The ecology and physiology of psychrophilic microorganisms. In: HERBERT, R.A. & CODD G.A., eds. *Microbes in extreme environments*. London: The Society for General Microbiology, *Academic Press*, p. 1–24, 1986.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, n.4, p.735-750, 1999.

KAINOOR, P.S. & NAIK, G.R. Production and characterization of feather degrading keratinase from *Bacillus* sp. JB 99, *Indian Journal of Biotechnology*, v.9, p.384-390, 2010.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution*, v.16, p.111-120, 1980.

KUMAR *et al.* *Aspergillus niger* exo-inulinase purification by three phase partitioning, *Engineering in Life Sciences*, v.11, n.6, p.607–614, 2011.

KUMAR, C.G. & TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint, *Biotechnology Advances*, v.17. p.561–594, 1999.

KUSHNER, D.J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, p.317-368. In: D.J. KUSCHNER (ed), *Microbial life in extreme environments*, Academic Press, United Kingdom, 1978.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons Ltd., New York, p. 115–147, 1991 .

LIMA, A.; ALEGRE, R. & MEIRELLES, A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polymers*. v. 50, p. 63 - 68, 2002.

LIN, X.; SHIH, J. & SWAISGOOD, H.E. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase, *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.11, p.4273-4275, 1996.

LIU, Y.; YU, Y.L.; CHEN, M.Z. & XIAO, X. Advances in Aqueous Two-Phase Systems and Applications in Protein Separation and Purification, *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology*, v. 2, n.2, 2011.

LOHAN, D. & JOHNSTON, S. Bioprospecting in Antarctica. UNU-IAS report, United Nations University, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, v.

193, n.1, p.265–75, 1951.

LUCAS, F. S.; BROENNIMANN, O.; FEBBRARO, I. & HEEBHIGH, P. Diversity among Feather-Degrading Bacteria from a Dry Meadow Soil, *Microbial Ecology*, v.45. p. 282-290, 2003.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B. & TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase, *Canadian Journal of Microbiology*, v.54, p.180-188, 2008.

MARGESIN, R.; FELLER, G.; GERDAY, C. & RUSSEL, N. Cold adapted Microorganisms: Adaptation strategies and biotechnological potential. In: BITTON (ed). *The Encyclopedia of Environmental Microbiology*, John Wiley & Sons, New York, pp 871-885, 2002.

MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Cold-adapted organisms: ecology, physiology, enzymology and molecular biology. Springer-Verlag, Berlin, p. 416, 1999.

MATALONI, G.; GARRAZA, G. G.; BOTLER, M.; CONVEY, P. & FERMANI, P. What shapes edaphic communities in mineral and ornithogenic soils of Cierva Point, Antarctic Peninsula? *Polar Science*, n. 4, v.2, p. 405-419, 2010.

MAZOTTO, A. M. *et al.* Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation. *Enzyme Research*, v. 2011, 2011.

MOHORCICA, M.; TORKARB, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J. & MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v.332, p.196-201, 2007.

NAGAL, S. & JAIN, P.C. Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers, *Brazilian Journal of Microbiology*, v.41, p.196-200, 2010.

NAM, G.W. *et al.* Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe, *Archives of Microbiology*, v.178, n.6, p.538-547, 2002.

NICHOLS, D.S. *et al.* "Bioprospecting and Biotechnology in Antarctica" in JABOUR-GREEN, J. e HAWARD, M. (Eds). *The Antarctic: Past, Present and Future*. Antarctic CRC Research Report n.28, Hobart, p.85-103, 2002.

NICHOLS, D.S.; MCMEEKIN, T.A. & NICHOLS, P.D. Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and trans-fatty acid production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342, *Microbiology*, v.140, p.577-584, 1995.

NILEGAONKAR, S.S; KANEKAR, P.P; SARNAIK, S.S. & KELKAR, A.S. Production, isolation and characterization of extracellular protease of an alkaliphilic strain of *Artthrobaacter ramlosus*, MCM B-351 isolated from the alkaline lake of Lonar, India, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.18, n.8, p.785-789, 2002.

OCHMAN, H. & WILSON, A. C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *Journal of Molecular Evolution*, v.26, p. 74-86, 1987.

Ó'FÁGÁIN, C.; CUMMINS, P.M. & O'CONNOR, F. Gel-Filtration Chromatography. In: WALLS, D. & LOUGHRAN, S.T. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, v.681, p.25-31, 2011.

ONIFADE, A.; AL-SANE, N.; AL-MUSALAN, A. & AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, v.66, p.1-11, 1998.

OOI, C.W. *et al.* Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*, *Process Biochemistry*, v.46, n.1, p.68-73, 2011.

PARK, G.T. & SON, H-J. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium, *Microbiological research*, v.164, p. 478-485, 2009.

PIKE, R.N. & DENNISON, C. Protein fractionation by three phase partitioning (TPP) in aqueous/t-butanol mixtures, *Biotechnology and Bioengineering*, v.33, n.2, p. 221-228, 1987.

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

PRIEST, F.G. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*, *Bacteriologica Reviews*, v. 41, p. 711-753, 1977.

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

RAHIMPOUR, F. & BAHARV, A.R. Phase Equilibrium in Aqueous Two-phase Systems Containing Poly (propylene glycol) and Sodium Citrate at Different pH, *Engineering and Technology*, n.59, p. 150-153, 2009.

RAJPUT, R.; SHARMA, R. & GUPTA, R. Biochemical characterization of a thiol-activated, oxidation stable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12, *Enzyme Research*, DOI: 10.4061/2010/132148.

RIFFEL, A; DAROIT, D. J. & BRANDELLI, A. Nutritional regulation of protease production by the feather-degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6, *New*

Biotechnology, v. 28, n.2, p. 153-157, 2011.

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

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. & DESHPANDE, V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 597–635, 1998.

ROTHSCHILD, L.J & MANCINELLI, R.L. Extremophilic organisms adapt to life in incredibly harsh environment, *Nature*, v.409, p.1092-1101, 2001.

SAVITHA, G. JOSHI, M.M. TEJASHWINI, N. REVATI, R. SRIDEVI & ROMA, D. Isolation, Identification and Characterization of a feather degrading bacterium. *International Journal of Poultry Science*, v. 6, n. 9, p.689-693, 2007.

SCOPES, R. Protein Purification:Principles and Practice, 3 ed., Springer-Verlag, New York, 1994.

SHARMA, M.; SHARMA, M. & RAO, V.M. In vitro biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 5, p. 1-6, 2011.

SHARMA, R. & GUPTA, R. Substrate specificity characterization of a thermostable keratinase from *Pseudomonas aeruginosa* KS-1, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.37, p. 785-792, 2010.

SHARMA, S. & GUPTA, M.N. Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization, *Protein expression and Purification*, v.21, p.310-316, 2001A.

- SHARMA, A. & GUPTA, M.N. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of a wheat germ bifunctional protease/amylase inhibitor, *Process Biochemistry*, v.37, n.2, p. 193–196, 2001B.
- SHIH, J. C. H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization: a review. *Poultry Science*, v. 72, p. 1617–1620, 1993.
- SHIVAJI, S. *et al.* *Psychrobacter salsus* sp. nov. and *Psychrobacter adeliensis* sp. nov. isolated from fast ice from Adelie Land, Antarctica, *Systematic and Applied Microbiology*, v.27, p.628–635, 2004.
- SILVEIRA, S. T.; CASARIN, F.; GEMELLI, S. & BRANDELLI, A. Thermodynamics and Kinetics of Heat Inactivation of a Novel Keratinase from *Chryseobacterium* sp. Strain kr6, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 2, p. 548-560, 2010.
- SINGH, A.; HAMME, J.D.V. & WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v.25, n.1, p. 99-121, 2007.
- SON, H.; PARK, H.; KIM, H.& LEE, C. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*, *Biotechnology Letters*, v.30, n.3, p.461–465, 2008.
- SORHAUG, T. & STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects, *Trends in Food Science & Technology*, v.8, p.35–41, 1997.
- SUNTORNUSUK, W. *et al.* Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1111-1117, 2005.
- SZABO, L. *et al.* Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain, *World Journal of Microbiology*, v.16, p. 252-255, 2000.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., & KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msr121, 2011.

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

THOMPSON, S. L. & POLLARD, D. Greenland and Antarctic Mass Balances for Present and Doubled Atmospheric CO₂ from the GENESIS Version-2 Global Climate Model. *Journal of Climate*, v.10, p.871–900, 1997.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F, & HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research*, v.25, n.24 p.4876–4882, 1997.

TORK, S. ALY, M.M. & NAWAR, L. Biochemical and molecular characterization of a new local keratinase producing *Pseudomonas* sp., MS21. *Asian Journal of Biotechnology*, 2010.

TUBIO, G.; PICÓ, G. A. & NERL, B. B. Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, n. 877, p. 115–120, 2009.

UNEP. Biological Prospecting in Antarctica: Review, update and proposal tool to support a way forward. In: Antarctic treaty consultative meeting, 30, Nova Delhi, Information paper 67, p. 01-28, 2007.

UNEP. Biological Prospecting: an update of recent policy developments at the

international level. In: Antarctic treaty consultative meeting, 32, Baltimore, Information Paper 91, p. 01-07, 2009.

VENTOSA, A.; NIETO, J.J. & OREN, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.504-544, 1998.

VOLKERING, F.; BREURE, A.M.; VAN ANDEL, J.G. & RULKENS, W.H. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.5, 1995.

WANG *et al.* Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium, *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5679-5686, 2008.

WANG, X. & PARSONS, C.M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hog hair meals. *Poultry Science*, v. 76, n. 3, p. 491-496, 1997.

WARD, W. Three-Phase Partitioning for Protein Purification, *Innovations in Pharmaceutical Technology*, p.28-34, 2009.

WATSON, J.D.; BAKER, T.; BELL, S.P.; GANN, A.; LEVINE, M. & LOSICK, R. *Molecular Biology of the Gene*, 5 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 732p, 2004.

WEON, H-Y. *et al.* *Lysobacter niabensis* sp. nov. and *Lysobacter niastensis* sp. nov., isolated from greenhouse soils in Korea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.57, p.548–551, 2007.

WILLIAMS, C.M.; LEE, C.G.; GARLICH, J.D. & SHIH, J.C.H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. *Poultry Science*, v. 70, n. 1, p. 85-94, 1991.

WOESE, C.R. & FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proceedings of the National Academy of Science*, v.74, n.11, p.5088-5090, 1977.

YAKHNIN, A.V., VINOKUROV, L.M.; SURIN, A.K. & ALAKHOV, Y.B. Green Fluorescent Protein Purification by Organic Extraction, *Protein Expression and Purification*, v.14, p. 382-386, 1998.

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

YON-KAHN, J. & HERVÉ, G. *Molecular and Cellular Enzymology*, New York, v.2, p.452-453, 2010.

ZHANG, B; SUN, Z., JIANG, D-D. & NIU, T-G. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. *African Journal of Biotechnology*, v.8, n.11, p. 2598-2603, 2009.

XIE, F. *et al.* Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. *Bioresource Technology*, v.101, p.344-350, 2010.

ZOUARI, N. F. *et al.* A Novel Serine Metallokeratinase from a Newly Isolated *Bacillus pumilus* A1 Grown on Chicken Feather Meal: Biochemical and Molecular Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, n.2, p. 329-344, 2010.

8. CURRICULUM VITAE

PEREIRA, J. Q.

Nome: Jamile Queiroz Pereira

Nascimento: 23/03/1984 - Sapucaia do Sul/RS - Brasil

Endereço Profissional: Avenida Bento Gonçalves, 9500, prédio 43.212. Laboratório 218, Campus do Vale, CEP: 91501-970

Telefone profissional: +55 51 3308-6249

E-mail: Jamile_uni@yahoo.com.br

Formação Acadêmica:

- 2010 - 2012: Mestrado (*stricto sensu*) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil Orientador: Adriano Brandelli. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 2001 – 2008: Graduação em Ciências Biológicas. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil. Orientador: Victor Hugo Valiati

Formação complementar

- 2008 – 2008: Extensão universitária em Sistemática Molecular. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil.

Estágios:

- 2006 - 2009: Estágio no Laboratório de Biologia Molecular. Bolsista FAPERGS. . Carga horária: 20 horas semanais. Orientador: Victor Hugo Valiati.
- 2004 - 2006 Projeto MONALISA: Monitoramento Ambiental Local de Impactos Sobre Arroios da bacia do rio dos Sinos. Bolsista CORSAN. Carga horária: 20 horas semanais. Orientador: Uwe Shultz.

Monitorias:

- 2010: Monitora do curso de Férias, edição de inverno: “Você conhece a Célula?” Carga Horária: 60 horas. Orientadora: Célia R. Carlini.
- 2005 - 2005: Monitora das disciplinas de Biologia Animal I, II e III. Carga horária: 8 horas semanais. Orientador: Gelson Fiorentin.

Vínculo institucional

- 2009 – 2010: Professora de Ciências Biológicas e Biologia. Escola Técnica Estadual Portão, Escola Estadual de Ensino Fundamental Portão Velho. Carga horária: 40. Regime: Integral.

Idiomas

- Inglês: Compreende razoavelmente, fala razoavelmente, escreve razoavelmente, lê bem.
- Espanhol: Compreende bem, fala pouco, escreve razoavelmente, lê bem.
- Francês: Compreende pouco, fala pouco, escreve pouco, lê razoavelmente.
- Português: Compreende bem, fala bem, escreve bem, lê bem.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. LOPES, F. C., SILVA, L. A. D. E., TICHOTA, D. M., DAROIT, D.J., Velho, R. V., PEREIRA, J. Q., Brandelli, A.. Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Research*. , v.2011, p.1 - 9, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PEREIRA, J. Q.; UTPOTT, M., MELO, L. M.; LOPES, F. C.; MEDINA, L. F. e BRANDELLI, A. Isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos queratinolíticos do continente Antártico com potencial biotecnológico. In: XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Buenos Aires, 2011.

2. SILVEIRA, A. P.; PEREIRA, J. Q., UTPOTT, M.; MELO, L. M.; BRANDELLI, A. e MEDINA, F. F. Isolamento e identificação de uma bactéria queratinolítica da ilha Rei George, Antártica. In: : XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Buenos Aires, 2011.

3. PEREIRA, J. Q.; UTPOTT, M.; LOPES, F. C.; MEDINA, L.F. e BRANDELLI, A. Identificação e caracterização de uma protease queratinolítica produzida por uma bactéria isolada das ilhas Shetland do Sul, Antártida. In: XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2011.

4. PEREIRA, J. Q., LOPES, F. C., TICHOTA, D. M., MEDINA, L. F. C., BRANDELLI, A. Isolamento de microrganismos queratinolíticos provenientes do continente antártico com potencial utilização pela indústria avícola. In: XX Congreso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de resúmenes. , 2010. p.68.

5. LOPES, F. C., TICHOTA, D. M., VELHO, R. V., PEREIRA, J. Q., RIOS, A. O., BRANDELLI, A. Padronização de técnicas moleculares para a identificação de fungos

produtores de pigmentos In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre.

6. TICHOTA, D. M., LOPES, F. C., PEREIRA, J. Q., RIOS, A. O., Brandelli, A. Utilização de resíduos para a produção de metabólitos ativos de *Penicillium chrysogenum*. In: XX Congresso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de resúmenes. , 2010. p.55 – 55.

7. JUNG, D. M. H., PEREIRA, J. Q., CHRISTOFF, A. U., VALIATI, V. H. Avaliação filogenética das amostras de *Oxymycterus nasutus* do Rio Grande do Sul In: II Mostra de Pesquisa e iniciação científica da ULBRA de Gravataí, 2008, Gravataí.

8. PEREIRA, J. Q., JUNG, D. M. H., CHRISTOFF, A. U., VALIATI, V. H. Estruturação genética e Geográfica em *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Sigmodontinae) no Rio Grande do Sul In: IX Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2008, Porto Alegre.

9. PEREIRA, J. Q., JUNG, D. M. H., CHRISTOFF, A. U., VALIATI, V. H. Estruturação Geográfica em *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Sigmodontinae) no Rio Grande do Sul: uma abordagem filogeográfica In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA.

10. PEREIRA, J. Q., JUNG, D. M. H., CHRISTOFF, A. U., VALIATI, V. H. Estruturação populacional em *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Sigmodontinae) no Rio Grande do Sul: uma abordagem filogeográfica In: XVI Encontro de Geneticistas do RS, 2008, Porto Alegre.

11. SILVEIRA, L. K., PEREIRA, J. Q., ZARDO, D., LACERDA, P. S. DELIMITAÇÃO DE ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE NO MUNICÍPIO DE ARARICÁ ATRAVÉS DOS PROGRAMAS LIVRES SPRING E GOOGLE EARTH In: Mostra UNISINOS de Iniciação Científica, 2007, São Leopoldo.

12. GONÇALVES, J. W., PEREIRA, J. Q. ESTIMATIVA DA PROPORÇÃO SEXUAL DE UMA POPULAÇÃO DE BOTOS, *Tursiops truncatus*, AFETADA POR ATIVIDADES PESQUEIRAS NO SUL DO BRASIL In: Mostra UNISINOS de Iniciação Científica, 2006, São Leopoldo.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PEREIRA, J. Q., UTPOTT, M., LOPES, F. C., MEDINA, L. F. C., BRANDELLI, A. Diversidade de micro-organismos queratinolíticos cultiváveis do continente Antártico com potencial utilização industrial. In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre.