

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

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES DE SOLOS
BRASILEIROS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EVELISE BACH

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2010

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

**SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES DE SOLOS
BRASILEIROS**

EVELISE BACH

Ciências Biológicas- UFRGS

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março de 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

B118s Bach, Evelise

Seleção, identificação e caracterização de bactérias queratinolíticas provenientes de solos brasileiros / Evelise Bach. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Adriano Brandelli

1. Proteases 2. Queratinase 3. Bactérias queratinolíticas 4. Penas
Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

CDU 579.8 (043)

EVELISE BACH
LICENCIADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

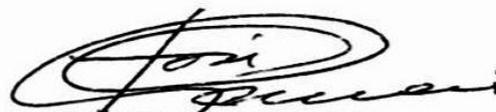
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 04/03/2010
Pela Banca Examinadora

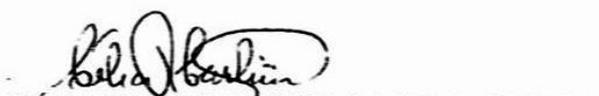
Homologado em: 08/03/2010
Por:


ADRIANO BRANDELLI
Orientador ICTA-UFRGS


JOSÉ CARLOS GERMANI
Coordenador do PPGMAA


FLAVIO CAMARGO
PPGMAA - UFRGS


PINHO FRANCISCO HERTZ
ICTA - UFRGS


CÉLIA REGINA RIBEIRO DA SILVA CARLINI
CBIOT/UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Adriano Brandelli pela aceitação, confiança e orientação deste trabalho. Aos colegas de laboratório, minha família durante esses dois anos, Ana, Fê Leães, Fê Lopes, Josi, Lisi, Pati, Rê, Sabrine, Simone, Stela, Volt e todas as Iniciação Científica pelos auxílios, conversas mais que alternativas, gargalhadas, companhias do R.U. e ótimo ambiente de trabalho. Em especial, ao Dani pela colaboração imprescindível para a realização deste projeto. Aos colegas e amigos de outros laboratórios, Adri, Amanda, Bacana, Cheila, Dea, Lari, Lucas e Manu que de várias formas contribuíram. À Iniciação Científica Jaslin A. S. Taffarel pela amizade, dedicação, empenho e ajuda prestada durante parte destes dois anos;

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular do CENA-USP pela acolhida e auxílio na identificação dos isolados. À professora Siu Mui Tsai pela oportunidade. Ao Jéferson do laboratório Uniprote-MS- CBIOT-UFRGS.

Ao funcionário Roberval, sempre muito prestativo ao tirar dúvidas técnicas, ao emprestar material e seu laboratório e ao prestar serviços de primeiros socorros. Aos professores da UFRGS e ao PPGMAA pela possibilidade de realização deste projeto. Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos colegas de apartamento Thaíla, Thaís e Gabriel pelos desabafos, pelas conversas e por todo o auxílio nos assuntos de informática.

À família do Gui que me hospedou e acolheu enquanto que mais uma “onda de calor” assolava Porto Alegre, além de colaborar com a logística das curvas de crescimento e sempre dar grande apoio.

Às pessoas mais importantes e especiais da minha vida: minha família pelo amor, confiança, apoio e pela compreensão de muitas ausências; e ao meu amor Gui pela amizade, amor, carinho, cuidados, compreensão, crescimento, cumplicidade, apoio, companheirismo e muitas alegrias.

SELEÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS PROVENIENTES DE SOLOS BRASILEIROS

Autor: Evelise Bach

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

RESUMO¹

Resíduos ricos em queratina são amplamente disponíveis como subprodutos de agroindústrias, e por sua recalcitrância tornam-se um problema ambiental e econômico por seu acúmulo e difícil manejo. Bactérias que hidrolisam a queratina, através da produção de queratinases, têm mostrado grande potencial biotecnológico. Este trabalho tem como objetivo selecionar, identificar e caracterizar um novo isolado bacteriano, proveniente de solos brasileiros, que seja produtor de queratinases úteis como biodegradadoras de penas, bem como caracterizar sua ação enzimática. Bactérias com atividade proteolítica e produtoras de proteína solúvel a partir de substratos queratinosos foram selecionadas e identificadas através do sequenciamento do 16S do DNAr. O extrato bruto de três linhagens Gram negativas foi caracterizado ao longo de 120 horas de cultivo. Dos 32 isolados, os maiores degradadores de penas foram as bactérias do gênero *Bacillus*, porém as características do extrato bruto das Gram negativas *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 também apresentam promissoras utilizações industriais. Ensaio enzimático e zimograma revelaram a produção de uma única protease queratinolítica por isolado, com características de metaloprotease. Utilizando técnicas de planejamento fatorial foi possível gerar um modelo validado estatisticamente para a otimização da produção enzimática. A utilização de sistema aquoso bifásico foi eficiente para a purificação da enzima produzida pela linhagem P3, gerando banda única em SDS-PAGE com massa molecular de aproximadamente 53 kDa. O sequenciamento da protease queratinolítica da linhagem P3, através de espectrômetro de massas, revelou homologia com metaloproteases dependentes de zinco semelhantes às serralisinas. Apesar das serralisinas serem comumente associadas a fatores de virulência, a importância das patogenias causadas por *Serratia* parece ser menor do que a causada por outras bactérias. Portanto, a enzima de P3, que é facilmente desnaturada por tratamento térmico, pode também ser utilizada biotecnologicamente em processos controlados.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (120 p.) Março, 2010.

SELECTION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF KERATINOLYTIC BACTERIA ISOLATED FROM BRAZILIAN SOILS

Author: Evelise Bach

Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

ABSTRACT¹

Keratin-rich wastes are widely available as an agroindustrial byproduct. Since these residues are difficult to degrade, they cause economical and environmental problems due to its accumulation and difficult management. Bacteria with keratin-degrading abilities, through keratinase production, have shown several biotechnological applications. This work aimed to select, identify and characterize a novel bacterial isolate from Brazilian soils, which is keratinase producer, useful for feather degradation and characterize its enzymatic activity. Bacteria with proteolytic activity and soluble protein production when cultivated with keratinous wastes were selected and identified based on 16S rDNA gene sequencing. Crude supernatant of three Gram negative strains were characterized over 120 hours of cultivation. Among 32 isolates, the bacteria from *Bacillus* genus showed higher feather hydrolyses. Although, the characterization of the crude extract produced by the Gram negative *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 and *Serratia marcescens* P3 also revealed their promising use in industrial processes. Enzymatic assays and zimogram analyses indicated the production of a unique proteolytic enzyme by each strain, which have presented metalloprotease characteristics. By using factorial design, a statistically validated model was generated for the optimization of enzymatic production. An aqueous two-phase system was effective for the purification of P3 enzyme, resulting in a single band of approximately 53 kDa on SDS-PAGE. The sequencing of strain P3 keratinolytic protease through mass spectrometry revealed homology with zinc-dependent metalloproteases of the serralsin family. In spite of serralsins being commonly related to virulence factors, the pathogenies caused by *Serratia* seems to be less concerning than the ones caused by other bacteria. Thus, the enzyme of P3, which is easily denatured by heat treatment, may also be biotechnologically useful in controlled processes.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (120 p.) March, 2010.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
SUMÁRIO	vii
RELAÇÃO DE TABELAS	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS	xi
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Proteases	5
3.2 Queratinases	8
3.3 Estrutura e composição da queratina das penas	11
3.4 Aplicações na indústria avícola	12
3.5 Outras aplicações	14
3.6 Produção de queratinases	16
3.6.1 Métodos moleculares	17
3.6.2 Planejamento fatorial	19
3.7 Purificação	20
3.7.1 Sistema Aquoso Bifásico	23
4. MATERIAS E MÉTODOS	26
4.1 Seleção dos micro-organismos	26
4.1.1 Meios de cultivo e diluentes	26
4.1.2 Micro-organismos	27
4.1.3 Manutenção e estoque dos micro-organismos	27
4.1.4 Atividade proteolítica em Ágar Leite	28
4.1.5 Hidrólise de penas e farinha de penas	28
4.2 Identificação dos isolados	29
4.2.1 Extração de DNA	29
4.2.2 Reação de PCR	30
4.2.3 Sequenciamento e identificação	31
4.3 Crescimento em diferentes meios de cultivo	31
4.3.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo	31
4.3.2 Determinação da atividade proteolítica	32
4.3.3 Produção de azoqueratina	33
4.3.4 Atividade queratinolítica	34
4.3.5 Avaliação de degradação pelo peso seco	34
4.4 Curva de crescimento	35
4.4.1 Preparação do pré-inóculo	35
4.4.2 Preparação do inóculo	35
4.4.3 Amostragem	35
4.4.4 Determinação do número de células viáveis	36
4.4.5 Peso seco e densidade ótica	36

4.4.6	Determinação de cisteína livre	36
4.5	Caracterização do extrato bruto	37
4.5.1	Produção da enzima	37
4.5.2	Determinação do pH ótimo	37
4.5.3	Determinação da temperatura ótima	38
4.5.4	Zimograma.....	38
4.5.5	Efeito de reagentes.....	39
4.6	PCR para metaloprotease	39
4.7	Otimização da produção da enzima	40
4.7.1	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	40
4.7.2	<i>Serratia marcescens</i>	41
4.8	Purificação da enzima	42
4.8.1	Sistema aquoso bifásico	42
4.8.2	Quantificação de proteína	43
4.8.3	SDS-PAGE	44
4.8.4	Sequenciamento da enzima	45
4.9	Caracterização da enzima parcialmente purificada	47
4.9.1	Determinação do pH e temperatura ótimos	47
4.9.2	Estabilidade térmica	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Seleção e identificação dos isolados	48
5.2	Crescimento em diferentes meio de cultivo	54
5.3	Perfil de crescimento	57
5.4	Caracterização de proteases no extrato bruto	61
5.5	PCR para metaloprotease	73
5.6	<i>Chryseobacterium indologenes</i> A22	73
5.6.1	Caracterização da enzima	73
5.6.2	Otimização da produção enzimática	76
5.7	<i>Serratia marcescens</i> P3	80
5.7.1	Otimização da produção enzimática	80
5.7.2	Purificação da enzima	87
5.7.3	Caracterização da enzima P3	93
5.7.4	<i>Serratia marcescens</i> : patogenia X potencial biotecnológico	100
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

TABELA 1. Atividade proteolítica pela formação de halo em Ágar Leite (AL) e capacidade de crescimento em Ágar Farinha de Pena (AFP) dos isolados amazônicos após 48 horas a 30 °C.....	49
TABELA 2. Identificação das bactérias isoladas de solos brasileiros.....	52
TABELA 3. Produção de proteína solúvel pelos isolados de solo de mata Atlântica A22, K12 e P3 após cultivo em CFP e CP por 48 horas a 30 °C e 125 rpm.....	54
TABELA 4. Avaliação de proteína solúvel, pH e variação do peso seco de resíduos queratinosos (% do peso inicial) após 15 dias de cultivo dos isolados de solo de mata Atlântica A22 e K12 em caldo cabelo (CCab) e caldo lã (CL) sob agitação a 30 °C.....	56
TABELA 5. Atividade proteolítica utilizando os substratos azocaseína e azoqueratina e atividade específica (azoqueratina/azocaseína) obtidas com os sobrenadantes de 48 horas de cultivo em Caldo Pena dos micro-organismos de solo de mata Atlântica A22, K12 e P3.....	56
TABELA 6. Efeito de sais sobre a atividade da protease bruta de <i>Aeromonas hydrophila</i> K12, <i>Chryseobacterium indologenes</i> A22 e <i>Serratia marcescens</i> P3 pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente).....	70
TABELA 7. Efeito de diferentes reagentes sobre a atividade da protease bruta de <i>Aeromonas hydrophila</i> K12, <i>Chryseobacterium indologenes</i> A22 e <i>Serratia marcescens</i> P3 pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente).....	71
TABELA 8. Matriz experimental com as variáveis codificadas e valores reais (entre parênteses) e a resposta Y atividade enzimática.....	77
TABELA 9. Análise de variância do modelo com os efeitos e interações entre as variáveis para a produção enzimática.....	77
TABELA 10. Matriz experimental com as variáveis codificadas e valores reais (entre parênteses) e a resposta Y atividade enzimática.....	82
TABELA 11. Análise de variância do modelo com os efeitos e interações entre as variáveis para a produção enzimática.....	83
TABELA 12. Atividade proteolítica das frações originárias do sistema aquoso bifásico a qual a enzima de <i>Serratia marcescens</i> P3 foi submetida.....	88

TABELA 13. Atividade específica e rendimento da fase superior (PEG) do sistema aquoso bifásico e coeficientes de partição (K_c e K_p) obtidos do método de purificação da metaloprotease de *Serratia marcescens* P3.....88

TABELA 14. Peptídeos resultantes da digestão tríptica da protease de *Serratia marcescens* P3 no espectrômetro de massas.....97

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia em AL dos microorganismos amazônicos degradadores de penas em diferentes temperaturas por 24 horas. (■) 30 °C; (▣) 37 °C; (□) 44 °C; (■) 55 °C.....51

FIGURA 2. Proteína solúvel produzida após 11 dias de cultivo em caldo farinha de pena (CFP- □) e caldo pena (CP- ■) a 30 °C em agitador orbital (125 rpm) e média da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia em diferentes temperaturas por 24 horas no ágar leite (AL- ■).....51

FIGURA 3. Gel de agarose 0,9% com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16S DNAr dos isolados de solos Brasileiros. 1kb: marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen).52

FIGURA 4. Perfil de crescimento de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3.58

FIGURA 5. Produção de protease por três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm pelo ensaio azocaseína (37 °C; 30 min; pH 7,0). (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3.....58

FIGURA 6. Proteína solúvel do sobrenadante do cultivo de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3.....59

FIGURA 7. Concentração de cisteína livre no sobrenadante do cultivo de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3.....60

FIGURA 8. Efeito do pH sobre a queratinase bruta produzida por (□) *Aeromonas hydrophila* K12, (●) *Chryseobacterium indologenes* A22, e (■) *Serratia marcescens* P3 em caldo farinha de pena (CFP) pelo ensaio azocaseína (30 min, 37 °C).....63

FIGURA 9. Efeito da temperatura sobre a queratinase bruta produzida por (□) *Aeromonas hydrophila* K12, (●) *Chryseobacterium indologenes* A22, e (■) *Serratia marcescens* P3 em caldo farinha de pena (CFP) pelo ensaio azocaseína (30 min, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente).....64

- FIGURA 10.** Zimogramas das proteases degradadoras de penas nos sobrenadantes de cultivo em caldo farinha de pena (CFP) dos isolados **(a)** *Aeromonas hydrophila* K12, **(b)** *Chryseobacterium indologenes* A22, e **(c)** *Serratia marcescens* P3 com o substrato caseína 1 % (*overnight*, temperatura ambiente, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente). A- controle; B- gel incubado com 10 mM de EDTA; C- gel incubado com 10 mM de PMSF. Setas indicam bandas de proteólise.....66
- FIGURA 11.** Produção de queratinase durante crescimento de *Chryseobacterium indologenes* A22 em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm pelo ensaio azoqueratina (60 min, 37 °C, pH 7,0).....75
- FIGURA 12.** Estabilidade térmica da protease queratinolítica de *Chryseobacterium indologenes* A22 nas temperaturas de 37 °C (●), 55 °C (■) e 70 °C (Δ) ao longo do tempo pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 7,0).....75
- FIGURA 13.** Superfície de resposta para a atividade enzimática em função das variáveis concentração de farinha de pena e pH.78
- FIGURA 14.** Superfícies de resposta geradas para a atividade proteolítica de *Serratia marcescens* P3 em função da concentração de FP e pH **(a)**; temperatura e concentração de farinha de pena **(b)**; e temperatura e pH **(c)**...84
- FIGURA 15.** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% da enzima purificada por sistema aquoso bifásico (SAB). **MM:** marcador molecular Invitrogen; **Linha 1:** extrato da protease bruta de *Serratia marcescens* P3; **Linha 2:** enzima purificada em SAB com o sal sulfato de amônio; **Linha 3:** enzima purificada em SAB com o sal citrato de sódio.....91
- FIGURA 16.** Alinhamento da sequência de peptídeos resultantes da digestão trípica da protease de *Serratia marcescens* P3 com a serralisina de *Serratia* sp. E-15, obtidos por espectrometria de massas. Negrito: peptídeos obtidos; Sombreado preto: motivo ligante de zinco; Sublinhado: dobra-beta contendo metionina; Sombreado cinza: região rica em glicina ligante de cálcio.....97
- FIGURA 17.** Estabilidade térmica da protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 na ausência (símbolos abertos) e na presença de 10 mM do íon cálcio nas temperaturas de 37 °C (●), 55 °C (■) e 70 °C (▲) ao longo do tempo pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 6,0).....99
- FIGURA 18.** Efeito do pH sob a protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 após purificação pelo sistema aquoso bifásico pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C).....99
- FIGURA 19.** Efeito da temperatura sob a protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 após purificação pelo sistema aquoso bifásico pelo ensaio azocaseína (30 min, pH 6,5).....100

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AL: Ágar Leite
AFP: Ágar Farinha de Pena
BSA: Albumina Sérica Bovina
CFP: Caldo Farinha de Pena
CIA: Clorofórmio e Álcool Isoamílico
DMSO: Dimetilsulfóxido
CP: Caldo Pena
CTAB: Brometo de Cetiltrimetilamônio
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético
FC: Folin-Ciocalteau
M: Molar
MM: Marcador Molecular
PAGE: Gel de poliacrilamida
PBS: Tampão Fosfato Salino
PCR: Reação em Cadeia pela Polimerase
PEG: Polietilenoglicol
PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PVP: Polivinilpirrolidona
RC: Reagente Combinado
SAB: Sistema Aquoso Bifásico
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
TCA: Ácido Tricloroacético
TSA: Ágar Triptona de Soja
TSB: Caldo Triptona de Soja
UFC: Unidades Formadoras de Colônia

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e o conseqüente aumento do consumo mundial exigem um aumento na produção industrial e agroindustrial, com isso há uma grande geração de resíduos. Estes resíduos têm se tornado um problema não só econômico para as empresas, que devem investir na sua correta destinação, mas também ambiental, principalmente num momento em que o mercado e a sociedade têm exigido cada vez mais empresas cujos produtos e processo industrial agridam menos o meio ambiente. Uma alternativa econômica e ecologicamente correta é a reutilização desses resíduos.

No Rio Grande do Sul, com a indústria avícola em contínua expansão, existe o problema da grande geração de penas como subproduto. Considerando que as penas representam de 5 a 7% do peso total de frangos adultos, tem-se a produção de grandes quantidades diárias deste resíduo por planta industrial. Penas são constituídas por cerca de 90% de queratina, uma proteína altamente recalcitrante de difícil degradação por proteases conhecidas como tripsina, pepsina e papaína. Porém existem proteases capazes de degradar a queratina, as queratinases produzidas por micro-organismos.

Queratinases vêm sendo amplamente estudadas pelo seu promissor potencial biotecnológico tendo aplicações mais diversas como na indústria de

cosméticos, farmacêutica e de detergentes, na medicina, na produção de polímeros biodegradáveis e até na hidrólise de príons. Na indústria avícola, estas enzimas surgem como solução potencial para o problema da destinação atual que é dada às penas as quais são transformadas em ração e fertilizantes através de processos que diminuem o valor nutritivo deste substrato. Com o biotratamento utilizando proteases microbianas o produto final torna-se mais nutritivo e de alta digestibilidade, agregando valor ao que antes era apenas um resíduo.

Além disso, queratinases têm aplicações em curtumes, setor também bastante desenvolvido no RS. Esta indústria utiliza sulfetos para o processo de depilação do couro, gerando gases tóxicos, de odor desagradável e resíduos que poluem os efluentes. O biotratamento realizado com a queratinase realiza a depilação do couro com menor gasto de energia, de forma mais eficiente agindo somente no pelo e reduzindo o impacto ambiental dessas empresas.

Enquanto o mercado internacional de enzimas industriais e especiais é estimado em 4 bilhões de dólares, o mercado externo brasileiro de biocatalisadores está em torno de 200 milhões, prevalecendo as importações. O Brasil, comparado com o mercado internacional, ainda utiliza poucas enzimas. Isso ocorre mesmo o país tendo grande abundância de matérias-primas naturais a serem utilizadas em processos fermentativos e extrativos para a produção de enzimas, bem como uma enorme quantidade e variedade de resíduos agrícolas e industriais a ser transformados via enzimática em produtos úteis altamente diversificados e com valor agregado.

Cerca de 40% do total das proteases comercializadas são de origem microbiana por possuírem grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética, tendo promissoras aplicações biotecnológicas.

Fungos e bactérias são conhecidos produtores de proteases queratinolíticas, sendo isolados principalmente de solos com grande quantidade de material queratinoso, ou como patógenos. Dentre as bactérias, há a dominância dos gêneros Gram positivos *Bacillus* e *Streptomyces*. Porém, estudos mais recentes têm relacionado a capacidade queratinolítica principalmente à bactérias Gram negativas, mostrando que a diversidade de micro-organismos com essa atividade deve ser muito maior.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo selecionar, identificar e caracterizar um novo isolado bacteriano, proveniente de solos brasileiros, que seja produtor de queratinases úteis como biodegradadoras de penas, bem como caracterizar sua ação enzimática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou proteinases, são uma classe de enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Possuem grande importância fisiológica para animais, plantas e micro-organismos devido à sua capacidade tanto de degradação quanto de síntese. As proteases também constituem um dos grupos mais importantes dentro das enzimas industriais. Sua ampla especificidade de ação hidrolítica pode ser aplicada nas indústrias de alimentos, detergentes, rações, couro, farmacêutica, química, na síntese de proteínas e tratamento de resíduos (Rao et al., 1998; Kumar & Takagi, 1999).

Os micro-organismos são as fontes preferenciais de proteases devido ao seu crescimento rápido, reduzido requerimento de espaço para cultivo, fácil manipulação genética e produção abundante e regular do produto desejado (Rao et al., 1998). Proteases bacterianas apresentam tempo de prateleira mais prolongado e podem ficar estocadas em condições abaixo das ideais por semanas sem perda significativa da atividade. No geral, as proteases microbianas são excretadas para o meio extracelular, o que simplifica seu processamento se comparado com proteases produzidas por plantas e animais (Gupta et al., 2002b). Porém a aplicação das proteases microbianas nem

sempre é possível diante das exigentes demandas industriais. Como consequência, há uma busca por novas proteases em fontes da biodiversidade pouco exploradas biotecnologicamente (Bastos et al., 2000; Giongo et al., 2007), que visam suprir essas necessidades.

As bactérias são as maiores produtoras de proteases do tipo alcalinas, sendo o gênero *Bacillus* o mais explorado e mais utilizado comercialmente. Outros gêneros produtores de proteases incluem *Pseudomonas*, *Streptomyces* e nos fungos, os *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Rhizopus* e a levedura *Candida*. A produção de proteases é inerente aos microorganismos e são geralmente constitutivas, mas também podem apresentar caráter indutivo. No gênero *Bacillus*, a produção de proteases tem sido associada à fase estacionária de crescimento e à produção de esporos. Sugere-se que a produção de proteases extracelulares seja uma manifestação da limitação de nutrientes, porém o seu rendimento depende da produção de biomassa da fase exponencial (Gupta et al., 2002b).

Há um grande número de proteases já estudadas (Rawlings & Barrett, 1993), que podem ser classificadas quanto ao tipo de reação catalisada em dois grandes grupos: as exopeptidases, que clivam o substrato em suas regiões amino ou carboxi terminais; e endopeptidases, que clivam o substrato internamente, distante das regiões terminais (Rao et al., 1998). As endopeptidases são classificadas em vários grupos, dependendo da natureza do seu sítio ativo. De acordo com a lista (EC) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, são classificadas como

serina (EC.3.4.21), cisteína ou sulfidril (EC.3.4.22), aspartil (EC.3.4.23), ou metaloproteases (EC.3.4.24; Barret et al., 2001).

As serinoproteases são numerosas e abundantes nos diversos grupos de micro-organismos. Elas possuem um grupo serina no seu sítio ativo e são subdivididas em 20 famílias e seis clãs de acordo com suas similaridades estruturais. Alguns exemplos são as carboxipeptidases, quimotripsinas e subtilisinas.

Cisteíno-proteases ocorrem tanto em procariotos quanto em eucariotos e sua atividade depende da díade catalítica cisteína e histidina. Geralmente, são ativas apenas na presença de agentes redutores e são divididas em quatro grupos. Papaína e tripsina são exemplos de cisteíno-proteases. Aspartil-proteases atuam em condições ácidas e dependem de resíduos de ácido aspártico para sua atividade. São agrupadas em três famílias: pepsina, retropepsina e enzimas dos pararetrovírus (Rao et al., 1998).

As metaloproteases apresentam os tipos catalíticos mais diversos dentro das proteases e têm o requerimento de metais divalentes para sua atividade. São divididas em 30 famílias, entre endo e exopeptidases, como termolisina, colagenase e elastase (Rao et al., 1998).

As proteases ainda podem ser classificadas dependendo das condições de pH no qual possuem atividade, como pH ácido, neutro ou básico; quanto as relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em clãs, de acordo com a divergência ou convergência com um ancestral comum (Rao et al. 1998); e do substrato que elas degradam, como colágeno (colagenase), elastina (elastase), queratina (queratinase).

3.2 Queratinases

Apesar da alta estabilidade da proteína queratina, verifica-se que não há acúmulo na natureza, o que confirma a existência de degradação por proteases específicas, as queratinases. Dermatófitos, micro-organismos que parasitam a queratina presente em animais muitas vezes causando doenças, são os mais estudados com relação à biodegradação da queratina. Porém, tem-se encontrado uma grande quantidade de micro-organismos produtores de queratinases e assim, capazes de utilizar a queratina como substrato para o seu crescimento (Brandelli et al., 2010).

Queratinases são endopeptidases produzidas por fungos e bactérias que têm sido isoladas de solo onde há material queratinoso depositado (Kaul & Suambali, 1997; Riffel & Brandelli, 2006). Dentre os fungos, queratinases são descritas principalmente produzidas por dermatófitos, isolados de ferimentos humanos e de outros animais. Dentre as bactérias, a atividade queratinolítica vem sendo grandemente descrita para espécies de *Bacillus* e *Streptomyces* (Bressolier et al., 1999; Kim et al., 2001; Lin et al., 1999; Daroit et al., 2009; Corrêa et al., 2010), porém alguns estudos mostram que a diversidade de bactérias com essa capacidade é muito maior (Lucas et al., 2003).

Entre as Gram positivas, novos isolados queratinolíticos vêm sendo identificados como *Arthrobacter* sp. (Lucas et al., 2003), *Microbacterium* sp. kr10 (Thys et al., 2004), e *Kocuria rosea* (Bernal et al., 2006a, b). A maioria das linhagens pode degradar significativamente a queratina de penas dentro de 48 horas (Brandelli, 2008).

Mais recentemente, a atividade queratinolítica tem sido associada às bactérias Gram negativas como as linhagens degradadoras de pena *Vibrio* sp. (Sangali & Brandelli, 2000), *Stenotrophomonas* spp. (De Toni et al., 2002; Yamamura et al., 2002b), *Chryseobacterium* sp. (Riffel & Brandelli, 2002; Wang et al., 2008b) e *Serratia* sp. (Khardenavis et al., 2009) as quais foram isoladas de penas de frango em decomposição. A investigação da diversidade de bactérias queratinolíticas entre isolados de solo a temperatura ambiente revela que linhagens de Proteobacteria e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* são predominantes (Lucas et al., 2003). A predominância de Gram negativas também é sustentada por Riffel e Brandelli (2006) no estudo de bactérias queratinolíticas de penas em decomposição.

Apesar da grande aplicabilidade dessa enzima e de um número considerável de micro-organismos queratinolíticos reportados, o mecanismo da degradação da queratina ainda não foi inteiramente elucidado. Contudo, estudos mostram que a redução de pontes dissulfeto possui influência significativa (Böckle & Müller, 1997), pois alteram a conformação da queratina que aumenta a exposição dos sítios para a atuação da queratinase (Vignardet et al., 2001). Esta sulfitólise pode ocorrer tanto através de enzimas como as dissulfeto redutases, quanto por mecanismos químicos (produção de sulfeto ou tiosulfato), ou ainda por sistemas redox ligados a membrana celular (Gupta & Ramnani, 2006; Ramnani & Gupta, 2007; Kumar et al., 2008).

O ataque inicial por queratinases e dissulfeto redutases também permite a atuação de proteases menos específicas que resultam numa extensa hidrólise da queratina (Brandelli, 2008). As queratinases usualmente

apresentam amplo espectro de ação (Gradisar et al., 2000; Brandelli, 2005), com sua habilidade de degradar a queratina nativa associada à atuação cooperativa de um conjunto de enzimas (Yamamura et al., 2002b; Giongo et al., 2007).

Fungos e actinomicetos ainda apresentam a capacidade de queratinólise associado a um ataque mecânico dos substratos queratinosos por pressão ou penetração de suas hifas (Brandelli et al., 2010). Como exemplo, a bactéria *Streptomyces fradiae* degrada a complexa estrutura morfológica da lã, cabelo e penas por uma combinação de atividade mecânica e enzimática (Hood & Healy, 1994).

A produção de queratinases usando farinha de pena ou penas nativas como meio de cultura tem sido descrita, e muitos fatores como pH, concentração de penas, inóculo e temperatura podem influenciar o resultado enzimático (Brandelli & Riffel, 2005; Casarin et al., 2008; Khardenavis et al., 2009).

Tem sido observado que um pH alcalino de 6 a 9 possibilita a produção da queratinase e degradação de penas na maioria dos microorganismos. As temperaturas para produção de queratinase vão de 28 a 50 °C para a maioria das bactérias, actinomicetos e fungo, porém temperaturas termofílicas de até 70 °C têm sido descritas para *Thermoanaerobacter* e *Fervidobacterium* spp. (Friedrich & Antranikian, 1996; Rissen & Antranikian, 2001; Nam et al., 2002). A produção psicrótrófica de queratinase foi reportada para *Stenotrophomonas* sp. (Yamamura et al., 2002a).

Queratinases microbianas são predominantemente extracelulares quando cultivadas em substrato queratinoso, geralmente apresentando caráter indutivo. A queratina exerce a função de indutor externo, promovendo a exportação da enzima a partir de sítios intracelulares de síntese. Contudo algumas queratinases constitutivas já foram descritas (Gessesse et al., 2003; Manczinger et al., 2003), algumas intracelulares (Gupta & Ramnani, 2006) e até algumas associadas à membrana como no fungo dermatófito *Trichophyton metangrophytes* (Onifade et al., 1998).

3.3 Estrutura e composição da queratina das penas

A queratina é um polipeptídeo recalcitrante que, pela sua conformação, é resistente até às enzimas proteolíticas conhecidas, pepsina, tripsina e papaína (Papadopoulos et al., 1986; Shih, 1993). São proteínas fibrosas e insolúveis encontradas em vertebrados superiores (em peles, pelos, penas, unhas, cascos e escamas) com função principal protetora e estrutural (Bradbury, 1973).

A estabilidade mecânica das penas e resistência à digestão proteolítica são consequências do firme empacotamento da cadeia protéica em uma estrutura α -hélice (α -queratina), estrutura β -pregueada (β -queratina) e o super enrolamento da cadeia polipeptídica em forma helicoidal, onde ocorre alto grau de intercruzamentos nas cadeias de polipeptídeos. Estes intercruzamentos são facilitados pelos altos conteúdos de cisteína, formando pontes dissulfeto. Pontes de hidrogênio entre os polipeptídeos e interações

hidrofóbicas também estabilizam a estrutura super enrolada, conferindo força, estabilidade e resistência proteolítica à queratina (Onifade et al., 1998).

As queratinas podem ser classificadas como “leves” ou “rígidas” conforme suas propriedades físico-químicas, principalmente seu conteúdo de cisteína. As queratinas “rígidas” são ricas em cisteína, contendo muitas ligações dissulfeto, além da maioria dos aminoácidos em sua composição. Nessa classe de queratinas estão incluídos os pelos e penas, com cerca de 10 a 14% de cisteína. As queratinas “leves”, como as que estão presentes na pele, apresentam baixo conteúdo de cisteína e, em sua composição, principalmente aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina (Hood & Healy, 1994). Dependendo de sua estrutura secundária, também podem ser classificadas como α -queratina (encontrada na lã e no cabelo) ou β -queratina (encontrada nas penas) (Voet & Voet, 1995), sendo que a hidrólise microbiana da β -queratina das penas é comumente maior se comparada à hidrólise da α -queratina (Brandelli, 2005; Pillai & Archana, 2008).

O conteúdo e as concentrações dos aminoácidos nas penas são altamente variáveis. Metionina, lisina e histidina têm seu conteúdo diminuído com o aumento da idade de frangos, enquanto a concentração de aminoácidos não essenciais aumenta com a idade (Papadopoulos et al., 1986; Dalev, 1997).

3.4 Aplicações na indústria avícola

As penas são resíduos ricos em queratina largamente produzidos pela indústria avícola. Estima-se que há a produção anual de 5 milhões de toneladas de penas como um subproduto dessa indústria (Poole et al., 2009).

Atualmente utiliza-se as penas como suplemento alimentar, produzindo farinha de pena através de tratamentos térmicos e moagem. Porém, esses processos requerem alto gasto energético e eliminam aminoácidos termolábeis, destruindo alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano (Wang & Parsons, 1997), o que resulta num produto de pouco valor nutritivo e baixa digestibilidade. Até 50% dos aminoácidos podem ser perdidos com o atual processamento térmico utilizado para hidrolisar as penas (Woodgate, 1993).

Uma alternativa é o biotratamento através de micro-organismos ou suas proteases com especificidade para hidrolisar a queratina a peptídeos e aminoácidos, tornando-o mais nutritivo e aumentando sua digestibilidade (Onifade et al., 1998). Estudos mostram que a queratinase adicionada à ração tem efeitos positivos na performance do crescimento, digestibilidade e desenvolvimento intestinal de frangos de corte (Wang et al., 2008c), além de aumentar o rendimento da carne (Wang et al., 2006). Com este intuito, a queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 vem sendo produzida comercialmente sob o nome de Versazyme® (Williams et al., 1990).

Proteínas hidrolisadas obtidas do cultivo de bactérias queratinolíticas em penas de frango apresentam um aumento no valor nutricional da queratina da pena (Bertsch & Coello, 2005; Grazziotin et al., 2006). Isso é devido à deficiência da queratina em aminoácidos nutricionalmente importantes como a metionina e a fenilalanina, que são acrescentados aos hidrolisados durante o cultivo bacteriano através de sua produção de proteínas, de aminoácidos e de biomassa (Nam et al. 2002; Grazziotin et al., 2006; Cortezi et al., 2008).

3.5 Outras aplicações

Na indústria de couro, através do método tradicional de depilação, uma grande quantidade de sulfetos é empregada, sendo responsável pela maior carga de poluente do curtume. Uma alternativa, ainda pouco empregada, seria o uso de queratinases produzidas por micro-organismos que auxiliassem na depilação, reduzindo o impacto ambiental causado pelos efluentes da indústria (Rao et al., 1998).

Para esta aplicação, as queratinases devem apresentar alta eficiência e seletividade catalítica, degradando a queratina e não outros compostos que devem permanecer intactos no couro, como elastina e colágeno (Macedo et al., 2005; Giongo et al., 2007; Prakash et al., 2010). O processo de depilação ocorre em um meio alcalino que promove a dilatação da raiz do pelo e, posteriormente, a proteína do folículo piloso é degradada pela protease, permitindo sua fácil remoção (Gupta et al., 2002a). Além da qualidade do couro ser melhor, há uma economia de tempo que pode aumentar a eficiência da produção de couro, representando agregação de valor para o curtume (Brandelli, 2008). Porém, o alto custo das enzimas e sua necessidade de controle se sobressaem às vantagens e têm sido empecilhos para sua utilização.

Na indústria de couro, queratinases ainda poderiam ser aplicadas no tratamento de efluentes e resíduos sólidos ricos em proteína, diminuindo a demanda biológica de oxigênio em sistemas aquáticos (Thanikavelan et al., 2004). Da mesma forma, poderia ser aplicada nos demais efluentes e nos entupimentos de pias e ralos de banheiros, visto que resíduos de lã e cabelo

também são hidrolisados por isolados queratinolíticos como *Streptomyces* e *Bacillus* (Takami et al., 1992; Lal et al., 1996).

Resíduos agroindustriais queratinosos também podem servir como substrato para o cultivo de bactérias entomopatogênicas e para a produção de toxinas inseticidas (Poopathi & Abidha, 2008). Hidrolisados de queratina podem ser utilizados para a produção de gás metano e *pellets* combustíveis para a geração de calor (Brandelli et al., 2010).

Somado a isso, as penas contêm cerca de 15% de nitrogênio (N), tendo grande potencial de uso como fertilizantes de liberação lenta desse mineral (Kim et al., 2005). Apesar de a pena bruta apresentar uma taxa de mineralização muito lenta, a farinha de pena apresenta liberação total do N de 6 a 7 semanas (Hadas & Kautsky, 1994). Hidrolisados parciais de penas têm sido testados em formulações para fertilizantes. O tratamento de penas de frango com *Streptomyces* sp. e posterior utilização do hidrolisado em adubação demonstrou que esse material apresenta características compatíveis para uso como fertilizante (Choi & Nelson, 1996). Recentemente, o hidrolisado protéico produzido pela degradação de penas utilizando queratinase produzida pelo fungo *Paecilomyces marquandii* demonstrou potencial como fertilizante foliar, sendo vantajoso se comparado à degradação microbiana que acaba por consumir alguns nutrientes durante seu crescimento (Veselá & Friedrich, 2009).

Queratinases também têm aplicações na indústria cosmética e farmacêutica em produtos onde o colágeno não pode ser degradado. A queratinase é um dos ingredientes em loções depilatórias, em fórmulas tópicas para eliminação de queratina da acne ou psoríase, remoção de calo humano e

remoção de cicatrizes e regeneração do epitélio, acelerando o processo de cura (Holland, 1993; Vignardet et al., 2001; Brandelli, 2010). Também pode ser usada na indústria alimentícia; na produção de filmes e colas biodegradáveis; e na limpeza de seda e lã.

Algumas queratinases atuam em meios não aquosos, na presença de solventes orgânicos, sendo úteis na produção de peptídeos e aminoácidos raros como serina, cisteína e prolina com um substrato de baixo custo (Prakash et al., 2010), apresentando vantagens frente a síntese química (Gupta et al., 2005). Queratinases alcalinas têm especial aplicação na indústria de detergentes, na remoção de sujeiras difíceis como, por exemplo, a do colarinho de camisas (Gupta & Ramnani, 2006).

Novas aplicações promissoras vêm surgindo como a produção de plásticos biodegradáveis, utilizando fibras de queratina para produzir polímeros degradáveis à temperatura ambiente (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli, 2008); e a hidrólise de príons, podendo utilizar as queratinases como descontaminantes de instrumentos de precisão susceptíveis a tal contaminação, bem como na descontaminação de carcaças de animais, que poderiam ser novamente aproveitadas para a utilização como ração (Brandelli, et al., 2010).

3.6 Produção de queratinases

O custo da produção enzimática e de seu processamento são os maiores obstáculos para o sucesso na utilização comercial das proteases. Diversos estudos têm se focado na tentativa de aumentar o rendimento

enzimático e satisfazer os requerimentos da indústria. Dentre algumas opções estão a procura por micro-organismos que produzam níveis elevados da enzima; clonagem e super-expressão; cultivo em batelada alimentada entre outros tipos de fermentadores; e otimização do meio de cultivo através do uso de métodos estatísticos (Gupta et al., 2002a).

3.6.1 Métodos moleculares

O gene codificador da queratinase de bactérias do gênero *Bacillus* vem sendo estudado (Brandelli et al., 2010). Lin et al. (1995) sequenciaram o gene da queratinase (*kerA*) de *B. licheniformis* PWD-1, o qual apresentou 97% de similaridade ao gene codificante da subtilisina de Carlsberg do mesofílico *B. licheniformis* NCIMB 6816, apresentando os resíduos conservados Asp-32, His-63 e Ser-220 no sítio ativo.

A queratinase KerRP de *B. licheniformis* RPK, apresentou 99% de homologia com *kerA* e 98% com a subtilisina de Carlsberg (Fakhfakh et al., 2009). Da mesma forma, a queratinase de *B. licheniformis* MKU3, apresentou 99% de similaridade tanto com *kerA* quanto com a subtilisina de Carlsberg (Radha & Gunasekaran, 2007), mantendo conservados os três aminoácidos do sítio catalítico.

As queratinases de *Bacillus* são comumente associadas com a atividade de serinoproteases (Brandelli et al., 2010). O gene *aprA*, codificador de serinoproteases alcalinas, foi clonado de uma linhagem de *B. subtilis* degradadora de penas com significativa similaridade e homologia com subtilisinas (Zaghloul, 1998a). Apesar da limitada informação sobre

queratinases purificadas de *B. subtilis*, a maioria se assemelha às subtilisinas. Contudo, a similaridade das queratinases à subtilisina de Carlsberg não se limita ao gênero *Bacillus*. O micro-organismo termofílico degradador de penas *Fervidobacterium pennavorans* produtor da queratinase fervidolisina, gene *fls*, também apresentou alta homologia com proteases do tipo subtilisina (Kluszens et al., 2002).

O isolamento e clonagem de genes que codificam proteases têm sido utilizados na engenharia de micro-organismos capazes de superexpressar tais genes, otimizando sua produção (Gupta et al., 2002a). Os micro-organismos hospedeiros comumente utilizados para tal finalidade, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, nem sempre resultam em aumento de rendimento. Isso se deve à instabilidade do plasmídeo durante a fermentação ou às deficiências no enovelamento e processamento pós-traducional realizado pelo hospedeiro original (Friedrich & Antranikian, 1996; Wang & Shih, 1999; Wang et al., 2003a).

Apesar disso, há relatos de eficiência no aumento da expressão do gene da protease. Zaghloul (1998a) clonou uma protease alcalina de *B. subtilis* em plasmídeo, resultando em alta expressão, estabilidade e degradação de penas. Noronha et al. (2002) purificaram, clonaram e expressaram com sucesso o DNAC da queratinase do fungo *Aspergillus fumigatus* na levedura patogênica *Pichia pastoris*. Wang et al. (2004) realizaram a integração cromossomal de várias cópias do gene da queratinase no *B. subtilis* DB104 e no *B. licheniformis* T399D, resultando em estabilidade e aumento no rendimento da queratinase.

Poucos trabalhos relatam o isolamento de genes de metaloproteases, que são mais relacionadas às bactérias Gram negativas (Brandelli et al., 2010). A sequência completa de DNA e aminoácidos da metaloprotease queratinolítica de *Pseudomonas aeruginosa* foi recentemente reportada (Lin et al., 2009) e apresentou pouca homologia com outras queratinases microbianas.

Bach et al. (2001) desenvolveram *primers* e marcadores funcionais para a detecção de fragmentos do gene de peptidases de bactérias proteolíticas, baseados em dados de sequências de DNA. Os *primers* degenerados codificam metalopeptidases alcalinas (*apr*), metalopeptidases neutras (*npr*) e serinopeptidases (*sub*). Os genes *apr* foram apenas encontrados em micro-organismos do biotipo de *Pseudomonas fluorescens* e em isolados do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*. A maioria dos *Bacillus* spp. amplificou tanto o gene *sub* quanto o *npr*, enquanto que em isolados do grupo *Cytophaga-Flavobacterium* pode-se detectar os três genes.

3.6.2 Planejamento fatorial

A forma mais comum de otimizar a produção de proteases é através do estudo dos efeitos das diferentes variáveis que possam estar atuando no cultivo bacteriano para resultar no produto final (Kumar & Takagi, 1999). Essa otimização, pelos métodos clássicos, consiste em estudar as variáveis uma de cada vez (concentração de nutrientes, pH, temperatura), fixando as demais num determinado nível. Porém esse método é moroso, pode ter alto custo para

um grande conjunto de variáveis e não avalia as interações entre elas (Myers & Montgomery, 2002).

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de respostas é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Box et al., 1978). O modelo experimental de Box-Behnken utiliza variáveis independentes para obter uma combinação de valores que otimizam a resposta dentro de uma região, utilizando um número reduzido de experimentos (Anbu et al., 2005). Com esse método as variáveis são analisadas e otimizadas simultaneamente, e é possível calcular o erro experimental e o nível de confiança estatística dos resultados obtidos.

3.7 Purificação

As proteases alcalinas são comumente utilizadas comercialmente na forma bruta (Kumar & Takagi, 1999) ou parcialmente purificadas como na indústria alimentícia e de detergentes (Corrêa et al., 2009). Contudo, para algumas aplicações como na medicina, e para melhor compreender o funcionamento da enzima, se faz necessário utilizar métodos de purificação. A técnica a ser utilizada vai depender do micro-organismo, da enzima e principalmente do custo-benefício do produto para a empresa.

Como a quantidade de enzima presente no sobrenadante de um cultivo é geralmente pequena, aplicam-se métodos para concentrá-la, principalmente, pela remoção da água. A água pode ser removida por

centrifugação ou separações por membrana, como por ultrafiltração. A ultrafiltração é um método muito utilizado por ter baixo custo, resultar em baixa perda de atividade enzimática e fornecer além de concentração, purificação. Porém as desvantagens são a incrustação e o entupimento da membrana que requer manutenção minuciosa (Kumar & Takagi, 1999).

A precipitação é outro método comumente utilizado para o isolamento e recuperação de proteínas do seu extrato bruto, também sendo utilizada como passo de purificação e concentração. Geralmente, utilizam-se reagentes como sais ou solventes orgânicos que reduzem a solubilidade da proteína em soluções aquosas. A precipitação também pode ser realizada por polímeros neutros e solúveis como o polietilenoglicol (PEG) e carvão ativado, ou pelo método de liofilização, entre outros (Gupta et al., 2002b).

Métodos cromatográficos são comumente aplicados, muitas vezes mais de um deles, para atingir a purificação de uma enzima (Corrêa et al, 2009). A cromatografia de gel filtração separa moléculas de acordo com seu tamanho através da utilização de resinas com diferentes tamanhos de poros. A cromatografia de troca iônica separa moléculas de acordo com sua carga, através da aplicação de diferentes gradientes de pH e sais. Já a cromatografia por adsorção se baseia nas interações hidrofóbicas das moléculas, enquanto que a cromatografia por afinidade separa moléculas baseada nas suas interações biológicas. Contudo, a cromatografia por afinidade não é recomendada para uso comercial pelo seu alto custo e instabilidade de alguns ligantes (Kumar & Takagi, 1999).

Um método de purificação indicado para o uso industrial devido ao seu baixo custo é o sistema aquoso bifásico. Essa técnica tem sido utilizada para purificar proteases utilizando misturas de polietilenoglicol (PEG) e dextrano ou PEG e sais.

Soluções de proteases estão sujeitas à degradação proteolítica e autólise que resultam em rápida inativação da atividade enzimática. Para manter a viabilidade destes biocatalisadores, tem se utilizado a adição de estabilizantes, conservantes e em alguns casos, realiza-se a liofilização do preparo enzimático.

Há estudos para aplicação das queratinases imobilizadas em suportes que aumentam sua estabilidade, diminuindo sua autólise e com possibilidade de recuperação e reuso da enzima (Kumar & Takagi, 1999; Brandelli et al., 2010). Há também a possibilidade de encapsulamento da enzima em nanopartículas. Partículas revestidas com polímeros aumentam sua compatibilidade com ingredientes orgânicos, reduzem sua susceptibilidade à lixiviação e protegem a superfície de danos externos. Muitas vezes podem também aumentar a dispersibilidade, estabilidade e redução da toxicidade (Konwarh et al., 2009). Konwarh et al. (2009) imobilizaram a queratinase de *B. subtilis* em nanopartículas de PEG e obtiveram aumento na atividade enzimática de quatro vezes. Os autores sugerem um aumento na interação entre enzima e substrato devido a possível modulação estrutural ou a melhor exposição do sítio ativo da enzima causada pela imobilização.

3.7.1 Sistema aquoso bifásico

O processamento das enzimas é geralmente responsável por 50-80% do custo total de sua produção. Os métodos convencionais usados para a purificação de proteínas são comumente dispendiosos por envolver muitos passos; utilizar reagentes caros e poluentes; ser pouco reprodutíveis; ser de difícil transposição para escalas industriais e poder resultar em grandes perdas do produto desejado (Boeris et al., 2009). Neste contexto, recentemente tem surgido o interesse por alternativas para os atuais métodos de separação e de purificação, que sejam viáveis economicamente, apropriados para preservar a atividade biológica das proteínas e que sejam menos poluentes.

Um método que atende a estas necessidades é o sistema aquoso bifásico (SAB). O SAB é um método que vêm sendo utilizado com sucesso, desde o final da década de 50, na extração de biopartículas como vírus, ácidos nucleicos e proteínas (Sinha et al., 1996; Lima et al., 2002; Oliveira et al., 2002); compostos inorgânicos e orgânicos; a partir da metade dos anos 80, para extração de íons (Silva et al., 2006); e mais recentemente, para estudos de proteômica (Everberg et al., 2006) e para extração de corantes (Mageste et al., 2009).

A formação espontânea do SAB ocorre quando dois polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis (PEG e dextrano), ou um polímero (PEG) e um sal inorgânico são misturados em água, desde que determinadas condições termodinâmicas críticas sejam estabelecidas, isto é, em uma faixa específica de temperatura, pressão e composição dos constituintes. Dessa mistura ocorre a separação em duas fases imiscíveis, sendo que uma das

fases formadas será rica em polímero e a outra, rica em sal. Em ambas, predomina a água (80 a 90%) e há baixa tensão interfacial (Oliveira et al., 2002; Silva et al., 2006).

Como são constituídos majoritariamente por água, sendo os seus demais componentes formadores (polímeros e sais inorgânicos) não tóxicos nem inflamáveis, isso o torna um sistema de extração ambientalmente seguro (Kaul, 2001). O polímero PEG é biodegradável, porém sais como os fosfatos requerem alguns cuidados em seu descarte. Esta limitação pode ser superada com a reutilização dos reagentes.

Além disso, o SAB é vantajoso por possuir a possibilidade de purificação em larga escala e seus constituintes serem comercialmente acessíveis e de baixo custo (Silva et al., 2006), se comparados com os métodos atualmente utilizados.

Contudo, a sua aplicação biotecnológica tem sido inibida pelo alto custo dos polímeros quando numa escala industrial e dificuldades em sua reutilização (Kaul, 2001). O fracionamento do dextrano possui alto custo, enquanto que o dextrano cru é mais barato, porém de difícil manejo visto que seu alto peso molecular o torna muito viscoso. Existem polímeros alternativos para o alto custo desses reagentes sendo avaliados como o pululano (exopolissacarídeo fúngico), os derivados de amido, os copolímeros acrílicos polianfolíticos e até a goma de cajueiro (Oliveira et al., 2002). O SAB utilizando PEG e sal representa uma redução no custo do processo e tem sido preferencialmente estudado (Palomares et al., 2004).

Outro empecilho para sua larga utilização é a complexidade de se estabelecer as concentrações e proporções corretas para a eficiente partição do produto desejado, visto que os mecanismos que causam a distribuição desigual das biomoléculas são pouco conhecidos (Kaul, 2001; Oliveira et al., 2002). O comportamento de partição depende de inúmeras propriedades físico-químicas associadas ao sistema como a natureza química do polímero e da amostra (peso molecular, carga, forma, hidrofobicidade da superfície, sítios de ligação), pH, temperatura, entre outras (Silva et al., 2006). São poucos os estudos que detalham os passos necessários para a aplicação dessa técnica, que quando possui um protocolo estabelecido, apresenta inúmeras vantagens (Palomares et al., 2004). Com a utilização do SAB, há relatos de purificação de biomoléculas em apenas um passo (Sinha et al., 1996; Lima et al., 2002; Ferreira et al., 2007).

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos micro-organismos

4.1.1 Meios de cultivo e diluentes

As penas de frango utilizadas como componente do meio de cultura caldo pena (CP) foram cedidas em lotes de 2 kg pela empresa Avipal (Porto Alegre, RS) e mantidas congeladas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A lavagem das penas seguiu o protocolo descrito por Bernal (2006a) com modificações. As penas foram imersas em uma solução do detergente Triton X-100 1% por 24 horas com posteriores lavagens em água destilada e retirada das impurezas, como unhas, bicos, sangue e pedaços de pele. Esse material foi seco durante 30 min por ar aquecido com resistência de 350 W.

A farinha de pena utilizada como componente do meio de cultura caldo farinha de pena (CFP) e ágar farinha de pena (AFP) foi obtida a partir do processamento de penas por cocção sob pressão e moagem realizado pela empresa Bunge (Esteio, RS) em amostras de 1 kg. Além da fonte de queratina a 1 %, estes meios possuem $0,5\text{ g L}^{-1}$ de NaCl, $0,3\text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $0,4\text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e o AFP possui ainda 15 g L^{-1} de ágar bacteriológico.

Para os testes de proteólise utilizou-se ágar leite (AL) contendo peptona de carne $5,0\text{ g L}^{-1}$, extrato de levedura $3,0\text{ g L}^{-1}$, ágar bacteriológico 12 g L^{-1} e leite desnatado 100 mL L^{-1} . Além disso, foram utilizados os meios caldo

triptona caseína de soja (TSB, Mast Diagnostics, Merseyside, UK), ágar triptona caseína de soja (TSA, Mast Diagnostics, Merseyside, UK) e o diluente solução salina ($\text{NaCl } 8,75 \text{ g L}^{-1}$). Todos os meios de cultura, diluentes, ponteiros e microtubos de plástico de 1,5 mL foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min.

4.1.2 Micro-organismos

As bactérias de solo de mata atlântica (nomeados com letras de A-T), foram previamente isoladas e, juntamente com bactérias amazônicas (denominadas BLs), foram selecionadas quanto à proteólise em AL e quanto à degradação de penas, além de serem parcialmente identificadas (Bach, 2008). As bactérias amazônicas, que se encontram na bacterioteca do laboratório, foram fornecidas pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e pela professora Siu Miu Tsai da Universidade de São Paulo (USP). Estes isolados foram reativados em TSA e testados quanto a sua proteólise pela formação de halo em AL e crescimento no AFP 1%. No total, foram utilizados 10 isolados de mata atlântica e 23 isolados amazônicos, 8 BLs (UFAM) e 15 BCMs (USP).

4.1.3 Manutenção e estoque dos micro-organismos

As culturas selecionadas foram armazenadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em placas de AFP, sendo semeadas a cada 15 dias, além de serem estocadas no meio TSB ajustando a 20% de glicerol e armazenando a temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Todas inoculações e demais procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical, marca Pachane, modelo PA-115.

4.1.4 Atividade proteolítica em Ágar Leite

As bactérias amazônicas que apresentaram crescimento em AFP e formação de halos em AL tiveram sua atividade proteolítica avaliadas em AL nas temperaturas de 30, 37, 44 e 55 °C. As avaliações foram realizadas em duplicata depois de 24 e 48 horas. Os resultados foram expressos pelo cálculo da relação entre o diâmetro de halo obtido e o diâmetro de crescimento da colônia (halo/crescimento) (Pillai & Archana, 2008).

4.1.5 Hidrólise de penas e farinha de penas

Os micro-organismos formadores de halos em AL foram inoculados em duplicata por raspagem da placa de AFP em 4 mL de meio CFP e CP e incubados em agitador orbital a 30 °C por 11 dias a 125 rpm. O meio CP possui a queratina como única fonte de carbono, nitrogênio e energia. A análise visual da hidrólise da farinha de pena e das penas foi realizada diariamente.

Para corroborar o resultado visual, a proteína solúvel foi quantificada pelo método descrito por Lowry et al. (1951). Foram utilizados dois reagentes, o reagente combinado (RC) preparado com 0,5 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% e 0,5 mL de solução de tartarato de Na/K 1% e completado para 50 mL com Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1N; o reagente de Folin- Ciocalteau (FC) é diluído na proporção de 1:1 com água destilada.

O sobrenadante do cultivo de 11 dias do CFP e CP foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min e utilizado para a reação. Misturou-se 100 µL do sobrenadante (diluído ou não) com 2,5 mL de RC, que foi deixado por 10 min à

temperatura de 37 °C em banho-maria. Após, adicionou-se 300 µL do reagente de FC diluído e deixado a temperatura ambiente no escuro por 30 min.

As determinações de proteína solúvel foram realizadas em duplicata para cada tubo, somando quatro quantificações por micro-organismo. A absorbância foi mensurada a 750 nm em espectrofotômetro (Hitachi U-1100, Tóquio, Japão). Paralelamente foi preparado o branco com amostra do meio de cultura nas mesmas diluições das amostras, mas sem inoculação do micro-organismo, somado dos reagentes. A curva-padrão foi realizada com albumina sérica bovina (Sigma, EUA).

4.2 Identificação dos isolados

Os micro-organismos que apresentaram atividade proteolítica pela formação de halo em AL, hidrólise visual de penas e farinha de pena, além de produção de proteína solúvel foram identificados através do sequenciamento do fragmento 16S do DNA ribossomal.

4.2.1 Extração de DNA

As extrações de DNA total foram realizadas ressuspendendo células centrifugadas em tampão de extração (NaCl 1,4 M; Tris- HCl, pH 8,0, 100 mM; EDTA, pH 8,0, 20 mM; Polivinilpirrolidona (PVP -40) 1%; CTAB 2%; Proteinase K 100 µg/mL; β-mercaptoetanol 0,2%; em Água mili-Q) (Doyle & Doyle, 1990). Após homogeneização, os microtubos de plástico foram incubados em banho-maria por 30 min à 65 °C e adicionados de CIA 24:1 (clorofórmio: álcool isoamílico). Após nova homogeneização, os tubos foram centrifugados (13.000

x g por 7 min) e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Quando necessário, o mesmo procedimento foi realizado com a utilização de fenol. Adicionou-se novamente o tampão de extração, sem proteinase K, seguido de homogeneização e centrifugação. Novamente acrescentou-se CIA e após centrifugação, precipitou-se o DNA com 1 volume de isopropanol. O material foi lavado com etanol 70 % e seco a temperatura ambiente. Após, ressuspendeu-se o DNA em Tris-RNase (10mM Tris-HCl, pH 8,0 + 10µg/mL de RNase) e incubou-se em banho-maria a 37 °C por 30 min.

Quando necessário, foi realizada a extração da banda de DNA a partir de um gel de agarose *low melting point* 0,1% utilizando o kit de purificação a partir do gel GFX (GE Healthcare).

4.2.2 Reação de PCR

A amplificação do fragmento 16S do DNA ribossomal foi realizada a partir de uma reação de PCR de 25 µL utilizando 5 pmol/µL dos *primers* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). A PCR foi realizada com o uso da *Taq* polimerase Platinum® (Invitrogen), desnaturando por 4 min a 94 °C seguido por 30 ciclos nas seguintes condições: 1 min a 94 °C, 30 s a 55 °C, 2 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação QIAquick PCR (Qiagen). A qualidade do DNA, da PCR e da purificação de PCR foi verificada em gel de agarose 0,9%. Foram utilizados os marcadores de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen) e pGEN 200 pb (Applied Biosystems).

4.2.3 Sequenciamento e identificação

O sequenciamento do fragmento de 1500 pb foi obtido com a utilização de oito *primers*, fD1, rD1, 341-357f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 357-341r (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3'), 685-704f (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3'), 704-685r (5'-TCTACGSATTTACCCSCTAC-3'), 1099-1114f (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3') e 1114-1099r (5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3') (Lane, 1991). A reação do sequenciamento consistiu em utilizar uma concentração de 30 a 60 ng de DNA purificado, adicionando 4,5 pmol dos *primers* e 2 µL de BigDye Terminator RR-100 (Applied Biosystems) num volume final de 10 µL, em sequenciador automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas automaticamente (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems/HITACHI) e editadas através do *software* Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998). As bactérias foram então identificadas buscando sequências homólogas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e tiveram suas sequências depositadas.

Para um dos isolados foi também realizada a identificação bioquímica utilizando a cartela ID32GN no sistema semiautomático mini-API (bioMérieux).

4.3 Crescimento em diferentes meios de cultivo

4.3.1 Preparação do pré-inóculo e inóculo

As bactérias selecionadas foram submetidas a crescimento em meios de cultivo contendo diferentes resíduos queratinosos para avaliar sua capacidade

de degradação. Todos os meios continham o meio mineral descrito no item 4.1.1 adicionados de 1% do resíduo queratinoso.

Foram utilizados os resíduos de β -queratina, farinha de pena e pena em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL do CFP e do CP. Utilizou-se 5% de um pré-inóculo de 50 mL de CFP de 24 horas sob agitação em agitador orbital a 30 °C. Para verificação de proteólise utilizou-se a medição de pH e quantificação de proteína solúvel como descrito no item 4.1.5 em 24 e em 48 horas. Para a atividade proteolítica e queratinolítica utilizou-se os sobrenadantes dos cultivos de CP de 48 horas com os substratos específicos azocaseína e azoqueratina, respectivamente, como descrito nos itens 4.3.2 e 4.3.4.

Os resíduos de α -queratina, cabelo humano e lã de ovelha, foram lavados como descrito no item 4.1.1 e utilizados para preparo do caldo cabelo (CCab) e caldo lã (CL), respectivamente. O pré-inóculo foi realizado como mencionado acima para um inóculo de 100 mL de CCab. O CL foi inoculado por alçada em tubos de 4 mL. Ambos os substratos foram mantidos sob cultivo por 15 dias em um agitador orbital a 125 rpm, 30 °C e tiveram seu pH, proteína solúvel e peso seco quantificados (item 4.3.5).

4.3.2 Determinação da atividade proteolítica

O ensaio utilizando o substrato azocaseína para determinação da atividade proteolítica foi realizado segundo método descrito por Daroit et al. (2009). Azocaseína 1% foi diluída em tampão Tris-HCl (0,1 M, pH 7,0). Alíquotas de 300 μ L dessa suspensão foram adicionados a 100 μ L do mesmo tampão e a esses, foi adicionado 100 μ L do extrato bruto do cultivo bacteriano.

Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 min e tiveram sua reação enzimática interrompida pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% seguida de centrifugação por 5 min a 10.000 x g. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 200 µL de NaOH 1,8 N e sua absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm. Os brancos foram preparados da mesma forma, exceto pela adição de TCA 10% antes da adição do extrato bruto. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi considerada como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,1 nas condições do ensaio.

4.3.3 Produção de azoqueratina

O substrato específico para avaliação de atividade queratinolítica, a azoqueratina, foi produzida como descrito por Tomarelli et al. (1949), com modificações.

O substrato foi preparado suspendendo-se 56,6 g de farinha de pena (citada no item 4.1.1) em 112 mL de bicarbonato de sódio 10% acrescentando-se água destilada sob agitação até completar 1120 mL. Separadamente, foi preparada uma solução de 0,034 M de ácido sulfanílico em 137 mL de água destilada em ultrassom, acrescentando-se 0,027 M de hidróxido de sódio (NaOH) em 13,7 mL de água destilada e 1,86 g de nitrito de sódio. Essa solução foi agitada e misturada com 0,04 M de ácido clorídrico que, após 2 min em agitação, foi acrescida de 0,055 M de NaOH em 6,86 mL de água destilada.

Ambas as soluções foram misturadas sob vigorosa agitação durante 5 min. O excesso de reagentes foi removido por diálise contra água destilada

por aproximadamente sete dias. O material resultante foi secado em estufa Biopar a 30 °C e submetida à maceração em gral para posterior utilização.

4.3.4 Atividade queratinolítica

A atividade queratinolítica foi avaliada com método similar ao descrito no item 4.3.2 exceto pela utilização do substrato específico azoqueratina. O substrato foi pesado (0,1g/ml) em microtubos de plástico que foram acrescidos de 400 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 e 100 µL do extrato bruto. Os tubos foram incubados por 1 hora, com homogeneizações a cada 10 min, em banho-maria a 37 °C. A reação enzimática foi também interrompida pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% seguida de centrifugação por 5 min a 10.000 x g. Ao sobrenadante coletado foram adicionados 200 µL de NaOH 1,8 N e sua absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm. Os brancos foram preparados da mesma forma, exceto pela adição de TCA 10% antes da adição do extrato bruto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi considerada como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,1 nas condições do ensaio.

4.3.5 Avaliação de degradação pelo peso seco

Após 15 dias, os cultivos de CCab e CL foram filtrados em filtro Whatman nº 1 pré-pesados, lavados com água destilada e foram deixados secar em estufa de 37 °C até atingir peso constante. O peso final foi diminuído

do peso do filtro e o resultado foi expresso em porcentagem de degradação, considerando o peso inicial do substrato como 100%.

4.4 Curva de crescimento

4.4.1 Preparação do pré-inóculo

As colônias da bactéria selecionada foram coletadas por raspagem de uma placa de AFP, inoculadas num frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de CFP e incubadas a 30 °C num agitador orbital (Nova Técnica, modelo NT711a), 125 rpm, por 24 horas.

4.4.2 Preparação do inóculo

Uma alíquota de 5% do inóculo foi adicionada em duplicata a frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de CFP. Esses frascos foram incubados em agitador orbital a 30 °C, 125 rpm por até 120 horas.

4.4.3 Amostragem

Alíquotas foram coletadas a cada 4 horas nas primeiras 48 horas e após, em intervalos de 12 e 24 horas para a avaliação da curva de crescimento por contagem do número de células viáveis; do pH através de fitas medidoras (Macherey-Nagel, RF Química); peso seco; densidade ótica; produção de proteína solúvel como descrito no item 4.1.5; atividade enzimática como descrito no item 4.3.2; e formação de grupos tiol.

4.4.4 Determinação do número de células viáveis

A contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) foi realizada em meio sólido. A suspensão bacteriana foi diluída em solução salina 0,87% de 10^{-1} a 10^{-9} . As amostras foram homogeneizadas e aplicadas em três repetições de 20 μ L por quadrante da placa de Petri contendo TSA (Miles & Misra, 1938). As placas foram incubadas por 24 horas, a 30 °C em estufa incubadora, marca Biopar. A contagem foi efetuada na diluição onde as colônias apresentavam-se isoladas, entre um mínimo de 30 e no máximo de 100 colônias, em um contador de colônias (Phoenix CP 608). Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.4.5 Peso seco e densidade ótica

Alíquotas de 1 mL do cultivo bacteriano foram centrifugadas (14.000 x g por 7 min), tiveram seu sobrenadante descartado e o *pellet* seco em microtubos de plástico pré-pesados em estufa a 37 °C. O peso seco foi determinado depois do microtubo atingir peso constante, que foi diminuído do seu peso inicial. Além disso, alíquotas de 1 mL do cultivo bacteriano tiveram sua absorvância mensurada em espectrofotômetro a 600 nm.

4.4.4 Determinação de cisteína livre

Para a determinação de cisteína livre foi utilizado o método descrito por Sangali e Brandelli (2000). Foi adicionado a 1 mL do extrato bruto 0,2 mL de NH_4OH , 1 mL de 0,5 g de NaCN L^{-1} e 1 mL de água destilada. A mistura foi incubada por 20 min a 25 °C e então se adicionou 0,2 mL de uma solução

contendo 0,5 g de nitroprussiato de sódio L⁻¹. Um branco foi realizado da mesma forma exceto pela adição de 1 mL de NaCN, em seu lugar foi adicionado água. A absorvância da amostra foi medida a 530 nm dentro de 2 min. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e comparados com a curva padrão realizada com cisteína.

4.5 Caracterização do extrato bruto

4.5.1 Produção da enzima

Amostras do tempo de atividade enzimática máxima foram utilizadas para a caracterização do extrato bruto. A produção da enzima foi realizada de acordo com o descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2. O sobrenadante foi centrifugado (14.000 x g por 7 min), transferido para um novo microtubo de plástico e congelado a -4 °C até utilização.

4.5.2 Determinação do pH ótimo

Para determinar o pH ótimo da enzima o ensaio com azocaseína foi utilizado (item 4.3.2), diluindo o substrato nos diferentes tampões. Foram testados os pH de 5,0-10,0 com alguns intervalos de 0,5 unidades. Foram utilizados os tampões citrato 0,1 M para os pHs entre 5,0-6,5 e os tampões Tris- HCl 0,1 M para os pHs entre 7,0-10,0. Todos os ensaios foram realizados em duplicata com um branco para cada condição. Os resultados foram expressos como atividade relativa, considerando o pH no qual a enzima apresentou melhor atividade enzimática como 100%.

4.5.3 Determinação da temperatura ótima

Para determinar a temperatura ótima da enzima o ensaio com azocaseína foi utilizado (item 4.3.2), utilizando o tampão de pH com melhor atividade enzimática. Os ensaios foram realizados incubando os microtubos de plástico em banho-maria nas temperaturas de 30 a 80 °C, com alguns intervalos de 5 °C. Todos ensaios foram realizados em duplicata com um branco para cada condição. Os resultados foram expressos como atividade relativa, considerando a temperatura na qual a enzima apresentou melhor atividade enzimática como 100%.

4.5.4 Zimograma

O zimograma foi baseado no método descrito por Hmidet et al. (2009), com modificações. O extrato bruto do cultivo bacteriano foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), na temperatura ambiente, sem pré-aquecimento. Após eletroforese, foi realizada a lavagem do gel duas vezes por 30 min com tampão Tris-HCl 0,1 M contendo 2,5% de Triton X-100. Realizou-se nova lavagem com o mesmo tampão sem o detergente por 60 min. Posteriormente, o gel foi submerso em uma solução do mesmo tampão com caseína (1%) e incubado *overnight* a temperatura ambiente. Por fim, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorado com solução descorante (ácido acético 10% e metanol 50% em água miliQ). As bandas de protease aparecem como zonas claras no fundo azul do gel.

Diferentes tampões foram utilizados para cada micro-organismo. Foram preparados os tampões citrato 0,1 M (pH 6,0), Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) e Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), para os isolados P3, A22 e K12, respectivamente.

Outro zimograma foi realizado da mesma forma citada anteriormente, porém com a adição de 10 mM (concentração final) dos inibidores de protease PMSF e EDTA aos tampões de lavagem e de incubação dos géis.

4.5.5 Efeito de reagentes

O ensaio com azocaseína foi realizado (item 4.3.2) com o tampão de pH com melhor atividade enzimática e incubando os tubos de plástico na temperatura de 50 °C. Diferentes substâncias químicas foram adicionadas ao tampão para verificar seu efeito sob a atividade enzimática. Foram testados os inibidores de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)- 5mM, bem como os diferentes sais (NaCl, CaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, MnCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄ e ZnSO₄)- 10mM; solventes orgânicos: isopropanol, acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO)- 1 e 5%; detergentes: Triton X-100- 0,1 e 0,5% e dodecil sulfato de sódio (SDS)- 10mM; e os agentes redutores: β-Mercaptoetanol e ditioneitol (DTT)- 0,1 e 0,5%.

4.6 PCR para metaloprotease

O DNA dos isolados foi extraído como descrito no item 4.2.1. A amplificação do fragmento do gene de metaloprotease (Bach et al., 2001) foi

realizada a partir de uma reação de PCR de 25 µL utilizando 5pmoL/µL dos *primers* degenerados *apr I* (5'-TAY GGB TTC AAY TCC AAY AC-3') e *apr II* (5'-VGC GAT SGA MAC RTT RCC-3'). A PCR foi realizada com o uso da *Taq* polimerase Platinum® (Invitrogen), desnaturando por 10 min a 94 °C seguido por 35 ciclos nas seguintes condições: 1 min a 94 °C, 30 s a 50 °C, 30 s a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. A qualidade da PCR foi verificada em gel de agarose 1,5%.

4.7 Otimização da produção da enzima

4.7.1 *Chryseobacterium indologenes*

A produção da enzima da linhagem A22 foi otimizada utilizando a metodologia do planejamento fatorial completo, associada à análise de superfícies de resposta. Foram avaliadas diferentes condições de pH e concentração de substrato num modelo experimental de 2^2 com 4 repetições do ponto central, num total de 12 experimentos. No modelo estatístico, as variáveis codificadas e independentes correspondem ao pH (x_1) e concentração de farinha de pena (x_2); a atividade enzimática e variável dependente (Y); e b_0 , b_1 , b_2 , b_{12} , b_{11} , b_{22} que representam parâmetros do modelo. O modelo de equação para as duas variáveis está demonstrado na Eq1:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

O pré-inóculo foi preparado como mencionado no item 4.4.1. Uma alíquota de 5% do inóculo foi adicionada a frascos Erlenmeyer de 500 mL

contendo 100 mL de CFP. A concentração do substrato farinha de pena e o pH foram variados conforme o planejamento fatorial 2^2 mostrado na tabela 8. Foram preparados o tampão citrato 0,1 M para o pH 5,0 e 5,6 e o tampão Tris-HCl 0,1 M para os pH entre 7,0 e 9,0. Esses frascos foram incubados em agitador orbital a 125 rpm, a 30 °C.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 48 horas para a realização dos ensaios enzimáticos (item 4.3.2). O *software* Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc., USA) foi utilizado para as análises de regressão dos resultados experimentais. A significância do modelo foi determinada pelo teste-*F* (*Fischer's F-Test*) e a adequação do método pelo coeficiente de determinação R^2 .

4.7.2 *Serratia marcescens*

A produção da enzima da linhagem P3 foi otimizada utilizando a metodologia do planejamento fatorial completo, associada à análise de superfícies de resposta. Foram avaliadas diferentes condições de pH, temperatura e concentração de substrato num modelo experimental de 2^3 com 4 repetições do ponto central, num total de 18 experimentos. No modelo estatístico, as variáveis codificadas e independentes correspondem ao pH (x_1), concentração de farinha de pena (x_2) e temperatura (x_3); a atividade enzimática é a variável dependente (Y); b_0 é o coeficiente independente; b_1 , b_2 , b_3 são os coeficientes lineares; b_{11} , b_{22} , b_{33} que representam os coeficientes quadráticos; e b_{12} , b_{13} , b_{23} os coeficientes de interação. O modelo de equação para as três variáveis está demonstrado na Eq2:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

O pré-inóculo foi preparado como mencionado no item 4.4.1. Uma alíquota de 5% do inóculo foi adicionada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de CFP. A concentração do substrato farinha de pena e o pH foram variados conforme o planejamento fatorial 2^3 mostrado na tabela 10. Foram preparados o tampão citrato 0,1 M para o pH 5,0 e o tampão Tris- HCl 0,1 M para os pH entre 6,0-10,0. Estes frascos foram incubados em agitador orbital a 125 rpm, variando a temperatura.

Alíquotas de 500 μ L foram retiradas nos tempos de 24, 36 e 48 horas com as quais ensaios enzimáticos foram realizados, como descrito no item 4.3.2. Os dados foram analisados estatisticamente como no item 4.7.1. A significância dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste-*T* (*Student's t test*) e pelo teste do valor-*p*; a significância do modelo foi determinada pelo teste-*F* (*Fischer's F-Test*) e a adequação do método pelo coeficiente de determinação R^2 .

4.8 Purificação da enzima

4.8.1 Sistema aquoso bifásico

Amostras obtidas conforme item 4.5.1 foram submetidas a purificação pelo sistema aquoso bifásico (SAB). Foram preparadas soluções estoque de polietilenoglicol (PEG) 4000 e de diferentes sais como citrato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de zinco e sulfato de magnésio, todos na

concentração de 50% em água. Em tubos de centrífuga foram homogeneizados 4 mL de PEG e 4 mL do sal a ser testado com posterior adição de 2 mL do sobrenadante bruto. Essa solução foi novamente homogeneizada e submetida à centrifugação a 4 °C, 3000 x g por 10 min para separação das fases. Alíquotas da fração superior e inferior dos sistemas com os diferentes sais foram coletadas e utilizadas para os ensaios de atividade enzimática (item 4.3.2) e quantificação de proteína, que foram utilizados para os cálculos de atividade específica, fator de purificação, rendimento e para os coeficientes de partição (K_c e K_p). K_c é o coeficiente da atividade proteolítica calculado dividindo a atividade da fase superior pela atividade da fase inferior, enquanto que K_p é o coeficiente de proteína solúvel calculado dividindo a proteína da fase superior pela proteína da fase inferior.

4.8.2 Quantificação de proteína

Para a quantificação de proteínas presentes em ambas as frações, foi realizado o método do ácido bicinonínico (BCA) utilizando o kit para ensaio Pierce[®] de acordo com o fabricante (Thermo scientific). O ensaio foi realizado em microplacas adicionando-se 25 µL da amostra a 200 µL do reagente de BCA (solução ácido bicinonínico acrescido de sulfato de cobre 1:50 v/v). Após incubação de 30 min em estufa a 37 °C foi realizada a leitura da absorbância a 562 nm em leitor de microplaca (Spectramax, Sunnyvale, Califórnia, USA). A quantificação foi realizada em duplicata e a curva-padrão foi realizada com albumina sérica bovina (Sigma, EUA). Amostra do sistema aquoso bifásico contendo água destilada ao invés da enzima foi considerada como controle.

4.8.3 SDS-PAGE

As frações que apresentaram melhor atividade específica foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo método descrito por Laemmli (1970). Tanto as frações do sistema aquoso bifásico quanto o sobrenadante bruto do cultivo bacteriano foram previamente precipitados com TCA 20 % e mantidos sob refrigeração *overnight*. Após centrifugação (10.000 x g por 5 min), os *pellets* foram ressuspensos com acetona e novamente centrifugados (10.000 x g por 5 min). Este procedimento foi repetido três vezes para a remoção de possíveis impurezas. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, os *pellets* foram ressuspensos em 25 µL de tampão de amostra. O tampão de amostra foi preparado com 1 mL de tampão Tris-HCl (500 mM; pH 8,6); 0,8 mL de glicerol 95 %; 1,6 mL de solução de SDS (100 g/L); 0,4 mL de β-mercaptoetanol 98 %; 0,4 mL de solução de azul de bromofenol (10 g/L); e 3,8 mL de água destilada.

As amostras foram então incubadas a 100 °C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (150 V e 25 mA) e a observação de bandas foi possível após coloração do gel com Coomassie Blue R-250. Foi utilizado o marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen), que apresenta proteínas na faixa de 10 a 220 kDa.

4.8.4 Sequenciamento da enzima

O sequenciamento foi realizado no laboratório da Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

A amostra do sistema aquoso bifásico foi submetida a 24 horas de diálise contra água, em agitação a 4 °C. A membrana filtrante de 12 kDa foi escolhida para a remoção do excesso de PEG 4000. Foi realizado o SDS-PAGE conforme item 4.8.3.

A banda da protease foi recortada do gel de poliacrilamida, descorada por uma hora com 500 µL de solução descorante (ácido acético 10% e metanol 50% em água deionizada por sistema miliQ) e desidratada duas vezes de 5 min com 200 µL de acetonitrila, que foi evaporada no speedVac por 3 min. O gel foi então tratado com 50 µL de DTT 10 mM por 30 min e após, com 50 µL de iodoacetamida 50 mM por 30 min, ambos a temperatura ambiente. O gel foi lavado com 100 µL de bicarbonato de amônio 25 mM por 10 min e mais duas vezes com 200 µL de acetonitrila 50% em 25 mM de bicarbonato de amônio por 15 min. A amostra foi desidratada com 200 µL de acetonitrila 100% por 5 min, seca no SpeedVac e reidratada com 30 µL de tripsina 10 µg/mL em bicarbonato de amônio 25 mM (Promega Gold Mass Spec. Grade). Após incubação de 20 horas a 37 °C, o gel foi tratado com 50 µL de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 5% em água por 60 min. Este procedimento foi realizado duas vezes. A solução foi então recolhida para outro microtubo, evaporada em SpeedVac e ressuspensa em solução de 10 µL de ácido metanóico 0,1%.

Para separação e identificação dos peptídeos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Através de um sistema automático, 5 µl da amostra foram injetados no UPLC nano Acquity da Waters. A amostra passou por uma coluna Trap (Symmetry C18 5 µm 180µm x 20 mm) com o objetivo de retirar eventuais resíduos de sal e demais impurezas hidrofílicas (tempo de 1 minuto, gradiente de 95% água e 5% acetonitrila). Após essa etapa, a amostra foi submetida a uma separação cromatográfica (coluna nanoAcquity UPLC Column 100 µm x 100 mm 1,7 µm BEH130 C18). A coluna permaneceu na temperatura de 35°C e o tempo de corrida foi de 30 minutos.

Após a separação cromatográfica, os peptídeos foram direcionados para o equipamento de massas (Q-TOF). A ionização se deu pela técnica nanoESI. Seguem algumas configurações utilizadas no espectrômetro: temperatura da fonte de ionização de 100 °C; voltagem da fonte de ionização de 3300 V; voltagem do cone no scan MS de 40V; voltagem do cone para MS/MS de 35 V; faixa de massa/carga MS de 300 a 2000 Da; faixa de massa/carga MS/MS de 50 a 3000 Da. Foi utilizada a solução de referência ácido fosfórico 0,1% (v/v) em uma solução água/acetonitrila 1:1, com a voltagem do cone de 50V. A frequência de aquisição das massas de referência foi de 20 segundos. A fragmentação dos peptídeos se deu com gás argônio, pela técnica CID (collision induced dissociation).

Os dados gerados pelo espectrômetro foram tratados com o programa Distler (Mascot). Após, os dados foram analisados com o programa Mascot (Matrix Science, London, United Kingdom), sendo usado o banco de

dados NCBI nr (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e a tolerância para MS e MS/MS de 0,2 Daltons.

4.9 Caracterização da enzima parcialmente purificada

4.9.1 Determinação do pH e temperatura ótimos

O pH e temperatura ótimos foram determinados como descrito nos itens 4.5.2 e 4.5.3, respectivamente.

4.9.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi determinada nas temperaturas de 37, 55 e 70 °C nos intervalos de tempo de 0, 5, 15, 30, 60 e 120 min. As amostras foram incubadas em banho-maria nas temperaturas apropriadas. Alíquotas foram retiradas nos tempos especificados para a realização do ensaio em duplicata com azocaseína (item 4.3.2) na temperatura e pH ótimos de atividade enzimática. A atividade enzimática obtida no tempo zero foi considerada 100 % e os demais resultados foram apresentados como atividade relativa.

Além disso, o mesmo ensaio foi realizado na presença de Ca^{+2} na concentração de 10 mM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção e identificação dos isolados

Foram testados 15 isolados amazônicos quanto à atividade proteolítica em AL e capacidade de crescimento em AFP (Tabela 1). Desses, apenas 2 não cresceram no AFP e 8 apresentaram capacidade proteolítica pela formação de halos no AL. É de se esperar que apenas cresça em AFP aqueles micro-organismos que apresentarem crescimento e formação de halo em AL. Porém alguns isolados não proteolíticos em AL apresentaram crescimento em AFP. A farinha de pena pode também apresentar uma quantidade residual de farinha de osso e farinha de sangue que podem estar possibilitando o crescimento destas bactérias. Desta forma, para melhor avaliar a capacidade degradadora de queratina dos micro-organismos foi utilizado o cultivo em caldo pena nativa, que apresenta a queratina como única fonte de energia.

A capacidade proteolítica variou entre os isolados nas diferentes temperaturas, sendo que apenas 5 bactérias foram produtoras de halos em todas as temperaturas (Figura 1). A maioria apresentou halo em temperaturas mesofílicas, o que é esperado para bactérias de solo destes biomas (Ghosh et al., 2007; Riffel & Brandelli, 2002; Sangali & Brandelli, 2000).

Todos os isolados apresentaram produção de proteína solúvel mais elevada em CFP do que em CP (Figura 2), o que é esperado visto que a farinha de pena é um substrato processado onde a queratina está mais acessível à degradação pelos micro-organismos do que na pena.

A relação diâmetro de halo por diâmetro de crescimento, a 37 °C, variou de 0,35 para o isolado *Bacillus cereus* BCM 01 a 2,0 para o isolado *Pseudomonas* sp. BCM 20. Pillai (2008) descreveu relações halo/crescimento de 1,28 a 15 °C, 1,34 a 37 °C e de 1,42 a 50 °C para a bactéria queratinolítica

TABELA 1. Atividade proteolítica pela formação de halo em Ágar Leite (AL) e capacidade de crescimento em Ágar Farinha de Pena (AFP) dos isolados amazônicos após 48 horas a 30 °C.

Isolados	Hidrólise no AL	Crescimento no AFP
<i>Bacillus cereus</i> BCM 01	+	+
<i>Bacillus</i> sp. BCM 09	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> BCM 13	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. BCM 15	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. BCM 20	+	+
<i>Bacillus circulans</i> BCM 24	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> BCM 60	+	+
<i>Pseudomonas poal</i> BCM 69	-	+
<i>Pseudomonas stutzeri</i> BCM 70	-	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> BCM 71	+	+
<i>Janthinobacterium lividum</i> BCM82	-	-
<i>Janthinobacterium</i> sp. BCM 83	-	+
<i>Pseudomonas migulae</i> BCM 99	-	+
<i>Massilia timonae</i> BCM 123	+	+
<i>Bacillus firmus</i> BCM 137	-	+

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo. Todos os testes foram realizados em duplicata.

B. subtilis isolada de fontes termais de Mumbai, Índia. Porém, a degradação de penas dos isolados de solo amazônico BCM não foi tão expressiva quanto a de isolados previamente descritos (Brandelli, 2008). Mesmo após 11 dias, ainda pode-se observar fragmentos de cerca de 4 mm, ou maiores, das penas.

Os isolados de mata Atlântica, nomeados com letras de A-T, e os isolados amazônicos, denominados de BL foram identificados de acordo com o sequenciamento do fragmento 16S do DNAr (Figura 3, Tabela 2). Os isolados amazônicos BL foram todos identificados como *Bacillus subtilis* e os isolados de mata atlântica (E22, H13, J14, P22, Q23 e Q34) foram identificados como pertencentes ao grupo de *Bacillus cereus* (Cherif et al., 2003).

As quatro bactérias Gram negativas foram identificadas como *Chryseobacterium indologenes* A22 (família *Flavobacteriaceae*), *Aeromonas hydrophyla* K12 (família *Vibrionaceae*), e *Serratia marcescens* H14 e P3 (família *Enterobacteriaceae*). As sequências foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso GU826149 a GU826165. A análise molecular concorda com as análises morfológicas, microscópicas e testes bioquímicos previamente realizados (Bach, 2008). A identificação do isolado A22 só foi possível através do método bioquímico mini-API (bioMérieux), devido a dificuldades na extração de DNA, amplificação do fragmento do 16S e qualidade do sequenciamento.

Muitos estudos descrevem um grande potencial queratinolítico para isolados do grupo *B. subtilis* (Giongo et al., 2007; Kim et al., 2001; Manczinger et al., 2003; Suh & Lee, 2001) tanto para a degradação de resíduos de penas

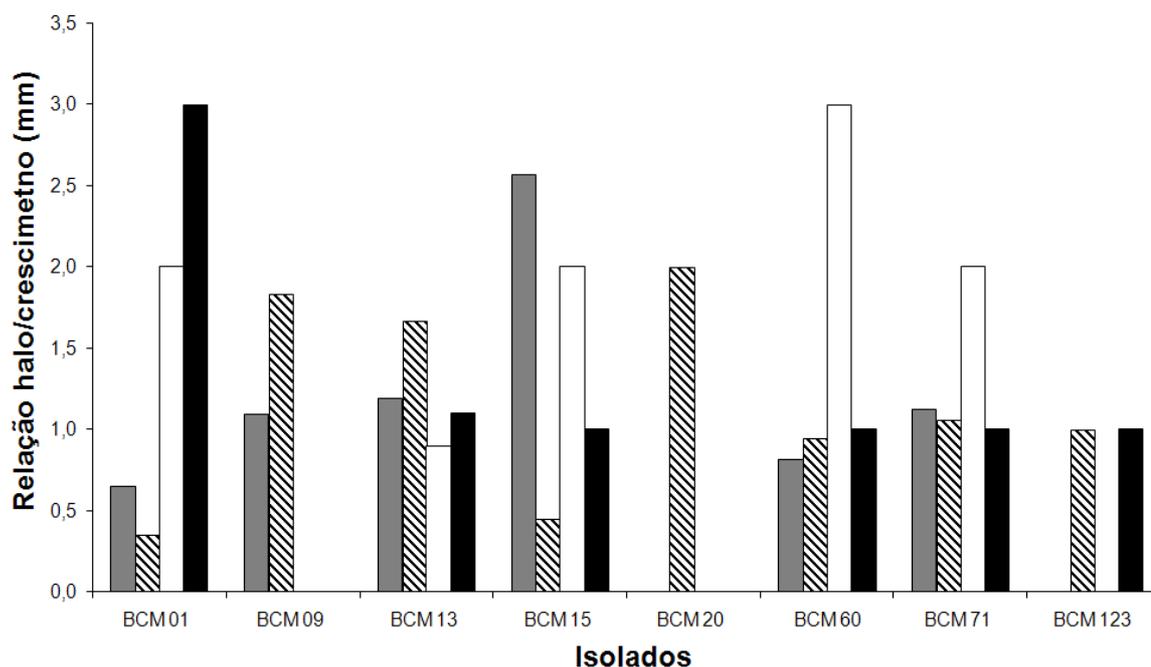


FIGURA 1. Relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia em AL dos micro-organismos amazônicos degradadores de penas em diferentes temperaturas por 24 horas. Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. (■) 30 °C; (▨) 37 °C; (□) 44 °C; (■) 55 °C. ICTA-UFRGS, 2009.

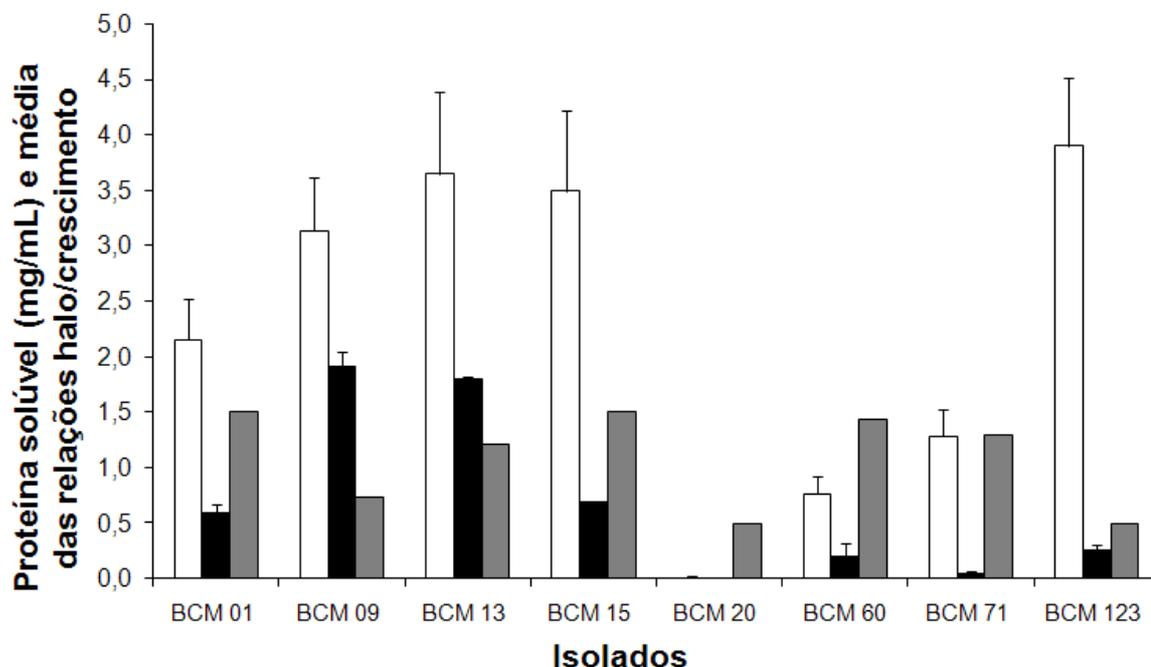


FIGURA 2. Proteína solúvel produzida após 11 dias de cultivo em caldo farinha de pena (CFP-□) e caldo pena (CP-■) a 30 °C em agitador orbital (125 rpm) e média da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia em diferentes temperaturas por 24 horas no ágar leite (AL-■). Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

1kb BL2 BL3 BL4 BL6 BL7 BL8 BL9 BL10 K12 E22 H13 J14 J14 P22 Q23 Q34 A22 H14 P3

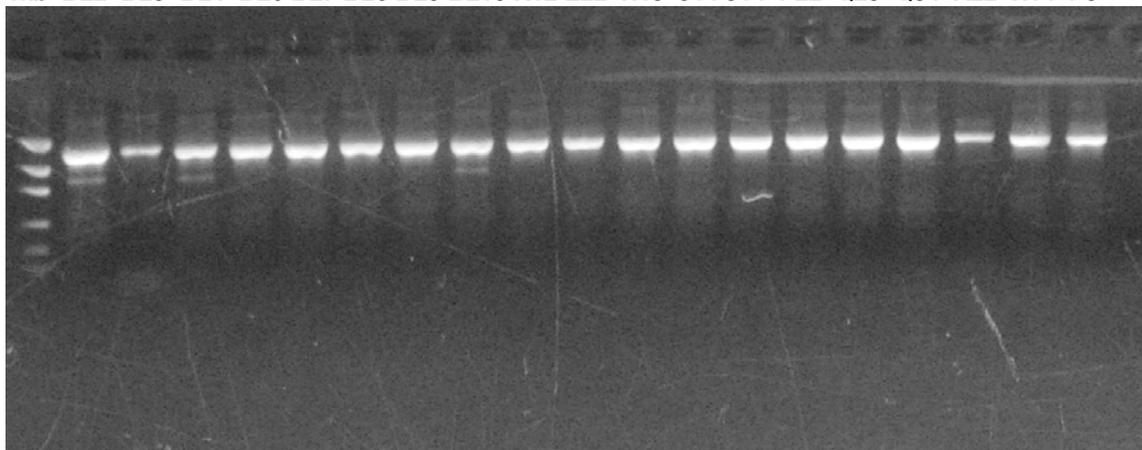


FIGURA 3. Gel de agarose 0,9% com amplificação do fragmento de 1500 pb do 16S DNAr dos isolados de solos brasileiros. 1kb: marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen). CENA-USP, 2009.

TABELA 2. Identificação das bactérias isoladas de solos brasileiros.

Isolado	Identificação pelo BLAST	Número de acesso	pb	Identidade (%)	Divisão
BL 02	<i>Bacillus subtilis</i> BRZ4	GU826158	1520	100	Firmicutes
BL 03	<i>Bacillus subtilis</i> BRZ4	GU826159	1504	99	Firmicutes
BL 04	<i>Bacillus subtilis</i> BRZ4	GU826160	1540	100	Firmicutes
BL 06	<i>Bacillus subtilis</i> EDR4	GU826161	1512	100	Firmicutes
BL 07	<i>Bacillus subtilis</i> EDR4	GU826162	1513	100	Firmicutes
BL 08	<i>Bacillus subtilis</i> EDR4	GU826163	1513	100	Firmicutes
BL 09	<i>Bacillus subtilis</i> EDR4	GU826164	1497	100	Firmicutes
BL 10	<i>Bacillus subtilis</i> BRZ4	GU826165	1529	100	Firmicutes
E22	<i>Bacillus cereus</i> G9842	GU826149	1508	99	Firmicutes
H13	<i>Bacillus anthracis</i> A0248	GU826150	1498	100	Firmicutes
J14	<i>Bacillus pseudomycooides</i> CIP 5259	GU826151	1509	100	Firmicutes
P22	<i>Bacillus thuringiensis</i> CCM11B	GU826152	1511	100	Firmicutes
Q23	<i>Bacillus anthracis</i> A0248	GU826153	1470	100	Firmicutes
Q34	<i>Bacillus cereus</i> 03BB102	GU826154	1527	100	Firmicutes
K12	<i>Aeromonas hydrophila</i> TE090214	GU826155	1100	99	γ -proteobacteria
H14	<i>Serratia marcescens</i> H3010	GU826156	1515	100	γ -proteobacteria
P3	<i>Serratia marcescens</i> MH6	GU826157	1496	99	γ -proteobacteria

quanto para depilação de peles para a indústria curtumeira (Macedo et al., 2005). Outros trabalhos descrevem bactérias queratinolíticas do grupo do *B. cereus* (Ghorbel et al., 2006) e de outras espécies do gênero *Bacillus* (Zaghloul et al., 1998b; Pissuwan & Suntornsuk, 2001).

Há poucos relatos de atividade queratinolítica para os gêneros das bactérias Gram negativas identificadas neste trabalho. Os gêneros *Aeromonas* e *Serratia* pertencem ao grupo das γ -Proteobacteria, do qual já foram descritas as bactérias queratinolíticas *Xanthomonas maltophila* (De Toni et al., 2002), *Lysobacter* sp. (Allpress et al., 2002) e *Stenotrophomonas* sp. (Yamamura et al., 2002a).

Lucas et al. (2003), estudando a diversidade de bactérias degradadoras de penas de solos temperados isolou uma *Serratia fonticola*, que apresentou pouca atividade queratinolítica. Recentemente, uma enzima que hidrolisa queratina foi reportada para *Serratia* sp. HPC 1383 (Khardenavis et al., 2009).

O isolado de solo de indústria avícola *Vibrio* sp., outro membro da família *Vibrionaceae* assim como a *Aeromonas* sp., foi reportado apresentando grande potencial queratinolítico (Sangali & Brandelli, 2000). Apesar de haver muitas proteases descritas para o gênero *Aeromonas* (Nieto & Ellis, 2006), esse é o primeiro isolado deste gênero descrito com atividade degradadora de penas.

Alguns isolados do gênero *Chryseobacterium*, família *Flavobacteriaceae*, já foram descritos como grandes degradadores de penas (Riffel et al, 2003; Wang et al, 2008b). *Chryseobacterium* sp. kr6 possui grande atividade queratinolítica quando crescido em caldo pena e as degrada totalmente

durante o cultivo. Recentemente, o isolado *C. indologenes* TKU014 foi descrito como produtor de três novas metaloproteases queratinolíticas produzidas em cultivo contendo resíduo de casca de camarão (Wang et al., 2008b).

Apesar das bactérias do gênero *Bacillus* terem apresentado melhor degradação de penas, as bactérias Gram negativas foram selecionadas para os seguintes ensaios, buscando conhecer um possível potencial biotecnológico ainda pouco estudado.

5.2 Crescimento em diferentes meio de cultivo

O CFP proporcionou uma produção de proteína solúvel mais elevada do que o CP para os isolados K12 e P3 em 48 horas (Tabela 3). Este resultado é esperado visto que a farinha de pena deve ser mais facilmente hidrolisável, pois já sofreu um tratamento preliminar. Apenas o isolado A22 apresentou maior produção de proteína solúvel em CP.

TABELA 3. Produção de proteína solúvel pelos isolados de solo de mata Atlântica A22, K12 e P3 após cultivo em CFP e CP por 48 horas a 30 °C e 125 rpm.

Isolado	Proteína solúvel (mg/mL) ¹	
	CFP	CP
A22	2,07	2,57
K12	3,92	0,47
P3	2,22	0

¹Resultados são a média de duas repetições.

No cultivo de 48 horas em CP, além da degradação visual do substrato queratinoso, pode-se observar a alcalinização do meio de 5 (pH inicial)

para 8 (A22 e K12) e 7 (P3). Já no CFP, apenas a linhagem K12 alcalinizou a pH 8 em 48 horas, as demais permaneceram no pH 7. Tanto em CCab quanto em CL A22 atingiu o pH 7,5 após 15 dias, enquanto que K12 apresentou pH de 5 e 6, respectivamente (Tabela 4). Essa alcalinização do meio nos fornece um indicativo de proteólise (Daroit et al., 2009), que também pode ser observada pela redução do peso inicial da lã de ovelha e cabelo humano em 15 dias. A linhagem A22 reduziu 13 % do peso inicial do cabelo e 24 % do da lã, enquanto que a K12 reduziu 16 % do peso inicial do cabelo e 15 % do da lã.

Taxas similares de degradação foram obtidas pelo isolado *B. megaterium* F7-1, que em dez dias, degradou completamente a farinha de pena (100%), seguido por penas de pato (86%) e unha humana (28%). Já cabelo humano (18%) e lã de ovelha (19%) tiveram taxas de degradação menores (Park & Son, 2009).

Os meios de cultivo contendo α -queratina, CCab e CL, apresentaram turvação do meio de cultivo tardia e menor degradação visual do resíduo, que refletiu em menor quantidade de proteína solúvel e menor alcalinização do meio o que conseqüentemente, indica menor proteólise. Essas diferenças provavelmente são devido às próprias diferenças nas conformações apresentadas pela queratina dependendo da estrutura morfológica na qual ela se encontra (Onifade et al., 1998), e devido a conformação em α ou β - queratina, sendo que a primeira é considerada mais recalcitrante (Brandelli, 2005; Pillai & Archana, 2008).

Os ensaios com azocaseína e azoqueratina fornecem dados mais específicos e confiáveis a respeito da atividade proteolítica e queratinolítica dos

isolados. As três bactérias são produtores de proteases queratinolíticas (Tabela 5), sendo que K12 foi a mais proteolítica e queratinolítica, apesar da atividade queratinolítica não ter variado muito entre elas.

A grande diferença de atividade enzimática resultante da incubação com diferentes substratos foi previamente descrita. A maioria das queratinases são comumente capazes de hidrolisar proteínas solúveis (como caseína) mais facilmente do que proteínas insolúveis (como queratina) (Brandelli, 2005; Syed et al., 2009; Prakash et al., 2010). Poucas apresentam maior hidrólise em queratina (Balaji et al., 2008).

TABELA 4. Avaliação de proteína solúvel, pH e variação do peso seco de resíduos queratinosos (% do peso inicial) após 15 dias de cultivo dos isolados de solo de mata Atlântica A22 e K12 em caldo cabelo (CCab) e caldo lã (CL) sob agitação a 30 °C.

Isolado	Proteína solúvel (mg/mL)		pH*		Peso seco (%)	
	CCab	CL	CCab	CL	CCab	CL
A22	2,94	0,75	7,5	7,5	12,71	24,06
K12	3,07	0,12	5,0	6,0	16,06	14,69

*pH inicial= 5

Resultados são a média de duas repetições.

TABELA 5. Atividade proteolítica utilizando os substratos azocaseína e azoqueratina e atividade específica (azoqueratina/azocaseína) obtidas com os sobrenadantes de 48 horas de cultivo em Caldo Pena dos micro-organismos de solo de mata Atlântica A22, K12 e P3.

Isolado	Atividade proteolítica (U/mL)		Atividade específica (Azoqueratina/ azocaseína)
	Azocaseína	Azoqueratina	
A22	101,2	11,1	0,110
K12	219	13,1	0,060
P3	147,7	12,75	0,086

Resultados são a média de duas repetições.

A atividade específica dos três isolados é baixa se comparada com outras queratinases. Macedo et al. (2008) realizaram ensaios com azocaseína e azoqueratina com diferentes proteases comerciais comparando-as com a enzima produzida pelo micro-organismo *B. subtilis* S14. Foram obtidas as taxas de atividade específica de 0,3 para a enzima de S14, de 0,09 para a tripsina e de 0,043 para a subtilisina.

5.3 Perfil de crescimento

Queratinases microbianas são predominantemente enzimas extracelulares, cuja produção é comumente induzida pelo crescimento em substratos queratinosos (Gupta & Ramnani, 2006). A produção de proteases extracelulares durante a fase estacionária do crescimento é característica de muitas espécies bacterianas (Priest, 1977; Gupta et al., 2002a), sendo que a atividade queratinolítica máxima é comumente atingida nas fases exponencial tardia ou estacionária (Thys et al., 2004; Gupta & Ramnani, 2006; Zhang et al., 2009).

Neste trabalho, as três bactérias tiveram sua produção proteolítica máxima no início ou durante a fase estacionária de crescimento (Figuras 4 e 5): *Aeromonas hydrophyla* K12 depois de 12 horas, *Chryseobacterium indologenes* A22 depois de 48 horas, e *Serratia marcescens* P3 depois de 36 horas de cultivo. O pico proteolítico foi seguido por um aumento de proteínas solúveis no sobrenadante do cultivo bacteriano (Figura 6). O aumento na concentração de proteína solúvel em cultivos submersos é geralmente tido como medida da digestão de resíduos queratinosos (Szabo et al., 2000).

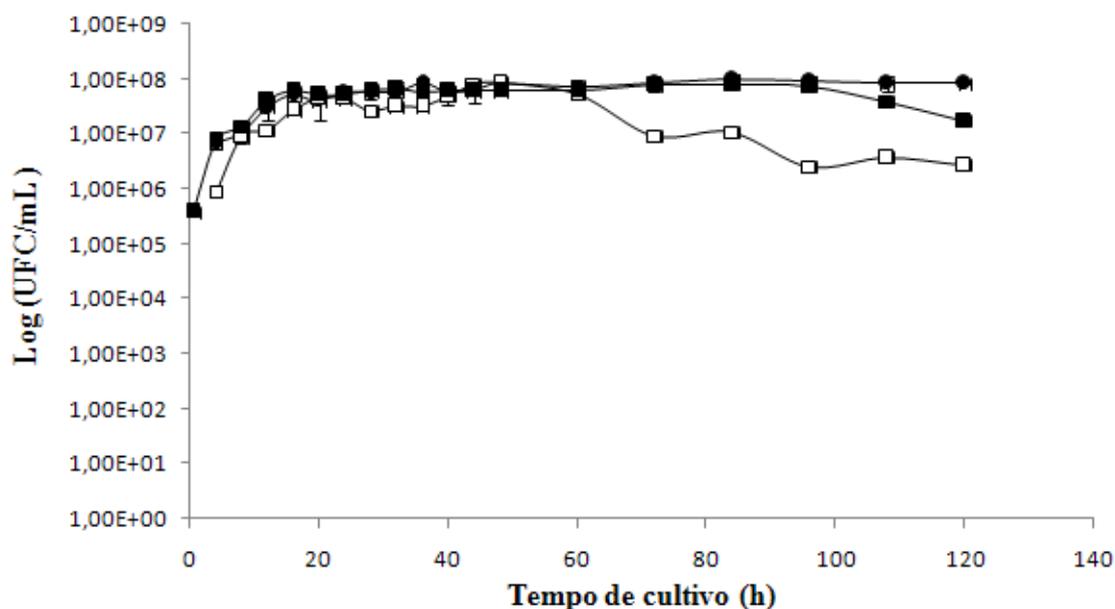


FIGURA 4. Perfil de crescimento de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3. Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

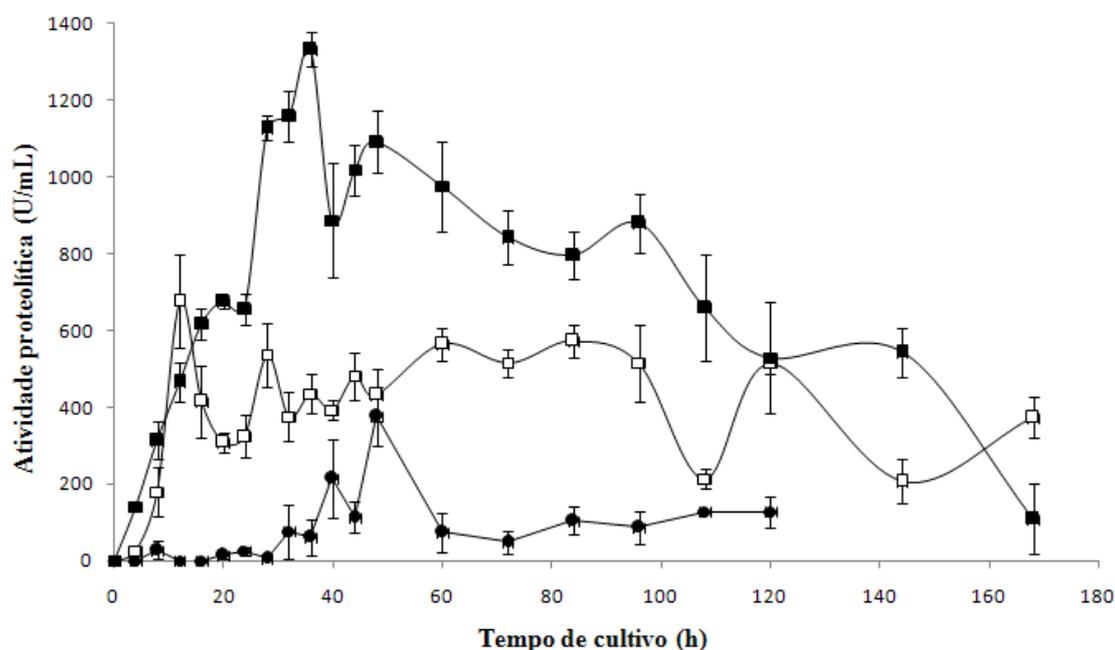


FIGURA 5. Produção de protease por três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm pelo ensaio azocaseína (37 °C; 30 min; pH 7,0). (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3. Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

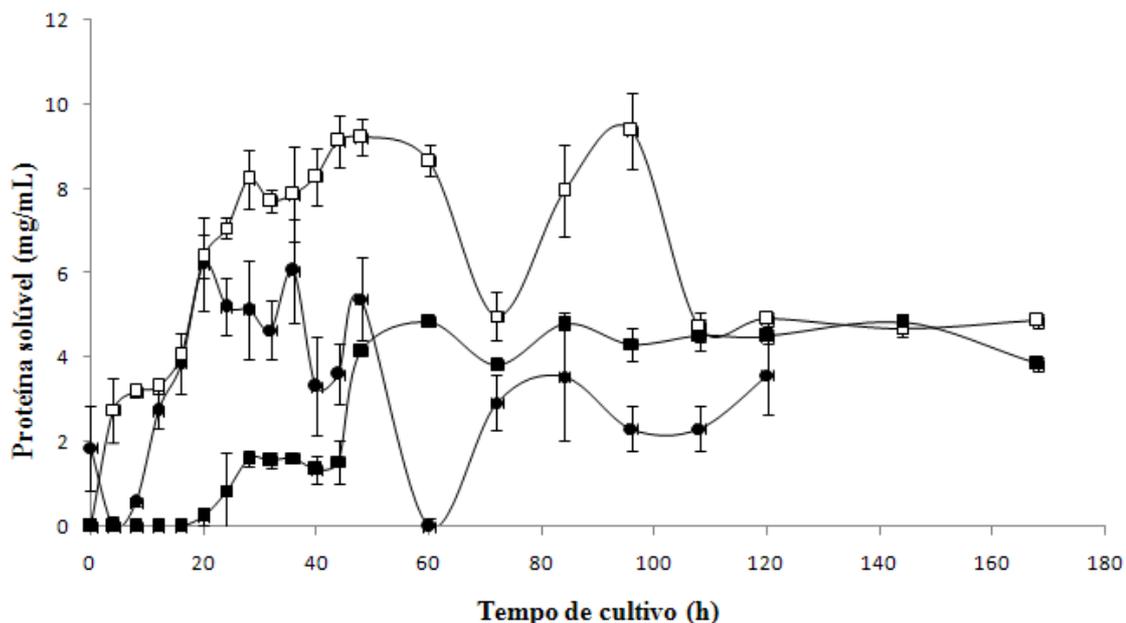


FIGURA 6. Proteína solúvel do sobrenadante do cultivo de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophila* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3. Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

A concentração de proteína solúvel aumentou e diminuiu durante o crescimento, provavelmente devido a secreção de outras proteínas pelos isolados bacterianos e/ou formação de biomassa utilizando a queratina solubilizada (Daroit et al., 2009).

Outros parâmetros avaliados durante a queratinólise são o aumento da alcalinização e a formação de grupos tiol no meio de cultivo para muitos micro-organismos (Gupta & Ramnani, 2006). A degradação de proteínas libera peptídeos solúveis e aminoácidos que são posteriormente deaminados liberando amônia, o que aumenta o pH do meio (Kumar et al., 2008). Esse aumento de pH é tipicamente verificado em micro-organismos crescidos em substratos protéicos e é indicativo de habilidades queratinolíticas (Riffel et al.,

2003). Neste trabalho, as três bactérias aumentaram o pH do meio de cultivo de 6,0 para 8,0.

A quebra de ligações dissulfídicas, mecanismo que auxilia na degradação da queratina (Kumar et al., 2008), libera grupos tiol e sendo assim, a concentração de grupos tiol tende a aumentar durante o cultivo bacteriano em substratos queratinosos (Riffel et al., 2003; Kumar et al., 2008). O perfil de concentração de grupos tiol durante o cultivo dos isolados é apresentado na Figura 7. *A. hydrophyla* K12 apresentou sulfitolise máxima de 5,6 µg/mL depois de 168 horas, *C. indologenes* A22 alcançou 5,0 µg/mL em 28 horas, e o isolado *S. marcescens* P3 produziu 3,5 µg/mL em 120 horas de cultivo, todos apresentando grande variabilidade na formação de grupos tiol.

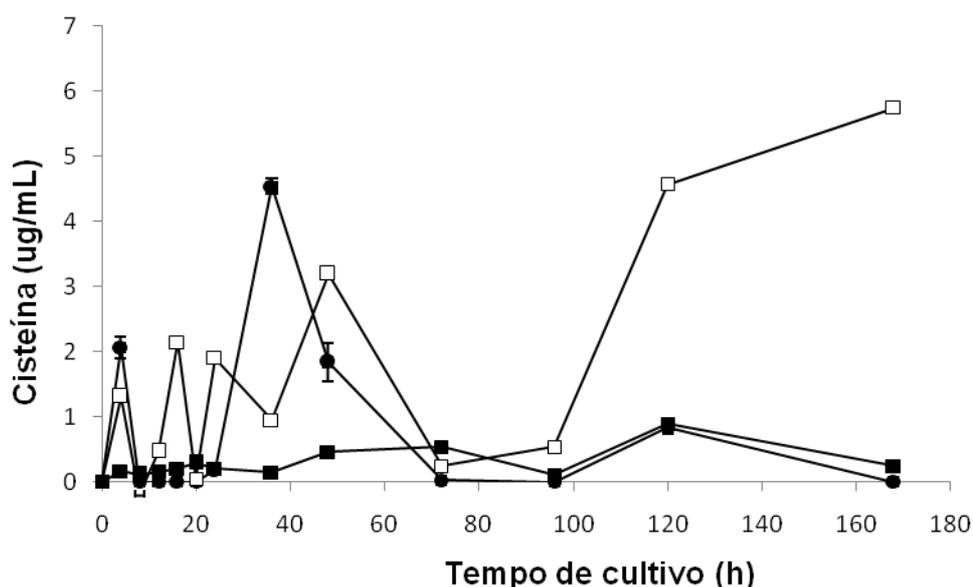


FIGURA 7. Concentração de cisteína livre no sobrenadante do cultivo de três bactérias degradadoras de penas durante o cultivo em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm. (□) *Aeromonas hydrophyla* K12; (●) *Chryseobacterium indologenes* A22; (■) *Serratia marcescens* P3. Resultados são as médias de quatro experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

Apesar de não ter sido observado um padrão, houve formação de grupos tiol, o que indica que a degradação da queratina por estes isolados se deve, principalmente, pela proteólise com menor contribuição de mecanismos de sulfitolise.

As análises de peso seco e de densidade óptica não geraram resultados satisfatórios visto que o meio de cultura CFP é insolúvel e interfere nas leituras.

5.4 Caracterização de proteases no extrato bruto

A atividade proteolítica dos sobrenadantes de cultivo (protease bruta) de *Aeromonas hydrophyla* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 foi caracterizada. Proteases brutas dos isolados A22 e K12 possuem características neutras e levemente alcalinas, apresentando sua atividade proteolítica ótima em pH 7,0 e 8,0, respectivamente (Figura 8). A protease bruta de A22 manteve ao menos 60% de sua atividade proteolítica na amplitude de pH de 6,0-9,0, enquanto que a protease bruta de K12 foi ativa em menor amplitude de pH, não apresentando atividade em pH 6,0 e apenas 46% de atividade enzimática no pH 8,5. O ótimo de pH 8 de proteases de *Pseudomonas* sp., gênero relacionado a *Aeromonas* sp., tem sido reportado. A metaloprotease de *Pseudomonas aeruginosa* PseA apresentou também seu ótimo em pH 8, tendo atividade do pH 6,0- 9,5 (Gupta et al., 2005).

As proteases bacterianas neutras são ativas em estreita faixa de pH, apresentando tolerância térmica relativamente baixa. Devido a sua taxa de reação intermediária, geram menor amargor em hidrolisados alimentares

protéicos do que as proteinases de origem animal e por isso possuem interesse na indústria alimentícia (Lahl & Braun, 1994). Além disso, sua baixa tolerância térmica é vantajosa para o controle de sua reatividade durante a produção de hidrolisados alimentícios com baixo teor de hidrólise (Rao et. al, 1998).

Proteases alcalinas têm sido largamente descritas e estudadas devido a suas importantes aplicações, principalmente na indústria de detergentes (Gupta et al., 2002a). A maioria das queratinases descritas possui características neutras a alcalinas (Brandelli, 2008), algumas delas apresentam inclusive atividade máxima em condições extremamente alcalifílicas (pH>12) (Mitsuiki et al., 2004). Contudo, apenas algumas queratinases bacterianas são otimamente ativas em pH ácidos, como a do isolado *Bacillus subtilis* MTCC (9102), que apresenta atividade máxima em pH 6,0 (Balaji et al., 2008). Sendo assim, a protease bruta da linhagem P3 possui uma característica incomum para queratinases bacterianas, tendo seu pH ótimo em torno de 6,0-6,5 e mantendo ao menos 40% de sua atividade entre os pH 5,0 e 8,0.

A detecção da atividade queratinolítica, utilizando o substrato específico azoqueratina, foi realizada nos pH de 6,0 a 8,0, incubando por três horas e meia. As três proteases brutas foram ativas sobre azoqueratina nos pH testados, atingindo as atividades de 1,74 U/mL (A22), 2,3 U/mL (K12) e 4,0 U/mL (P3) a 50 °C. Não foi observada diferença significativa entre os valores de pH.

As três enzimas degradadoras de penas foram ativas em temperaturas mesofílicas e levemente termofílicas (Figura 9), o que também tem sido comumente reportado para queratinases. A temperatura ótima das

queratinases é de 30 a 80 °C (Gupta & Ramnani, 2006), porém a temperatura ótima de 100 °C foi descrita para o isolado anaeróbico e termofílico *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (Nam et al., 2002). A queratinase de A22 apresentou temperatura ótima de 45 °C, sendo ativa em estreita faixa de temperatura, enquanto K12 possui seu ótimo a 55 °C mantendo mais de 40% de sua atividade de 20-60 °C. A queratinase de P3 foi otimamente ativa a 45-50 °C, mantendo mais de 40% de sua atividade de 20-70 °C.

Enzimas com amplas faixas de atividade proteolítica possuem potencial para aplicações industriais, visto que não requerem rigorosa regulação de temperatura para sua atividade. Além disso, enzimas e microorganismos mesofílicos são vantajosos em processos industriais, pois demandam menor aporte de energia do que os termofílicos (Kumar et al., 2008).

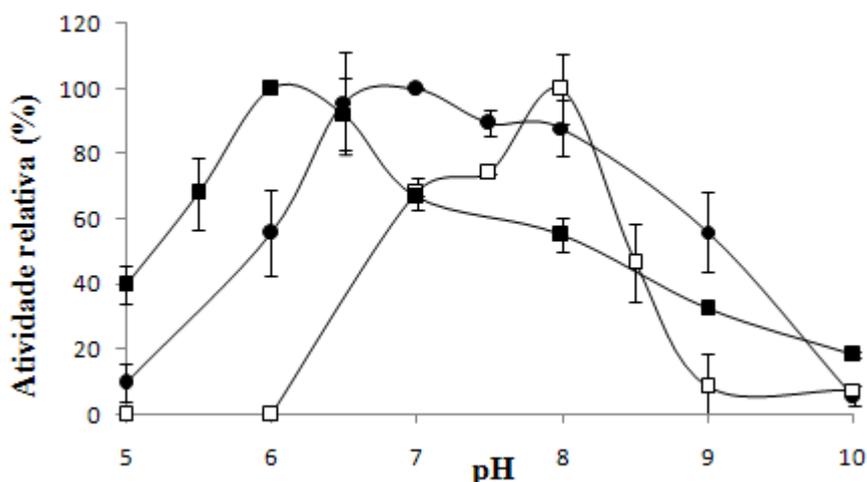


FIGURA 8. Efeito do pH sobre a queratinase bruta produzida por (□) *Aeromonas hydrophila* K12, (●) *Chryseobacterium indologenes* A22, e (■) *Serratia marcescens* P3 em caldo farinha de pena (CFP) pelo ensaio azocaseína (30 min, 37 °C). Resultados são as médias de dois experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

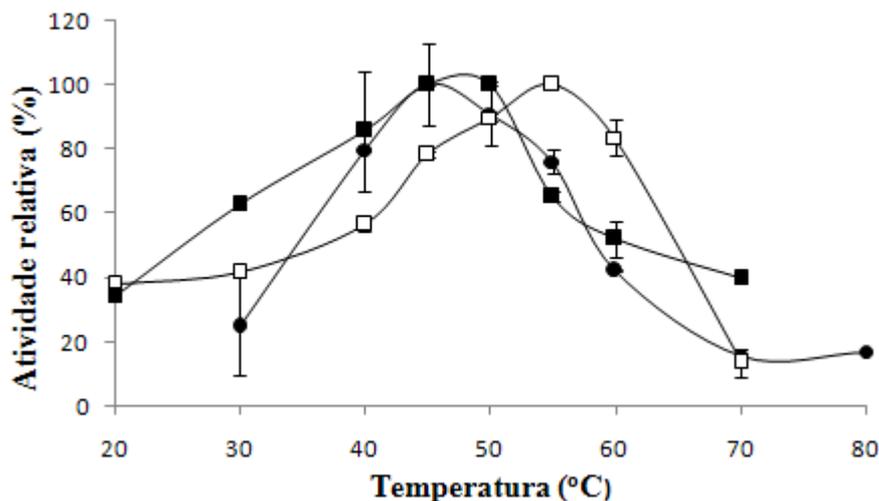


FIGURA 9. Efeito da temperatura sobre a queratinase bruta produzida por (□) *Aeromonas hydrophila* K12, (●) *Chryseobacterium indologenes* A22, e (■) *Serratia marcescens* P3 em caldo farinha de pena (CFP) pelo ensaio azocaseína (30 min, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente). Resultados são as médias de dois experimentos independentes. ICTA-UFRGS, 2009.

A linhagem A22 produz uma protease degradadora de penas similar a outras já descritas para espécies de *Chryseobacterium*. A protease bruta de *Chryseobacterium* sp. kr6, isolado de solo de indústria avícola, apresentou atividade máxima em pH 7,5 e 55 °C (Riffel et al., 2003). Três novas metaloproteases foram descritas para *C. indologenes* linhagem TKU014, apresentando ótimos de pH de 10,0, pH 7,0-8,0 e pH 8,0-9,0, para as proteases P1, P2 e P3, respectivamente (Wang et al., 2008). As temperaturas ótimas também ficaram dentro da faixa comumente descrita para as queratinases bacterianas, 30-50 °C, 40 °C e 40-50 °C, respectivamente. Uma protease acidofílica foi descrita para essa espécie (Venter et al., 1999), *C. indologenes* linhagem lx9a produz uma protease com pH e temperatura ótimos de 6,5 e 50 °C, respectivamente.

A linhagem P3 também se mostrou levemente acidofílica, o que a difere das demais queratinases descritas para o gênero *Serratia*. Uma serinoprotease com pH e temperatura ótimos de 10,0 e 60 °C foi reportada para *Serratia* sp. HPC 1383 (Khardenavis et al., 2009). Dessa forma, *Serratia marcescens* linhagem P3 pode estar produzindo uma nova protease degradadora de penas ainda não descrita para o gênero.

Esse é o primeiro isolado do gênero *Aeromonas* descrito como produtor de queratinase. Metaloproteases foram anteriormente reportadas para espécies de *Aeromonas*. A metaloprotease de *Aeromonas caviae* Ae6 foi otimamente ativa em pH 7,5 (Nakasone et al., 2004); e uma metaloprotease gelatinolítica de *A. salmonicida* demonstrou atividade máxima a 40 °C e pH 7,5 (Arnesen et al., 1995), características essas diferentes das descritas para a linhagem K12. As características da enzima da *A. hydrophyla* K12 se assemelham às de espécies de *Bacillus* (Werlang & Brandelli, 2005; Corrêa et al., 2010) e são também similares às da gram-negativa *Chryseobacterium* sp. kr6 acima citada (Riffel et al., 2003).

O zimograma revelou a presença de uma única zona de atividade proteolítica, indicando a produção de uma enzima proteolítica por cada isolado (Figura 10). As proteases, e dentre elas, as queratinases, são comumente classificadas através do uso de substratos específicos e inibidores (Brandelli et al., 2010). A atividade proteolítica nos zimogramas foi mantida tanto na

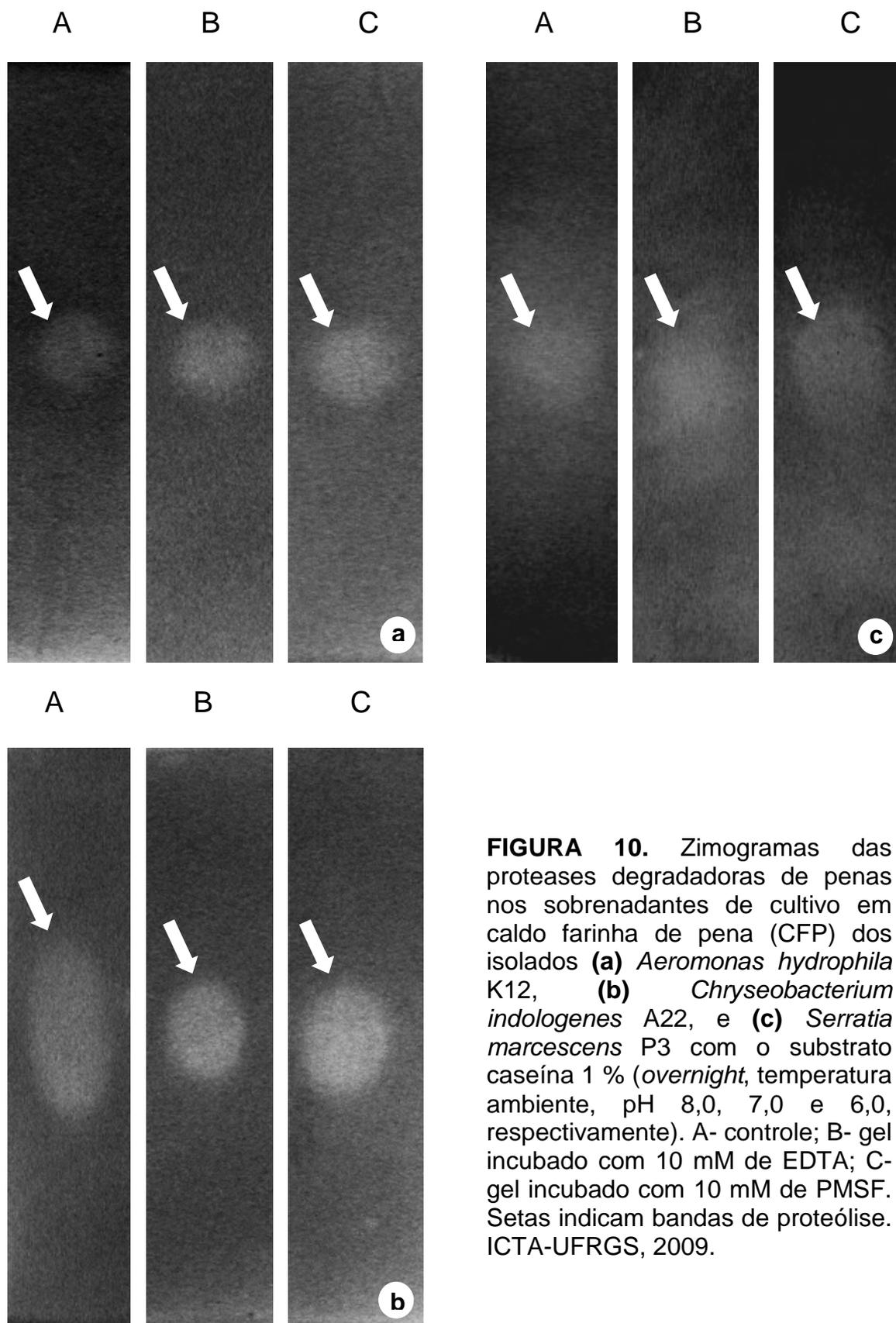


FIGURA 10. Zimogramas das proteases degradadoras de penas nos sobrenadantes de cultivo em caldo farinha de pena (CFP) dos isolados (a) *Aeromonas hydrophila* K12, (b) *Chryseobacterium indologenes* A22, e (c) *Serratia marcescens* P3 com o substrato caseína 1 % (*overnight*, temperatura ambiente, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente). A- controle; B- gel incubado com 10 mM de EDTA; C- gel incubado com 10 mM de PMSF. Setas indicam bandas de proteólise. ICTA-UFRGS, 2009.

presença de EDTA quanto de PMSF (Figura 10). Isso provavelmente se deve a natureza reversível da inibição por EDTA (Riffel et al., 2007) em longas horas de incubação, gerando um resultado falso negativo. Por outro lado, a inibição por PMSF não tem essa característica e mesmo assim, não inibiu a atividade proteolítica, corroborando os resultados obtidos nos ensaios com azocaseína (Tabela 7). As três proteases deste trabalho foram inibidas por EDTA, inibidor de metaloprotease, enquanto que todas tiveram sua atividade levemente favorecida pelo PMSF, inibidor de serinoproteases. Desta forma, sugere-se que as enzimas queratinolíticas de *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 são metaloproteases.

A maioria das queratinases reportadas é produzida por bactérias Gram positivas, principalmente dos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, pertencendo ao grupo das serinoproteases. Contudo, o número de descrições para metaloproteases tem crescido, em sua maioria aquelas produzidas por bactérias Gram negativas (Brandelli et al., 2010).

As metaloproteases possuem a vantagem de serem mais facilmente imobilizadas em suportes, aumentando sua estabilidade, o que tem sido relacionado a uma redução do processo de autólise (Wang et al., 2003b). Além disso, podem ser temporariamente inativadas por agentes quelantes durante estocagem (Brandelli, 2008).

A atividade enzimática do extrato bruto foi investigada na presença de diferentes substâncias químicas (Tabelas 6 e 7). A protease degradadora de penas de *Aeromonas hydrophila* K12 foi fortemente inibida por Hg^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} enquanto que Zn^{+2} e Co^{+2} tiveram efeito inibitório menor. Aumento de 1,3 e

1,5 vezes na atividade proteolítica foi alcançada na presença de Na^+ e Mg^{+2} , respectivamente.

O detergente SDS é conhecido por inibir queratinases microbianas (Riffel et al., 2007; Tatineni et al., 2008). Contrariamente, o SDS estimulou a atividade enzimática de K12, enquanto que a protease esteve instável na presença de Triton X-100. Esse efeito positivo do SDS sobre a atividade proteolítica da linhagem K12, somado a seu pH alcalino de atividade enzimática e manutenção de ao menos 40% de atividade nas baixas temperaturas de 20-30 °C (Figura 9) podem sugerir seu potencial uso em formulações de detergentes (Corrêa et al., 2010; Prakash et al., 2010). Além disso, suas características vão ao encontro aos atuais requisitos das indústrias de detergentes por proteases alcalinas ativas em baixas temperaturas com o objetivo de manter a qualidade do tecido e reduzir a demanda energética (Venugopal & Saramma, 2006).

Os solventes orgânicos, em ambas as concentrações, aumentaram a atividade residual em até 323% para DMSO 1% (v/v), 342% para isopropanol 1% (v/v) e 300% para acetonitrila 1% (v/v). Enzimas são comumente inativadas pela adição de solventes orgânicos aos ensaios enzimáticos (Wang et al., 2008b). A estabilidade e/ou estímulo da atividade proteolítica promovida pelos solventes orgânicos, especialmente para o isolado K12, é uma característica marcante visto que sua enzima tem potencial para ser utilizada na síntese de peptídeos (Gupta et al., 2002a; Wang et al., 2008b).

Gupta et al. (2005) sugeriram a aplicação na indústria de detergentes e na de síntese de peptídeos para a protease do isolado

Pseudomonas aeruginosa PseA, gênero relacionado ao de *Aeromonas* sp., que apresentou características similares as da linhagem K12. Essa *P. aeruginosa* produz uma metaloprotease com ótimo em pH 8 e 60 °C, atividade do pH 6,0-9,5, estável nas temperaturas de 25- 65 °C, além de ser estável na presença de detergentes e solventes orgânicos.

Chryseobacterium indologenes A22 foi inibida por Zn^{+2} , Na^{+} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Mg^{+2} enquanto que Co^{+2} , Fe^{+2} e Hg^{+2} provocaram efeito inibitório maior. O íon Ca^{+2} exerceu leve aumento na atividade enzimática. Esses resultados são similares ao isolado *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003), exceto pela inibição da atividade proteolítica na presença de Fe^{+2} para A22 comparado ao leve aumento na atividade da linhagem kr6. Os resultados também foram similares aos das metaloproteases purificadas de *Chryseobacterium taenense* TKU001, FI e FII (Wang et al., 2008b).

O isolado *C. taenense* TKU001, quando incubado com detergentes, teve menor inibição enzimática na presença do surfactante não iônico Triton X-100 do que na presença de apenas 1 mM do surfactante aniônico SDS que inibiu e completamente inibiu FI e FII, respectivamente. Contrariamente, a linhagem A22 sofreu inibição enzimática maior por ambas as concentrações de Triton X-100 do que por SDS. Os solventes orgânicos também inibiram a atividade proteolítica, que apenas foi favorecida na presença do isopropanol 1% (v/v) e acetonitrila 5% (v/v).

O isolado *Serratia marcescens* P3 foi apenas totalmente inibido pelo íon Hg^{+2} , os demais sais não tiveram efeitos significativos na atividade proteolítica. Já a atividade enzimática da *Serratia* sp. linhagem HPC 1383 foi

inibida pelo Zn^{+2} e por Co^{+2} , Cu^{+2} e Mn^{+2} em menor grau, enquanto que o Hg^{+2} não gerou efeito (Khardenavis et al., 2009). A enzima da linhagem P3 manteve mais de 70% da atividade residual na presença dos detergentes SDS e Triton X-100. Pouca inibição ocorreu na presença de 1% (v/v) dos solventes orgânicos, enquanto que um aumento nas concentrações gerou efeito inibitório maior.

TABELA 6. Efeito de sais sobre a atividade da protease bruta de *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente).

Sal (10 mM)	Atividade relativa (%) ^a		
	K12	A22	P3
Controle	100	100	100
NaCl	130	52	118
CaCl ₂	92	108	114
CoCl ₂	64	0	135
HgCl ₂	1	9	0
MnCl ₂	94	66	119
CuSO ₄	8	23	105
FeSO ₄	0	0	125
MgSO ₄	151	56	116
ZnSO ₄	39	53	124

^a Valores são a média de dois experimentos independentes.

TABELA 7. Efeito de diferentes reagentes sobre a atividade da protease bruta de *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 8,0, 7,0 e 6,0, respectivamente).

Substância	Concentração	Atividade relativa (%) ^a		
		K12	A22	P3
<i>Controle</i>	–	100	100	100
<i>PMSF</i>	5 mM	111	126	118
<i>EDTA</i>	5 mM	14	24	46
<i>SDS</i>	10 mM	175	83	76
<i>Triton X-100</i>	0,1 % (v/v)	0	10	77
	0,5% (v/v)	107	22	76
<i>DMSO</i>	1 % (v/v)	323	46	97
	5% (v/v)	290	83	74
<i>Isopropanol</i>	1 % (v/v)	342	110	91
	5% (v/v)	209	36	60
<i>Acetonitrila</i>	1 % (v/v)	300	82	82
	5% (v/v)	186	129	50
<i>β-mercaptoetanol</i>	0,1 % (v/v)	158	46	49
	0,5% (v/v)	50	68	22
<i>DTT</i>	0,1 % (v/v)	43	0	24
	0,5% (v/v)	0	0	8

^a Valores são a média de dois experimentos independentes.

Ions metálicos como Ca^{+2} e Mg^{+2} podem estimular a atividade enzimática agindo como pontes de sais ou de íons que estabilizam a enzima na sua conformação ativa e também podem proteger a enzima de desnaturação térmica (Kumar & Takagi, 1999; Corrêa et al., 2010). Neste estudo, Ca^{+2} e Mg^{+2} tenderam a aumentar a atividade proteolítica, exceto para os isolados K12 e A22, respectivamente. O efeito inibitório do Zn^{+2} foi observado para K12 e A22 e foi anteriormente descrito para metaloproteases como resultado da formação de pontes entre o monohidróxido de zinco (ZnOH^+) e íons zinco no centro catalítico da enzima (Riffel et al., 2007). Hg^{+2} também é reportado como um forte inibidor de queratinases e outras enzimas, agindo como agente oxidante de grupos tiol ou até reagindo com resíduos de triptofano e grupos carboxil dos aminoácidos da enzima (Lusterio et al., 1992; Thys & Brandelli, 2006; Daroit et al., 2008). As três enzimas foram fortemente inibidas por Hg^{+2} , o que pode ser devido a presença de importantes grupos -SH (como cisteínas livres) no centro catalítico ou perto dele (Corrêa et al., 2010).

Agentes redutores são conhecidos por favorecer a queratinólise através da redução de pontes dissulfeto da queratina facilitando o acesso ao substrato (Riffel et al., 2003; Brandelli et al., 2010). Apesar de agentes redutores terem tido um efeito positivo também na atividade proteolítica de *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003) as três enzimas descritas neste trabalho foram inibidas por essas substâncias. O único efeito positivo foi do β -mercaptoetanol 0,1% (v/v) na atividade proteolítica de K12, com atividade residual de 152%.

5.5 PCR para metaloprotease

Devido aos ensaios com azocaseína em presença de inibidores de protease e do zimograma indicarem a produção de metaloproteases, foi testada a PCR para o gene *apr*, desenvolvido para detectar a presença de metaloproteases em Pseudomonadaceas (Bach et al., 2001). Apesar de esses autores terem detectado esse gene em bactérias do gênero *Serratia* e do grupo *Cytophaga-Flavobacterium*, os três isolados Gram negativos deste trabalho não foram reativos para os *primers apr*.

Foram testadas três diferentes extrações de DNA e diferentes reações de PCR alterando as concentrações dos reagentes e modificando os programas de amplificação. Outros testes, talvez com outros pares de *primers*, deveriam ser realizados para se certificar da presença ou ausência desse gene nessas bactérias.

5.6 *Chryseobacterium indologenes* A22

Características do isolado de solo de mata nativa A22 foram avaliadas para comparar com o isolado de solo de indústria avícola *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003).

5.6.1 Caracterização da enzima

Alíquotas da curva de crescimento da linhagem A22 foram utilizadas para avaliar seu perfil de produção de queratinase, com o substrato específico azoqueratina (Figura 11). Observou-se que a produção máxima de queratinase (após 40-44 horas de cultivo) antecede a produção máxima de protease (48

horas, Figura 5) e apresenta dois picos de atividade. A elevação da atividade queratinolítica após as 32 horas de cultivo pode ser consequência do aumento da concentração de agentes redutores no sobrenadante (Figura 7) que atuam na desestabilização da estrutura da queratina e facilitam a atividade enzimática.

O micro-organismo *Chryseobacterium* sp. kr6 também apresentou atividade enzimática máxima após as 48 horas de cultivo em caldo pena, demonstrando grande variação na produção de queratinase (Riffel, 2002).

Ensaio de estabilidade térmica foram realizados (Figura 12). A enzima da linhagem A22 se mostrou pouco estável em temperaturas mesofílicas, do contrário do observado para a linhagem *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel et al., 2003). Após 30 min a 55 °C, kr6 ainda mantinha 68% de sua atividade enquanto que na temperatura de 70 °C, após 5 min a atividade reduziu para a metade. Ao fim das duas horas de incubação, a linhagem kr6 ainda apresentava atividade proteolítica residual nas três temperaturas (37, 55 e 70 °C), enquanto que a atividade enzimática da linhagem A22 foi completamente abolida após 5 min a 55 e 70 °C. A protease bruta produzida pela linhagem kr6 demonstrou ser mais termofílica (ótimo de atividade proteolítica a 75 °C) e mais estável que a produzida pela linhagem A22 (ótimo de atividade proteolítica a 45 °C). Já a metaloprotease produzida pelo isolado *C. indologenes* lx9a apresentou características similares às do presente estudo, apresentando atividade proteolítica ótima a 50 °C, porém perdendo totalmente sua atividade após 5 min nessa temperatura (Venter et al., 1999).

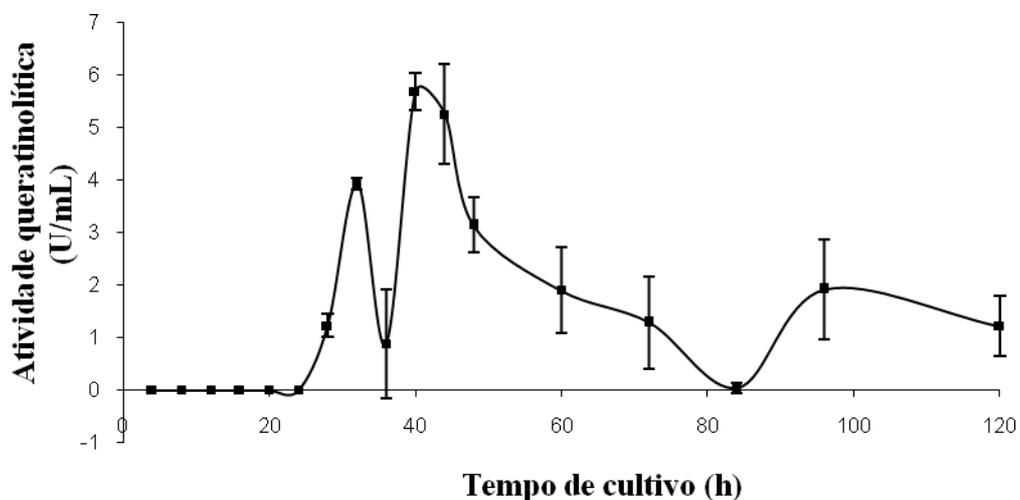


FIGURA 11. Produção de queratinase durante crescimento de *Chryseobacterium indologenes* A22 em caldo farinha de pena (CFP) a 30 °C, 125 rpm pelo ensaio azoqueratina (60 min, 37 °C, pH 7,0). ICTA-UFRGS, 2009.

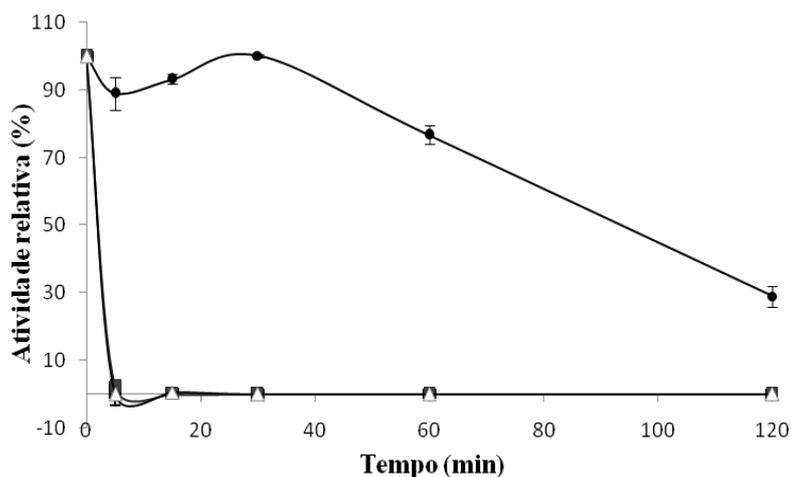


FIGURA 12. Estabilidade térmica da protease queratinolítica de *Chryseobacterium indologenes* A22 nas temperaturas de 37 °C (●), 55 °C (■) e 70 °C (Δ) ao longo do tempo pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 7,0). ICTA-UFRGS, 2009.

5.6.2 Otimização da produção enzimática

Os resultados da atividade enzimática gerada pelas diferentes combinações das variáveis independentes x_1 (concentração de farinha de pena- FP) e x_2 (pH) estão apresentadas na tabela 8. A atividade enzimática mais elevada (30 U/mL) foi atingida no ponto central, com o pH 7,0 e na concentração de FP de 1,0 g/L.

A tabela 9 mostra a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos. A análise estatística mostrou que, no intervalo estudado, somente a variável pH quadrática foi significativa ($P < 0,05$) para a atividade proteolítica do isolado *Chryseobacterium indologenes* A22.

A equação obtida para a regressão indica o valor de R^2 de 0,78 (um valor de $R^2 > 0,75$ indica aptidão do modelo). Sendo assim, 78% das variações dos resultados são explicadas pelo modelo, o que é aceitável para processos biológicos (Casarin et al., 2008). O valor de F calculado (F_{calc}) para o modelo foi de 4,61, enquanto que o F tabelado (F_{tab}) é 4,39 para o nível de confiança de 95%. Devido ao valor do F calculado ser superior ao do F tabelado e a falta de ajuste ter sido não significativa ($p=0,088$), a regressão pode ser considerada significativa (Myers & Montgomery, 2002). Foi gerado o gráfico de superfície de resposta ilustrado na figura 13 e a seguinte equação (Eq 3):

$$Y = 23,99 - 2,89x_1 + 0,13x_2 - 4,04x_1^2 - 13,86x_2^2 \quad (3)$$

TABELA 8. Matriz experimental com as variáveis codificadas e valores reais (entre parênteses) e a resposta Y atividade enzimática.

Ensaio	x₁ (Concentração de FP - g/L)	x₂ (pH)	Y (Atividade enzimática- U/mL)
1	-1 (5,2)	-1(5,6)	0
2	1 (25,7)	-1(5,6)	2,55
3	-1 (5,2)	1 (8,4)	0,9
4	1 (25,7)	1 (8,4)	0
5	0 (15,4)	0 (7,0)	19,1
6	0 (15,4)	0 (7,0)	24,05
7	0 (15,4)	0 (7,0)	29,25
8	0 (15,4)	0 (7,0)	23,45
9	-1,41(1,0)	0 (7,0)	30
10	1,41 (30)	0 (7,0)	12,45
11	0 (15,4)	-1,41(5)	0,75
12	0 (15,4)	1,41 (9)	2,65

TABELA 9. Análise de variância do modelo com os efeitos e interações entre as variáveis para a produção enzimática.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
Concentração de FP (L)	66,874	1	66,874	3,868	0,144
Concentração de FP (Q)	103,573	1	103,573	5,990	0,092
pH (L)	0,133	1	0,133	0,008	0,936
pH (Q)	1219,331	1	1219,331	70,520	0,004*
Concentração de FP (L) x pH (L)	2,976	1	2,976	0,172	0,706
Falta de ajuste	310,393	3	103,464	5,984	0,088
Erro puro	51,872	3	17,291		
Total da soma dos quadrados	1662,867	11			

*Estatisticamente significativa no intervalo de confiança de 95%.

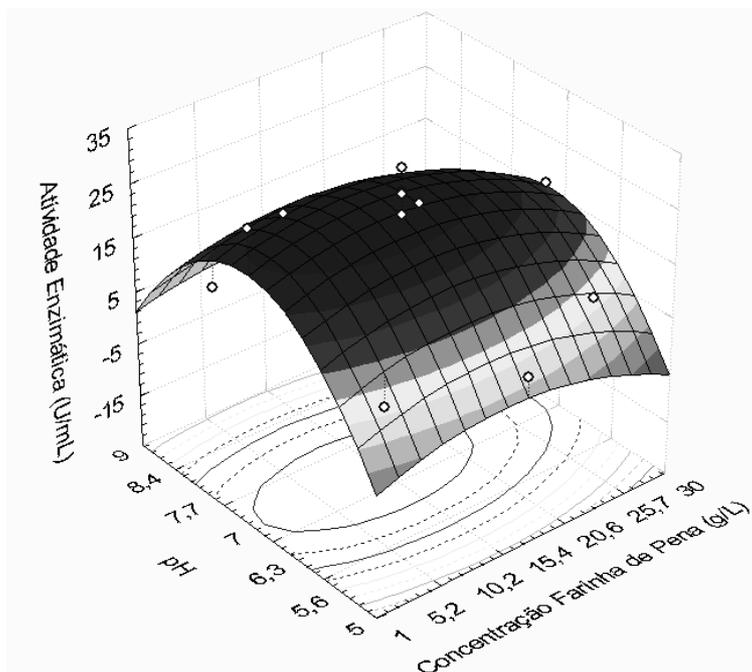


FIGURA 13. Superfície de resposta para a atividade enzimática em função das variáveis concentração de farinha de pena e pH. ICTA-UFRGS, 2009.

A análise da superfície de resposta mostra que os ensaios contendo pH mais ácidos (ensaios 1, 2 e 11) e aqueles contendo pH mais básicos (ensaios 3, 4 e 12) que o pH central de 7,0 resultaram em atividade enzimática menor. Já a concentração de FP e a interação entre as variáveis x_1 e x_2 não exerceram efeito significativo na atividade enzimática ($P > 0,05$).

Casarin et al. (2008) realizaram planejamento fatorial completo 2^3 , associado à análise da superfície de resposta, utilizando concentração de pena, pH e temperatura como variáveis na avaliação dos efeitos sobre a produção de queratinase por *Chryseobacterium* sp. kr6. Ao contrário do observado para a linhagem kr6, que apresentou condições ótimas de produção de queratinase em pH 9 (Casarin et al., 2008), o isolado *C. indologenes* A22 apresentou seu ótimo em condições mais neutras (de 6,16-7,84). Além disso, a linhagem kr6 apresentou atividade queratinolítica máxima na concentração de

pena de 30 g/L, enquanto que A22 de 1,0 a 20 g/L. Para ambos os micro-organismos, a concentração de substrato não exerceu efeitos significativos na produção enzimática. Na validação dos resultados, os autores também verificaram que um grande aumento na concentração do substrato acaba gerando um resultado negativo, visto que a aeração do meio fica prejudicada (Riffel et al., 2003; Wang et al., 2008b). A redução do suplemento de oxigênio é um fator limitante importante para o crescimento microbiano e síntese de proteases (Kumar & Takagi, 1999).

Apesar do efeito da concentração do substrato não ter sido significativo, a produção de queratinase já foi reportada como dependente da concentração de penas. O micro-organismo *Bacillus megaterium* F7-1, teve aumento na produção de queratinase como consequência do aumento na concentração de penas no meio de 0,1 a 1,6%. Porém, quando a concentração foi aumentada para 1,8% a produção da enzima reduziu, sendo atribuída ao excesso de viscosidade do meio e possível diminuição da aeração (Park & Son, 2009).

Ambos os micro-organismos apresentam características similares quanto à cinética de produção de enzimas. Porém, as condições ótimas de produção enzimática, a estabilidade da enzima e a capacidade de degradação de penas da linhagem kr6 são diferentes da linhagem A22. A linhagem kr6, em suas condições ótimas de cultivo em caldo pena (30 °C, pH 8, 180 rpm) foi capaz de degradar completamente as bárbulas das penas em 28 horas de cultivo (Riffel, 2002).

Essas diferenças marcantes entre micro-organismos tão próximos filogeneticamente podem sugerir uma possível força seletiva do meio. O solo da indústria avícola pode estar selecionando micro-organismos com maior capacidade degradadora do substrato pena, amplamente disponível; além de selecionar micro-organismos mais estáveis e ativos em altas temperaturas, se comparado com o solo de mata nativa.

5.7 *Serratia marcescens* P3

5.7.1 Otimização da produção enzimática

Os resultados do delineamento experimental nas diferentes combinações das variáveis independentes x_1 (pH), x_2 (concentração de farinha de pena- FP) e x_3 (temperatura) estão apresentados na tabela 10. Foram retiradas amostras dos 18 cultivos do planejamento fatorial nos tempos de 24, 36 e 48 horas para a avaliação da atividade proteolítica, sendo que somente na primeira amostragem (24 h) não foi possível obter um modelo validado estatisticamente. O único tempo de cultivo que apresentou efeitos significativos das variáveis sobre a atividade enzimática foi o de 48 horas e que, portanto, será descrito. Sua atividade enzimática mais elevada (12,55 U/mL) foi atingida no ponto central, com o pH 7,5, na concentração de FP de 15,5 g/L e na temperatura de 30 °C.

A tabela 11 mostra a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos no intervalo estudado. A análise estatística mostrou que, com exceção do pH linear, todas as variáveis tiveram um efeito significativo sobre a atividade enzimática, contudo, a interação entre elas não gerou efeitos significativos ($P >$

0,05). O valor de F calculado foi de 6,72, enquanto que o F tabelado é 3,39 para o nível de confiança de 95%. Devido ao valor do F calculado ser superior ao do F tabelado e a falta de ajuste ter sido não significativa ($p= 0,085$), a regressão pode ser considerada significativa (Myers & Montgomery, 2002). A equação obtida indica um R^2 de 0,8636, ou seja, 86,36% do total das variações do experimento são explicadas pelo modelo. Foi gerada a seguinte equação quadrática:

$$Y = 11,9 - 0,07x_1 - 1,47x_2 - 2,75x_3 - 3,29x_1^2 - 1,78x_2^2 - 2,21x_3^2 - 0,58x_1x_2 + 0,195x_1x_3 - 0,74x_2x_3$$

Avaliando a tabela 10, nota-se que as maiores atividades proteolíticas se encontram nos ensaios com pH 7,5, exceto quando ele foi combinado com a temperatura de 42 °C (ensaio 14) ou com a concentração de FP de 0,1 g/L (ensaio 11). Isso é sustentado pelo teste F e valor p que demonstram o fator quadrático de pH como o mais significativo sobre a atividade proteolítica de P3.

Experimentos utilizando o planejamento fatorial associado à superfície de resposta para otimização da atividade queratinolítica de bactérias têm reportado os fatores temperatura e concentração de substrato como sendo os mais significativos (Ramnani & Gupta, 2004; Bernal et al., 2006b; Thys et al., 2006; Casarin et al., 2008). Para Tatineni et al. (2007) o pH também foi fator significativo para a atividade queratinolítica de *Streptomyces* sp.7, apresentando condições ótimas no pH 11.

TABELA 10. Matriz experimental com os valores reais e as variáveis codificadas (entre parênteses) e a resposta Y atividade enzimática.

Ensaio	Variáveis			Atividade enzimática (U/mL)		
	pH (x_1)	Concentração de farinha de pena (g/L) (x_2)	Temperatura ($^{\circ}$ C) (x_3)	24 h ^a	36 h ^b	48 h ^c
1	6 (-1)	6,8 (-1)	22 (-1)	12,3	12,4	3,4
2	9 (+1)	6,8 (-1)	22 (-1)	5,7	3,3	4,9
3	6 (-1)	24,1 (+1)	22 (-1)	16,8	12,9	8,7
4	9 (+1)	24,1 (+1)	22 (-1)	6,9	14,8	6,65
5	6 (-1)	6,8 (-1)	37 (+1)	5,9	5,9	0,5
6	9 (+1)	6,8 (-1)	37 (+1)	1,1	1,1	0
7	6 (-1)	24,1 (+1)	37 (+1)	6,6	3,1	1,6
8	9 (+1)	24,1 (+1)	37 (+1)	1	1	0
9	5 (-1,68)	15,5 (0)	30 (0)	0,6	12,1	4,1
10	10 (+1,68)	15,5 (0)	30 (0)	11,4	3,2	5,1
11	7,5 (0)	0,1 (-1,68)	30 (0)	11,1	1,1	5,3
12	7,5 (0)	30 (+1,68)	30 (0)	9,8	15,4	12,4
13	7,5 (0)	15,5 (0)	18 (-1,68)	18,8	18,5	12,4
14	7,5 (0)	15,5 (0)	42 (+1,68)	4,7	3,6	2,9
15	7,5 (0)	15,5 (0)	30 (0)	9,2	18,3	10,8
16	7,5 (0)	15,5 (0)	30 (0)	14,2	5,5	13
17	7,5 (0)	15,5 (0)	30 (0)	5,5	22	10,55
18	7,5 (0)	15,5 (0)	30 (0)	6,7	11,1	12,55

$$^a R^2 = 0,53 \text{ e } F_{\text{cal}(9;8;0,05)} = 0,99 < F_{\text{tab}(9;8;0,05)} = 3,39$$

$$^b R^2 = 0,85 \text{ e } F_{\text{cal}(9;7;0,05)} = 5,46 > F_{\text{tab}(9;7;0,05)} = 3,68$$

$$^c R^2 = 0,86 \text{ e } F_{\text{cal}(9;8;0,05)} = 6,72 > F_{\text{tab}(9;8;0,05)} = 3,39$$

TABELA 11. Análise de variância do modelo com os efeitos e interações entre as variáveis para a produção enzimática.

Fatores	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	Valor p
pH (L)	0,069	1	0,069	0,046	0,845
pH (Q)	136,488	1	136,488	90,141	0,002*
Concentração de FP (L)	29,544	1	29,544	19,512	0,022*
Concentração de FP (Q)	40,135	1	40,135	26,506	0,014*
Temperatura (L)	103,116	1	103,116	68,101	0,004*
Temperatura (Q)	61,546	1	61,546	40,647	0,008*
pH (L) x Concentração de FP (L)	2,703	1	2,703	1,785	0,274
pH (L) x Temperatura (L)	0,300	1	0,300	0,198	0,686
Temperatura (L) x Concentração de FP	4,425	1	4,425	2,923	0,186
Falta de ajuste	45,49	5	9,098	6,009	0,085
Erro puro	4,542	3	1,514		
Total da soma dos quadrados	366,77	17			

*Estatisticamente significativa num intervalo de confiança de 95%.

As superfícies de resposta, geradas com duas variáveis e mantendo a terceira variável no ponto central, estão ilustradas na figura 14. A atividade enzimática máxima (11 U/mL) foi atingida em pontos próximos aos centrais: valores de pH entre 6,0 e 8,0, temperaturas entre 19 e 30 °C e concentração de farinha de pena entre 7,0 e 24,1 g/L.

De acordo com o planejamento fatorial, a linhagem P3, assim como a A22, apresentam condições ótimas para produção de enzimas proteolíticas em valores de pH próximos à neutralidade (6,0-7,0 e 6,16-7,84, respectivamente), de forma similar ao encontrado para a gram-positiva *Microbacterium* sp. kr10 (7,0) (Thys et al., 2006). Já os isolados *Chryseobacterium* sp. kr6 (Casarin et al., 2008) e *Streptomyces* sp.7 (Tatineni et al., 2007) apresentaram seu ótimo em condições mais alcalinas (7,4-9,2 e 11,0, respectivamente).

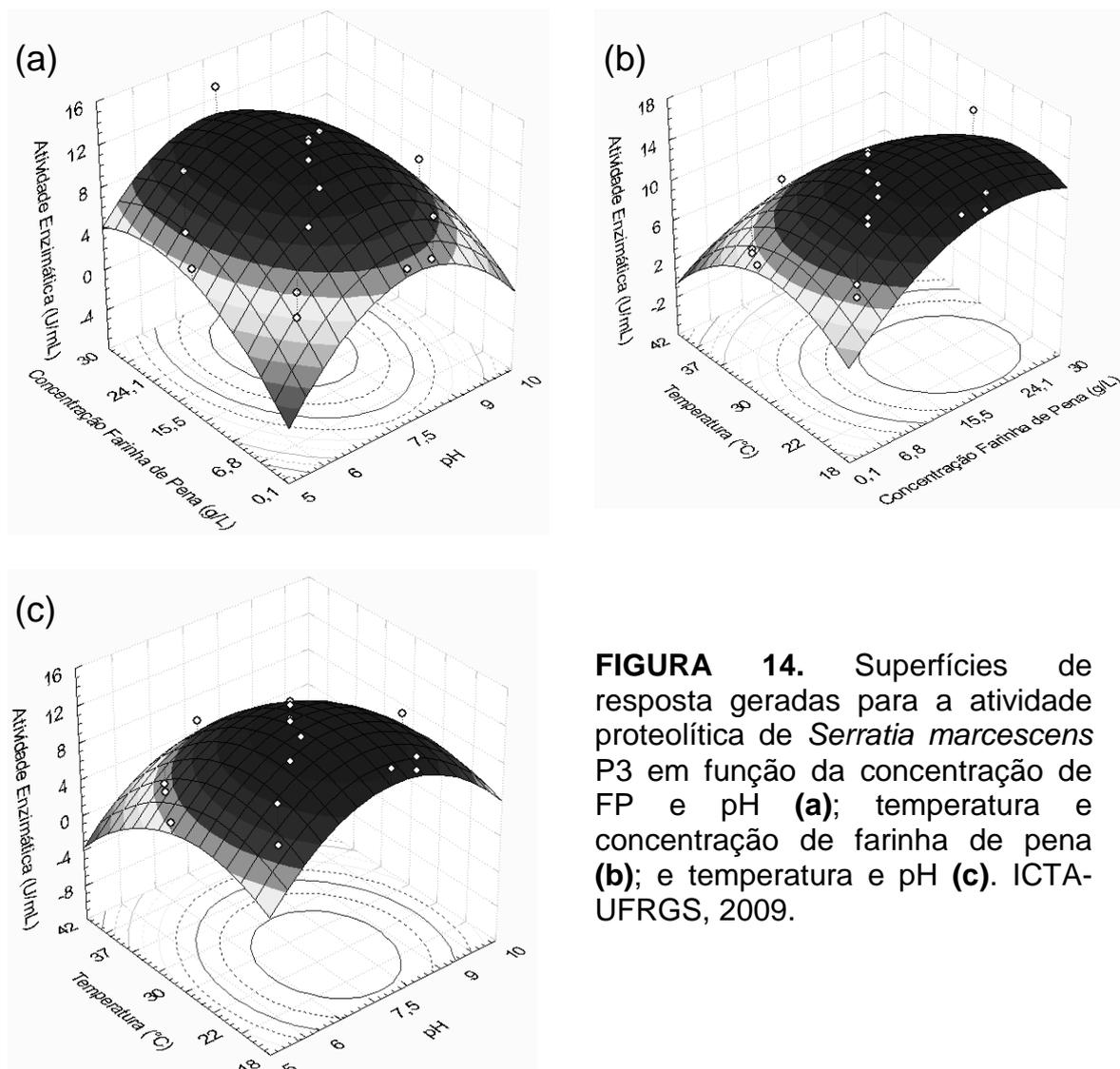


FIGURA 14. Superfícies de resposta geradas para a atividade proteolítica de *Serratia marcescens* P3 em função da concentração de FP e pH (a); temperatura e concentração de farinha de pena (b); e temperatura e pH (c). ICTA-UFRGS, 2009.

Tanto a linhagem P3 como a A22, apresentaram condições ótimas de produção em baixas concentrações de farinha de pena, 7,0 a 24,1 g/L e 1,0 a 20 g/L, respectivamente. Esse resultado é similar ao encontrado por Thys et al. (2006) para *Microbacterium* sp. kr10 (12,5 g/L) e Tatineni et al. (2007) para *Streptomyces* sp.7 (7,0 g/L), sendo que para *Chryseobacterium* sp. kr6 (Casarin et al., 2008) a concentração ótima de substrato foi maior (30 g/L).

Estudos de otimização da produção de queratinases utilizando micro-organismos do gênero *Bacillus* reportam a temperatura ótima de 37 °C para *B. licheniformis* PWD-1 e para o recombinante *B. subtilis* FDB-29, temperatura essa menor que seu ótimo de crescimento celular (50 e 42 °C, respectivamente) (Wang & Shih, 1999). *B. licheniformis* RG1 também apresentou atividade otimizada a 37 °C (Ramnani et al., 2005). Dentre outros Gram positivos, Bernal et al. (2006b) descrevem a temperatura ótima de 40 °C para o isolado *Kocuria rosea* e Tatiteni et al. (2007) a de 45 °C para a atividade queratinolítica de *Streptomyces* sp.7. Thys et al. (2006), otimizando a atividade proteolítica produzida pela gram-positiva *Microbacterium* sp. kr10 através da análise de superfície de resposta, também encontraram uma região ótima para produção de metaloprotease em baixas temperaturas. A linhagem kr10 apresentou atividade otimizada a 25 °C, porém observou-se que na temperatura de 18 °C a atividade proteolítica foi muito baixa. Já para a linhagem P3, observamos condições ótimas de atividade proteolítica em baixas temperaturas, inclusive mantendo boa atividade a 18 °C (ensaio 13, Tabela 10).

Apesar de apenas as variáveis de 48 horas terem sido significativas sobre a atividade proteolítica, os resultados das 24 e 36 horas também foram analisados por indicarem algumas tendências (Tabela 10). Os ensaios onde somente o pH variou de 6,0 para 9,0 apresentaram atividade enzimática mais elevada e anterior às 48 horas no pH 6,0 (ensaios 1, 3) a 22 °C. Na temperatura de 37 °C, mesmo variando também a concentração de FP, pode-se observar o mesmo padrão (ensaios 5 e 7). No ensaio 10, com pH 10,0, a atividade proteolítica máxima foi às 24 horas. Pode-se sugerir que o pH alcalino

possivelmente auxilie na atividade enzimática num primeiro momento (Gupta & Ramnani, 2006), porém com o passar do tempo de cultivo ele deve inibir a atividade proteolítica e crescimento do micro-organismo (Riffel, 2002).

No ensaio com o ponto axial -1,68 para concentração de FP (0,1 g/L) a atividade proteolítica máxima aconteceu nas 24 horas, o que pode ter sido resultado da redução do substrato com conseqüente menor crescimento bacteriano e menor produção da enzima nos demais tempos.

Os ensaios apresentaram atividade enzimática máxima em tempos diferentes, de acordo com as condições de cultivo empregadas. Porém, assim como no experimento onde foi avaliada a curva de crescimento da linhagem P3 (Figura 5), a atividade proteolítica máxima do planejamento fatorial também foi nas 36 horas de cultivo (22 U/mL- ensaio 17). Estes resultados refletem a complexidade dos mecanismos da fisiologia microbiana que podem impor algumas limitações à utilização dos métodos estatísticos.

Tanto a linhagem P3 quanto a A22, apresentam produção de enzima máxima em pH próximo do neutro e com baixas temperaturas o que é interessante visando a economia energética de uma empresa. Além disso, baixas concentrações de farinha de pena são suficientes para a produção ótima da enzima.

5.7.2 Purificação da enzima

Dos três extratos brutos analisados, o do isolado *Serratia marcescens* P3 apresentou maior atividade proteolítica, além de características que o diferem das demais queratinases atualmente descritas. De acordo com as análises zimográficas, este isolado produz apenas uma protease extracelular (Figura 10). Essa protease apresentou atividade sobre azoqueratina e pH ótimo entre 6,0-6,5, enquanto que as demais queratinases atuam em pH de neutro a alcalino. Sendo assim, foi realizada a purificação dessa enzima através de sistema aquoso bifásico (SAB) e, após, nova caracterização parcial.

Os sais afetam o coeficiente de partição de materiais bioativos no SAB, já que sua distribuição não homogênea nas duas fases resulta em um potencial elétrico entre elas (Oliveira et al., 2002). Sendo assim, a influência de diferentes sais em combinação com o PEG foi inicialmente testada. Os quatro sais apresentaram boa separação visual das fases, sendo que a fração superior continha o PEG e a inferior, o sal. As atividades proteolíticas foram avaliadas em ambas as fases (Tabela 12) e os sistemas contendo citrato de sódio ou sulfato de amônio foram selecionados. Ambos apresentaram rendimento e fator de purificação similar (Tabela 13). No sistema contendo citrato de sódio, o fator de purificação foi de 2,77 vezes e rendimento de 68,7%, enquanto que para o sistema contendo sulfato de amônio foi de 2,67 e 68,82%, respectivamente. Já a atividade específica foi maior no sistema com citrato de sódio (185,28 U/mg) do que no com sulfato de amônio (179,03 U/mg).

TABELA 12. Atividade proteolítica das frações originárias do sistema aquoso bifásico a qual a enzima de *Serratia marcescens* P3 foi submetida.

	Extrato bruto	Citrato de sódio		Sulfato de amônio		Sulfato de magnésio		Sulfato de zinco	
		PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal	PEG	sal
Atividade proteolítica (U/mL)	77,56	53,3	4,52	53,38	2,05	12,5	4,88	6,2	0

TABELA 13. Atividade específica e rendimento da fase superior (PEG) do sistema aquoso bifásico e coeficientes de partição (K_c e K_p) obtidos do método de purificação da metaloprotease de *Serratia marcescens* P3.

Sal	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína solúvel (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)	K_c	K_p
Extrato bruto	77,56 ± 3,10	1,16 ± 0,05	66,86	1	100	-	-
Citrato de sódio	53,3 ± 8,97	0,29 ± 0,03	185,28	2,77	68,7	11,78	14,54
Sulfato de amônio	53,38 ± 10,4	0,30 ± 0,06	179,03	2,67	68,82	26,04	15,07

Os coeficientes de partição K_c e K_p de ambos os sais indicam uma tendência da enzima e das proteínas de migrarem para a fração superior do sistema aquoso bifásico ($K > 1$), onde está o PEG (Almeida et al., 1998). Isso sugere a natureza mais hidrofóbica da enzima e da maioria das proteínas. Os coeficientes de partição do sistema contendo sulfato de amônio demonstram que esse sal favoreceu maior migração da enzima para a fase superior e maior quantidade de proteínas para a fase inferior do que com o citrato de sódio, situação essa desejável para a obtenção da enzima livre dos demais constituintes do sobrenadante do cultivo microbiano. A técnica utilizada para

realizar a purificação da enzima foi eficaz na separação desses constituintes e ligação da protease ao PEG.

Spelzini et al. (2006) estudaram o coeficiente de partição de pepsina e quimosina e também encontraram valores altos de K , de 20 a 80. Outras proteínas de massa molecular similar a 44 kDa apresentaram coeficientes de partição entre 5 e 10, representando menor migração da protease para a fase superior do sistema.

Foi utilizado, com sucesso, a purificação em um só passo, com o sistema aquoso bifásico para a remoção de debris celulares na extração de β -glicosidase intracelular (Sinha et al., 1996). Para esses autores, comparando PEG 400 com PEG 6000, o último teve melhor partição da enzima, além de apresentar maior estimulação e maior proteção da enzima. Testando diversas concentrações de PEG 6000 e K_2HPO_4 , a combinação que melhor apresentou partição da enzima em termos de atividade específica foi de 5% de PEG e 35% de sal. A segunda melhor combinação foi de 10% e 35%, respectivamente, similar a utilizada para a protease da linhagem P3 (20% e 20%).

Para melhor conhecer o comportamento de partição da enzima no SAB, uma curva binodal combinando diferentes concentrações de PEG e sal deveria ser construída, reduzindo assim os desperdícios no uso de altas concentrações dos reagentes. A menor viscosidade do polímero também é interessante para diminuir os possíveis interferentes no futuro uso da proteína. Além disso, faz-se necessário avaliar os efeitos dos reagentes separadamente na enzima, visto que Sinha et al. (1996) verificaram aumento da atividade da enzima devido a interferência dos reagentes.

A figura 15 apresenta o SDS-PAGE do extrato bruto e da enzima após terem sido submetidos à purificação pelo SAB com os sais citrato de sódio e sulfato de amônia. Amostras com concentração protéica de 0,3 mg/mL foram utilizadas para carregar o gel de poliacrilamida, sendo que o mínimo necessário para a visualização das bandas é 5 µg . Pela coloração com Coomassie Blue R-250, o gel das amostras purificadas apresentaram apenas uma banda cada, correspondendo a massa molecular de aproximadamente 53 kDa. O zimograma (Figura 10c) apresentou uma zona clara única na mesma altura do SDS-PAGE, indicando que essa é a banda que apresenta atividade proteolítica.

Ferreira et al. (2007), estudaram a partição de proteínas de malte de milho e o coeficiente de partição máximo pelo SAB contendo PEG/CaCl₂ foi de 4,2. Dessa forma, conseguiram a purificação da proteína com alto rendimento em somente um passo, mantendo sua atividade, provavelmente devido ao pequeno tamanho da enzima (53 kDa) e por suas características hidrofóbicas. Lima et al. (2002) estudaram a purificação de enzimas pectinolíticas utilizando o SAB contendo PEG/fosfato e obtiveram a purificação da enzima em apenas um passo com fator de purificação de 14,27 e rendimento menor que da P3, de 42,3%.

Mais ensaios deveriam ser realizados para certificar-se que a enzima tenha sido totalmente purificada em um só passo. Contudo, o método de purificação utilizado pode ser considerado eficaz para a redução de diversas bandas do gel de poliacrilamida, que poderiam representar contaminantes ou interferentes para a utilização industrial. Algumas indústrias não necessitam a

enzima totalmente purificada para sua eficaz utilização. As proteases utilizadas na indústria alimentícia e de detergentes são preparadas em grandes quantidades e utilizadas como preparos brutos, enquanto que as utilizadas na medicina são produzidas em quantidades reduzidas, mas com um grau de pureza elevado (Rao et al., 1998).

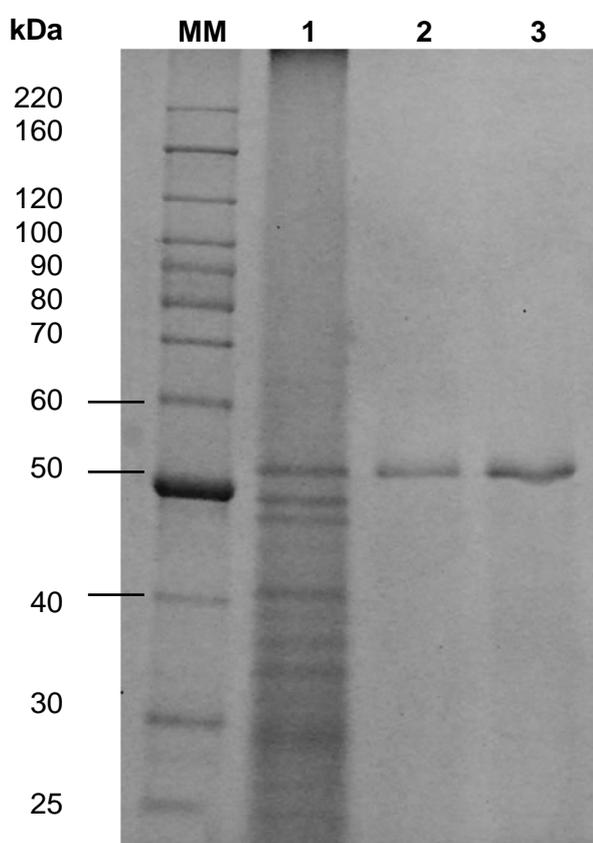


FIGURA 15. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% da enzima purificada por sistema aquoso bifásico (SAB). **MM:** marcador molecular Invitrogen; **Linha 1:** extrato da protease bruta de *Serratia marcescens* P3; **Linha 2:** enzima purificada em SAB com o sal sulfato de amônio; **Linha 3:** enzima purificada em SAB com o sal citrato de sódio. ICTA-UFRGS, 2009.

Além disso, com algumas exceções, queratinases purificadas são frequentemente ineficientes na hidrólise de penas nativas (Bressollier et al., 1999; Gradisar et al., 2000; Gupta & Ramnani, 2006; Riffel et al., 2007; Xie et al., 2010), comportamento principalmente atribuído ao grande conteúdo de pontes dissulfeto das moléculas de queratina. Já que o foco principal muitas vezes é a caracterização da protease queratinolítica, os componentes responsáveis pela redução de pontes dissulfeto são provavelmente removidos durante os procedimentos de purificação (Nam et al., 2002).

Uma desvantagem associada ao SAB é a possibilidade da enzima apresentar alta afinidade ao polímero, devido a fortes interações entre a enzima e o PEG (Palomares et al., 2004; Boeris et al., 2009). Sendo assim, a recuperação da enzima, através da quebra de sua ligação com o PEG, pode ser dificultada. A protease queratinolítica de P3 apresentou alta afinidade pelo PEG que foi difícil de ser eliminada utilizando ultrafiltração (Amicon Ultra-15 Ultracel 30k, Millipore; ponto de corte de 30 kDa) e cromatografia de permeação em gel Sephadex G-75 (Kaul et al., 2001). A redução da viscosidade da amostra e eliminação de parte do PEG foi obtida através de diálise por 24 horas.

Recentemente uma protease aspártica, pepsina, também apresentou alta afinidade pelo PEG no SAB contendo PEG/fosfato (Boeris et al., 2009), sendo de difícil separação através de diálise. Os autores sugeriram a redissolução deste complexo insolúvel através da mudança de pH ou adição de sais. Contudo, a retirada do PEG nem sempre é desejada. Uma das utilizações do SAB é a extração e bioconversão onde modifica-se a enzima com a

utilização do PEG (Kaul, 2001; Palomares, 2004). Sinha et al. (1996), com a modificação de tripsina, obtiveram aumento significativo de sua resistência às altas temperaturas e aos detergentes. Essas modificações podem ser importantes visando aplicações biotecnológicas.

5.7.3 Caracterização da enzima P3

Através do SDS-PAGE, pode-se verificar que a protease queratinolítica de *S. marcescens* P3 purificada pelo método do SAB possui massa molecular de aproximadamente 53 kDa (Figura 15). A massa molecular das queratinases varia de 18 a 240 kDa, para os isolados *Streptomyces albidoflavus* SK₁₋₀₂ (Bressollier et al., 1999) e *Kocuria rosea* (Bernal et al., 2003), respectivamente. Contudo, a maioria das queratinases variam de 20 a 50 kDa, sendo que massas moleculares maiores são frequentemente associadas a queratinases com características de metaloproteases ou isoladas de micro-organismos termofílicos (Brandelli et al., 2010).

Dentro do gênero *Serratia*, uma cisteína protease com massa molecular de aproximadamente 50 kDa e pH ótimo de 8,0 foi purificada do meio de cultura da psicrotolerante *S. proteamaculans* 94 (Mozhina et al., 2008). A bactéria *S. marcescens* ATCC 25419 cultivada em soro de leite produziu uma metaloprotease de 53,5 kDa com atividade máxima em pH 8,5 e 45 °C (Romero et al., 2001). A metaloprotease do tipo serralisina de 51,5 kDa chamada de AraA, produzida por *S. proteamaculans* HY-3, possui atividade máxima no pH 8,0-8,5 e temperatura de 37 °C. AraA foi reportada como capaz

de degradar substratos como elastina, queratina e gelatina, tendo maior atividade sobre albumina (Jangyul et al., 2007).

Metaloproteases extracelulares de *Serratia marcescens* têm sido caracterizadas, todas apresentando características em comum entre si e com a enzima de P3 (Salamone & Wodzinski, 1997). Estas enzimas possuem massa molecular próximo a 50 kDa e temperatura ótima em torno de 45 °C, porém apresentam o pH ótimo de 7,5- 9,0, sendo que a P3 foi levemente ácida (pH 6,5). Há poucos relatos de metaloproteases produzidas por *Serratia* sp. apresentando atividade máxima em condições ácidas. Um deles é de uma serralisina de 56 kDa produzida pelo isolado clínico *S. marcescens* kums 3958 (Matsumoto et al., 1984). A metaloprotease SMP 6.1 produzida pelo isolado de solo *S. marcescens* NRRL B-23112 também diferiu apenas no pH das demais serratiopeptidases, apresentando um pH ótimo mais alcalino (10,0) do que comumente descrito (Salamone & Wodzinski, 1997). Os autores sugeriram que estas pequenas heterogeneidades podem resultar não somente em pequenas alterações nas características físico-químicas, mas também em diferenças na especificidade por determinado substrato.

Proteases produzidas por *S. marcescens* NRRL B-23112 e *S. marcescens* kums 3958 pertencem à família das metaloproteases bacterianas de 50-kDa chamadas de serralisinas, que incluem as proteases das gram-negativas *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Caulobacter crescentus* (Basu & Apte, 2008). A análise dos peptídeos trípticos gerados a partir da protease queratinolítica da linhagem P3 revelou homologia das sequências com metaloproteases dependentes de zinco semelhante às

serralisinas. Esse resultado vai ao encontro das características de peso molecular (53 kDa), de temperatura ótima (45-50 °C) e de perfil de atividade proteolítica frente aos inibidores e sais (metaloprotease estimulada por Zn^{+2} e Ca^{+2}) dessa linhagem. As serralisinas comumente possuem atividade máxima em pH de neutro a alcalino, porém o isolado psicotrófilo *Pseudomonas fluorescens* 114 produz uma serralisina com ótimo em pH 6,0-7,0 (Kumeta et al., 1999), similar à linhagem P3.

Foram obtidos 13 peptídeos da digestão trípica da protease de *S. marcescens* P3 (Tabela 14), os quais apresentaram homologia cobrindo 31% da sequência da serralisina do micro-organismo *Serratia* sp. E-15 (Figura 16). Este isolado, atual ATCC 27117, é o representante tipo desta família de zinco-proteases cuja enzima está bem caracterizada quanto a sua sequência e estrutura tridimensional (Salamone & Wodzinski, 1997; Hamada et al., 1996). O score total obtido foi de 644, sendo que scores maiores que 50 indicam identidade ou grande homologia ($p < 0,05$). A massa total foi de 52,203 kDa e o pI calculado de 4,64, similar a outras serratiopeptidases anteriormente descritas (Matsumoto et al., 1984).

A sequência apresenta as regiões conservadas das serralisinas: HEXXHXXG-XXHP, que é o motivo ligante de zinco, rico em resíduos de histidina (Salamone & Wodzinski, 1997); a dobra-beta contendo metionina (SLMSY); uma região repetida de resíduos de glicina ligantes de cálcio (GGXGXD; Hamada et al., 1996; Basu & Apte, 2008); e ausência de resíduos de cisteína (Kumeta et al., 1999).

A família das serralisinas (EC 3.4.24.40; Bersanetti et al., 2005) é uma subfamília das collagenases intersticiais (M10 24.40; Rawlings & Barrett, 1993) e é agrupada na superfamília das metaloproteases metzincinas, também composta pelas astacinas, collagenases e adamalisinas (Bode et al., 1993). As metzincinas são caracterizadas por ter um motivo ligante de zinco HEXXHXXG-XXHZ, importante para a função catalítica da enzima. Na família serralisina há um resíduo de prolina (P) ao invés do ácido glutâmico/glutamina em “Z” (Salamone & Wodzinski, 1997). Nessa sequência, os resíduos de histina (H) são ligantes de zinco e acredita-se que o ácido glutâmico (E) seja a base catalítica. Por analogia às termolisinas, o grupo carboxila do ácido glutâmico está envolvido na fixação de uma molécula de água, que é a quarta ligante de zinco. “X” são outros aminoácidos. O resíduo conservado de tirosina (Y) presente após a dobra-beta contendo metionina é o quinto ligante de zinco (Stocker et al., 1995). A região repetida de resíduos de glicina ligantes de cálcio (GGXGXD) não é essencial para a função catalítica, mas é importante na proteção contra autólise. A função da conformação adotada por essa sequência ainda não foi elucidada, porém sugere-se que tenha relação com a excreção da protease pela bactéria, visto que esta sequência se repete em proteases secretadas por outras Gram negativas que também não possuem no N-terminal uma sequência sinalizadora para tal finalidade. Um exemplo é a metaloprotease dependente de zinco hemolisina A secretada por *Escherichia coli* (Hamada et al., 1996).

TABELA 14. Peptídeos resultantes da digestão triptica da protease de *Serratia marcescens* P3, obtidos por espectrometria de massas.

Peptídeo	Score ¹	Massa observada (kDa)	Massa calculada (kDa)
1-R.INLNEK.S	24	729,3975	729,4021
2-K.VFGQPVK.L	30	773,4488	773,4436
3-K.IDLSFFNK.E	55	982,5007	982,5124
4-K.HPATEDYGR.Q	55	1044,4572	1044,4625
5-R.DVYAEDTR.Q	50	1068,4673	1068,4724
6-K.LTFSFPDYK.F	18	1116,5412	1116,5492
7-K.FSAEQQQAK.L	60	1163,5384	1163,5571
8-R.DFLSTTSNSQK.V	17	1226,5633	1226,5779
9-K.GIDKIDLSFFNK.E	47	1395,7152	1395,7398
10-R.TGDTVYGFNSNTGR.D	59	1487,6114	1487,6641
11-K.DSFSNEQAGLFITR.E	111	1583,7184	1583,7580
12-K.LSLQSWADVANITFEVAAGQK.A	96	2348,1674	2348,2012
13-R.QTFTHEIGHALGLSHPGDYNAGEGNPTYR.D	22	3138,3613	3138,4544

¹ Score gerado pelo programa Mascot

```

1  MQSTKKAIEI  TESNFAAATT  GYDAVDDLH  YHERGNGIQI  NGKDSFSNEQ
51  AGLFITRENQ  TWNGYKVFGQ  PVKLTFSFPD  YKFSSTNVAG  DTGLSKFSAE
101 QQQQAKLSLQ  SWADVANITF  TEVAAGQKAN  ITFGNYSQDR  PGHYDYGTQA
151 YAFLPNTIWQ  GQDLGGQTWY  NVNQSNVKHP  ATEDYGRQTF  THEIGHALGL
201 SHPGDYNAGE  GNPTYRDVTY  AEDTRQFSLM  SYWSETNTGG  DNGGHYAAAP
251 LLDDIAAIQH  LYGANLSTRT  GDTVYGFNSN  TGRDFLSTTS  NSQKVIFAAW
301 DAGGNDTFDF  SGYTANQRIN  LNEKSFSDVG  GLKGNVSIAA  GVTIENAIGG
351 SGNDVIVGNA  ANNVLKGGAG  NDVLFGGGGA  DELWGGAGKD  IFVFSAASDS
401 APGASDWIRD  FQKGIDKIDL  SFFNKEAQSS  DFIHFVDHFS  GAAGEALLSY
451 NASNNVTDLS  VNIGGHQAPD  FLVKIVGQVD  VATDFIV

```

FIGURA 16. Alinhamento da sequência de peptídeos resultantes da digestão triptica da protease de *Serratia marcescens* P3 com a serralisina de *Serratia* sp. E-15, obtidos por espectrometria de massas. Negrito: peptídeos obtidos; Sombreado preto: motivo ligante de zinco; Sublinhado: dobra-beta contendo metionina; Sombreado cinza: região rica em glicina ligante de cálcio. CBIOT-UFRGS, 2010.

O extrato bruto da protease da linhagem P3 foi testado quanto a sua termoestabilidade na ausência e na presença de Ca^{+2} (Figura 17). A enzima foi termolábil tanto na presença quanto na ausência de cálcio, mantendo sua atividade proteolítica apenas na temperatura de 37 °C durante as duas horas de incubação. Nas temperaturas de 55 e 70 °C, a atividade foi completamente perdida após 15 e 5 min, respectivamente. A presença de MgCl_2 no ensaio enzimático de *S. marcescens* SMP 6.1 apresentou resultados similares, mantendo ao menos 80% da atividade após uma hora a 40 °C e perdendo atividade após 15 min a 55 °C (Salamone & Wodzinski, 1997). Na presença de 1M do sal NaCl e 1M de K_2SO_4 , *S. proteamaculans* após 40 min a 50 °C manteve mais de 90% e mais de 80% de sua atividade, respectivamente. Enquanto que na ausência de ambos os sais, perdeu totalmente sua atividade proteolítica em 5 min (Bersanetti et al., 2004).

O íon cálcio é responsável pela estabilização e aumento de atividade de proteases alcalinas em altas temperaturas (Kumar & Takagi, 1999), assim como demonstrado por Silveira et al. (2010) para *Chryseobacterium* sp. kr6. O íon cálcio possui a função de proteção contra a autólise nas serralisinas, que pode ser verificado na temperatura de 37 °C da linhagem P3. Porém, nessa linhagem, o cálcio não protegeu a enzima das altas temperaturas.

A protease queratinolítica da linhagem P3, após ter sido submetida à purificação pelo sistema aquoso bifásico e a 24 horas de diálise, mostrou atividade proteolítica similar ao extrato bruto, mantendo sua temperatura ótima a 45 °C e pH 7,0 (Figuras 18 e 19) em azocaseína e apresentando atividade queratinolítica sobre azoqueratina (2,02 U/mL).

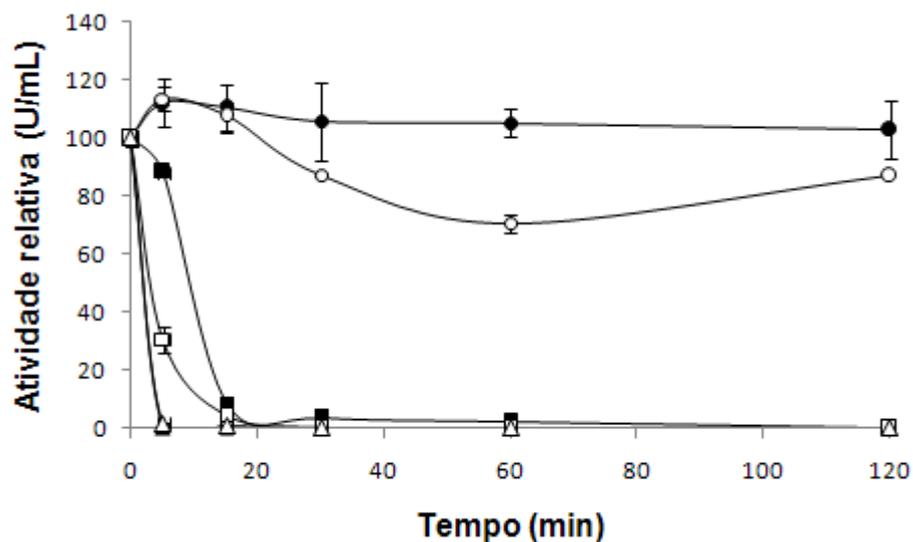


FIGURA 17. Estabilidade térmica da protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 na ausência (símbolos abertos) e na presença de 10 mM do íon cálcio nas temperaturas de 37 °C (●), 55 °C (■) e 70 °C (▲) ao longo do tempo pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C, pH 6,0). ICTA-UFRGS, 2009.

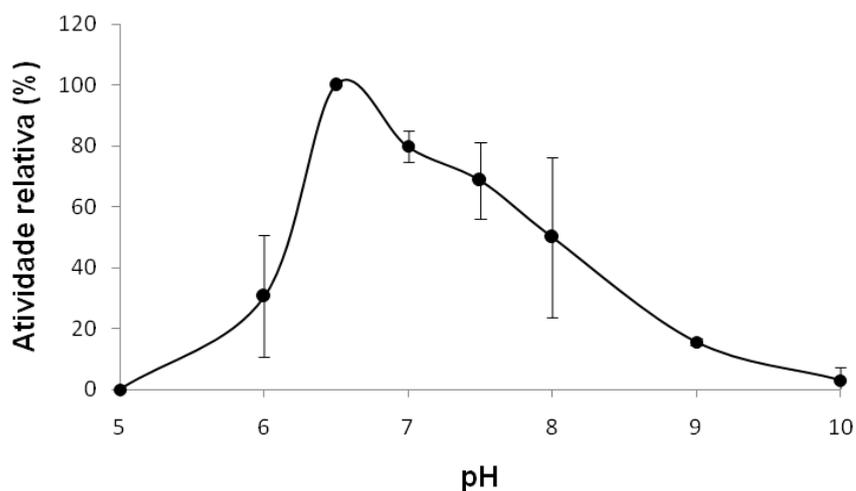


FIGURA 18. Efeito do pH sob a protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 após purificação pelo sistema aquoso bifásico pelo ensaio azocaseína (30 min, 50 °C). ICTA-UFRGS, 2009.

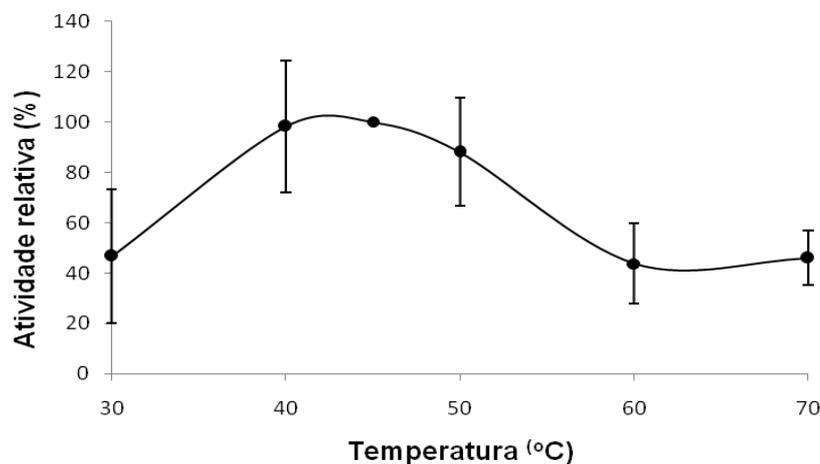


FIGURA 19. Efeito da temperatura sob a protease queratinolítica de *Serratia marcescens* P3 após purificação pelo sistema aquoso bifásico pelo ensaio azocaseína (30 min, pH 6,5). ICTA-UFRGS, 2009.

5.7.4 *Serratia marcescens*: patogenia X potencial biotecnológico

Serratia marcescens é uma *Enterobacteriaceae* potencialmente patogênica para imunocomprometidos e pacientes pós-cirúrgicos, causando infecções nosocomiais pela sua habilidade de se aderir a instrumentos hospitalares como cateteres, endoscópios e tubos intravenosos. Seu tratamento é dificultado por sua resistência aos processos de esterilização e desinfecção adotados e aos antibióticos β -lactâmicos, cefalosporinas e aminoglicosídeos. Sua infecção também pode ser de origem alimentar. Uma vez introduzida dentro do hospedeiro essa bactéria pode infectar diferentes locais no corpo, apresentando características generalistas (Marty et al., 2002). Sua capacidade de causar queratite em coelhos também já foi reportada (Lyerly et al., 1981).

Além disso, a própria *Serratia* pode ser hospedeira carregando microrganismos patogênicos, visto que ela estabelece interações mutualísticas

ou patogênicas com grande variedade de insetos (Jangyul et al., 2007). Suas infecções são facilitadas por sua habilidade de formar colônias em diversas superfícies do trato gastrointestinal de insetos e vertebrados. *S. marcescens* tem se destacado por seu potencial inseticida no controle de pestes como gafanhotos, pela produção de metaloproteases zinco-dependentes similares à serralisina (Tao et al., 2006; 2007).

As bactérias Gram negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são conhecidas por produzirem grande quantidade de proteases (Rao et al. 1998), porém comumente não as secretam para o meio. Algumas exceções são conhecidas como as proteases extracelulares de *S. marcescens*, incluindo quitinases, lecitinases, hemolisinas, sideróforos, lipases, nucleases, bacteriocinas, proteases do tipo subtilisina e serino, tiol e metaloproteases (Salamone & Wodzinski, 1997). Muitos trabalhos descrevem e caracterizam estas proteases extracelulares produzidas por diferentes linhagens que, na sua maioria, são similares às metaloproteases.

Apesar de a função primária da metaloprotease serralisina ser obtenção de nutrientes, ela também é um fator de virulência (Bersanetti et al., 2005). Contudo, a importância das infecções por *Serratia* e *Pseudomonas* parece ser menor do que a de outras toxinas, portanto o uso desta metaloprotease na indústria tem sido investigado. A serralisina de *S. marcescens* linhagem E-15 tem sido comercialmente utilizada na indústria farmacêutica na produção de agentes anti-inflamatórios por sua habilidade de hidrolisar peptídeos inflamatórios como a bradicinina e a histamina (Romero et

al., 2001; Jangyul et al., 2007). Kim et al. (1995) estudaram sua super-expressão para tal finalidade.

Há uma extensa busca por proteases úteis biotecnologicamente dentro do gênero *Serratia*, principalmente produzidas a partir de resíduos. Há relatos para o uso na indústria de detergentes (Doddapaneni et al., 2007); desproteinização de conchas de siri e camarão para extração de quitina e produção de quitinases (Kim et al., 2007; Jo et al., 2008); produção de enzimas (quitinase e quitosanase), antioxidantes e *N*-acetil quitooligossacarídeos a partir de resíduos de lula (pena) (Wang et al., 2008a; 2009a; 2009b); produção de queratinases e degradação de resíduos de penas (Khardenavis et al., 2009); produção de proteases a partir de soro de leite (Romero et al., 2001; Ustáriz et al., 2004).

Sendo assim, a protease queratinolítica semelhante a serralisina produzida pelo isolado *S. marcescens* linhagem P3 pode também ser utilizada biotecnologicamente em processos controlados, visto que sua enzima é produzida com a utilização de resíduos agroindustriais, possui atividade queratinolítica, possui purificação rápida e de baixo custo e é facilmente desnaturada por tratamento térmico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da demanda por novos produtos biotecnológicos mais apropriados para utilização industrial estimula a busca por novos microorganismos em fontes da biodiversidade pouco exploradas biotecnologicamente. A maioria das bactérias reportadas como queratinolíticas foi isolada de solos de indústria avícola (Riffel & Brandelli, 2002; Sangali & Brandelli, 2000) ou de solos previamente incubados com penas (Lucas et al., 2003). Neste trabalho, utilizou-se bactérias degradadoras de penas isoladas de solo de mata nativa amazônica e da mata Atlântica, que também apresentaram potencial biotecnológico, sendo na degradação de resíduos queratinosos ou na produção de enzimas.

A maioria dos isolados selecionados foi identificado como *Bacillus*, cujo gênero foi o maior degradador de penas. O gênero *Bacillus* deve ter um papel efetivo na reciclagem de resíduos queratinolíticos, mas este trabalho corrobora com o fato de que esta capacidade não está restrita a esse gênero na natureza. As bactérias Gram negativas *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 apresentam indícios de proteólise do material queratinoso durante seu crescimento, atividade proteolítica e queratinolítica, além de ter a capacidade de degradar

penas, farinha de pena, cabelo humano e lã de ovelha. K12 é o primeiro isolado do gênero *Aeromonas* descrito como queratinolítico.

O extrato bruto das linhagens A22, K12 e P3 apresentaram atividade máxima em pH e temperaturas de pH 7,0 e 45 °C, pH 8,0 e 55 °C e pH 6,0-6,5 e 45- 50 °C, respectivamente. A atividade proteolítica de A22 e de P3 foi observada em ampla faixa de pH, enquanto que os extratos brutos de K12 e de P3 foram ativos em ampla faixa de temperatura. Essas características, somadas ao perfil de atividade enzimática na presença de diferenças substâncias químicas e sais revelam promissoras aplicações industriais para as enzimas produzidas pelos três isolados.

Através do zimograma e de ensaios enzimáticos com inibidores de protease sugere-se que as linhagens A22, K12 e P3 produzam apenas uma enzima com atividade proteolítica cada, cujas características indicam caráter de metaloprotease. Contudo, nenhum dos três isolados foi reativo para os *primers* do gene de metaloproteases *apr*.

O isolado *Chryseobacterium indologenes* A22 apresentou características similares a *Chryseobacterium* sp. kr6 quanto à cinética de produção da enzima, porém as condições ótimas de produção enzimática, a estabilidade da enzima e a capacidade de degradação de penas da linhagem kr6 são diferentes da linhagem A22. Essas diferenças entre micro-organismos tão próximos filogeneticamente podem sugerir uma possível força seletiva do meio no qual essas linhagens foram isoladas.

Foi possível gerar um modelo validado estatisticamente para otimizar a produção enzimática das linhagens P3 e A22 utilizando o método do

planejamento fatorial. Tanto P3 quanto A22, apresentaram seu ótimo de produção enzimática em pH próximo ao neutro, em temperaturas mesofílicas e com baixas concentrações do resíduo farinha de pena.

O método de purificação sistema aquoso bifásico utilizando PEG/citrato de sódio e PEG/sulfato de amônio foi eficiente na obtenção da enzima queratinolítica de P3 livre dos demais constituintes do sobrenadante do cultivo microbiano. Através de um só passo foi obtida uma banda única em gel de poliacrilamida, que corresponde à atividade proteolítica do zimograma e apresenta massa molecular de aproximadamente 53 kDa.

A protease queratinolítica da linhagem P3, após ter sido submetida à purificação pelo sistema aquoso bifásico e a 24 horas de diálise, mostrou atividade proteolítica similar ao extrato bruto, mantendo sua temperatura ótima a 45 °C e pH 7,0 em azocaseína e apresentando atividade queratinolítica sobre azoqueratina.

O sequenciamento dos peptídeos trípticos gerados a partir da protease queratinolítica da linhagem P3 revelou homologia das sequências com metaloproteases dependentes de zinco semelhante às serralisinas. Apesar das serralisinas serem comumente associadas a fatores de virulência, a importância das patogenias causadas por *Serratia* parece ser menor do que a causada por outras bactérias. Sendo assim, a protease queratinolítica do tipo serralisina produzida pelo isolado *S. marcescens* linhagem P3 pode também ser utilizada biotecnologicamente em processos controlados, visto que sua enzima é facilmente desnaturada por tratamento térmico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P. C. Production, purification, and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 337–342, 2002.

ALMEIDA, M. C. et al. Cutinase purification on poly(ethylene glycol)–hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 711, 151–159, 1998.

ANBU, P. et al. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, p. 639-647, 2005.

ARNESEN, J. A.; EGGSET, G.; JORGENSEN, T. O. Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases from *Aeromonas salmonicida* spp. salmonicida. **Journal of Fish Diseases**, Stirling, v. 18, p. 283-295, 1995.

BACH, E. **Seleção de bactérias queratinolíticas provenientes de solos brasileiros**. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

BACH, H. -J. et al. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, p.173–182, 2001.

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

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

BASTOS, E. R. A et al. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Archives of Microbiology**, New York, v. 174, p. 346–352, 2000.

BASU, B.; APTE, S. K. A novel serralyisin metalloprotease from *Deinococcus radiodurans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1784, p. 1256–1264, 2008.

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

BERNAL, C.; DIAZ, I.; COELLO, N. Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 445-450, 2006b.

BERSANETTI, P. A. et al. Characterization of Arazyme, and exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 574-581, 2005.

BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feather as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, p. 1703-1708, 2005.

BÖCKLE, B.; MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 790–792, 1997.

BODE, W. et al. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOERIS, V. et al. Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasum homogenate. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 44, 1260–1264, 2009.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. New York: Wiley, 1978.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technology**, New York, 2008.

BRANDELLI, A. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic strain of *Chryseobacterium* sp. **Annals of Microbiology**, Milão, v. 55, p. 47-50, 2005.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, Doi: 10.1007/s00253-009-2398-5, 2010.

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

BRADBURY, J. H. The structure and chemistry of keratin fibers. **Advanced Protein Chemistry**, New York, v. 67, p. 111-211, 1973.

BRESSOLIER, P. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 111-211, 1999.

CASARIN, F.; CLADERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food Bioprocess Technology**, New York, v. 1, p. 301–305, 2008.

CHERIF, A. et al. Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 1108–1119, 2003.

CHOI, J. M.; NELSON, P. V. developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources, using poultry feather. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, EUA, v. 121, p. 634-638, 1996.

CORTEZI, M.; CILLI, E. M.; CONTIERO, J. *Bacillus amyloliquefaciens*: a new keratinolytic feather-degrading bacteria. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, India, v. 2, p. 170–177, 2008.

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

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

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

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

DODDAPANENI, K. K. et al. Purification and characterization of two novel extra cellular proteases from *Serratia rubidaea*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1229–1236, 2007.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-18, 1990.

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

EVERBERG, H. et al. Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1122, p. 35–46, 2006.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II errorprobabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FERREIRA, G. B. et al. Partitioning optimization of proteins from *Zea mays* malt in ATPS PEG 6000/CaCl₂. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 50, p. 557-564, 2007.

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

FAKHFAKH, N. et al. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 55, p. 427–436, 2009.

GESSESSE, A. et al. Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 519-524, 2003.

GIONGO, J. L. et al. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 375–382, 2007.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 513-518, 2003.

GHOSH, A. et al. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 452–459, 2007.

GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 53, p. 196–200, 2000.

GRADISAR, H. et al. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: Comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microspores* to some known proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3420–3426, 2005.

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

GUPTA, A. et al. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1069, p. 155–161, 2005.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, p. 15–32, 2002a.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 60, p. 381–395, 2002b.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 70, p. 21–33, 2006.

HADAS, A.; KAUTSKY, L. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen-fertilizer for organic farming. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 38, p 165–170, 1994.

HAMADA, K. et al. Crystal structure of *Serratia* protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a β -sheet coil motif at 2.0 Å resolution. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 119, p. 844–851, 1996.

HOLLAND, K. T. Protease from *Micrococcus sedentarius* from degrading protein oh human callus or corn tissues. **US Patent**, 5213978, 1993.

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

HMIDET, N. et al. Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 47, p. 71–79, 2008.

JANGYUL, K. et al. Biochemical and genetic characterization of an extracellular metalloprotease produced from *Serratia proteamaculans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, n. 5, p. 761-768, 2007.

JO, G. H. et al. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 74, p. 504–508, 2008.

KAUL, S.; SUMBALI, G. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. **Mycopathologia**, The Hague, v. 139, p. 137-140, 1997.

KAUL, R. H. Aqueous two-phase systems: A general overview. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 19, p. 269-277, 2001.

KIM, H. S.; GOLYSHIN, P. N.; TIMMIS, K. N. Characterization and role of a metalloprotease induced by chitin in *Serratia* sp. KCK. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 34, p. 715–721, 2007.

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

KIM, J. M.; CHOI, Y. M.; SUH, H. J. Preparation of feather digests as fertilizer with *Bacillus pumilis* KHS-1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 15, p. 472–476, 2005.

KIM, S. et al. Overproduction of *Serratia marcescens* metalloprotease (SMP) from the recombinant *Serratia marcescens* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 17, p. 497–502, 1995.

KHARDENAVIS, A. A.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. **Waste management**, Oxford, v. 29, p. 1409–1415, 2009.

KLUSKENS, L. D. et al. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennavorans*. **Extremophiles**, Tokyo, v. 6, p. 185–194, 2002.

KONWARH, R. et al. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. **Nanotechnology**, Bristol, v. 20, p.1-10, 2009.

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

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

KUMETA, H. et al. Identification of a member of the serralyisin family isolated psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* 114. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 7, p. 1165-1170, 1999.

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

LAHL, W. J.; BRAUN, S. D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. **Food Technology**, Chicago, v. 48, p. 68–71, 1994.

LAL, S.; RAJAK, R. C.; HASIJA, S. K. Biodegradation of keratin by actinomycetes inhabiting gelatin factory campus at Jablapur: Screening of isolates. **Proceedings of the National Academy of Sciences India**, Allahabad, v. 66, p. 175–180, 1996.

LANE, D. J. 16S/ 23S rRNA sequencing. In **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley. p. 115–175, 1991.

LYERLY, D.; GRAY, L.; KREGGER, A. Characterization of rabbit corneal damage produced by *Serratia* keratitis and by a *Serratia* protease. **Infection and Immunity**, Washington, v. 33, n. 3, p. 927-932, 1981.

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

LIN, X. et al. Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, p. 61, v. 1469–1474, 1995.

LIN, X. et al. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, p. 149-153, 1999.

LIN, H. H.; YIN, L. J.; JIANG, S. T. Cloning, expression, and purification of *Pseudomonas aeruginosa* keratinase in *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS expression system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 3506–3511, 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, F. S. et al. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 282-290, 2003.

LUSTERIO, D. D. et al. Alkali resistant, alkaline endo-1,4-bglucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, p. 1671–1672, 1992.

MACEDO, A. J. et al., Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 594–596, 2005.

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

MAGESTE, A. B. et al. Aqueous two-phase systems: An efficient, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, p. 7623–7629, 2009.

MANCZINGER, L. et al. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 19, p. 35-39, 2003.

MARTY, K. B. et al. Characterization of a cytotoxic factor in culture filtrates of *Serratia marcescens*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1121–1128, 2002.

MATSUMOTO, K. et al. Purification and characterization of four proteases from a clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 157, p. 225-232, 1984.

MILES, A. A. L.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**, London, v. 38, p. 732-749, 1938.

MITSUIKI, S. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiosis* sp. TOA-1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 482–489, 2004.

MOZHINA, N. V. et al. Isolation and properties of *Serratia proteamaculans* 94 cysteine protease. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, EUA, v. 34, n. 3, p. 274–279, 2008.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, R. C. **Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments**. New York: Wiley, 2002.

NAKASONE, N. et al. Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 237, p. 127–132, 2004.

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

NORONHA, E. F. et al. Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* keratinase in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 18, p. 563–568, 2002.

NIETO, T. P., ELLIS, A. Heterogeneity of extracellular proteases produced by different isolates of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* pathogenic for fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 14, p. 229-235, 2006.

OLIVEIRA, L. A. et al. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 693-699, 2002.

ONIFADE, A. A. et al. A review: potentials for biotechnological applications of keratin- degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 66, p. 1-11, 1998.

PALOMARES, M. R. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 807, p. 3–11, 2004.

PAPADOPOULUS, M. C.; BOUSHY, E.; ROODBEEN, A. E. Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 279-290, 1986.

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

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

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

POOLE, A. J.; CHURCH, J. S.; HUSON, M. G. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2009.

POOPATHI, S.; ABIDHA, S. Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 62, p. 479–482, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, doi:10.1007/s12010-009-8702-0, 2010.

PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological reviews**, Baltimore, v. 41, p. 711–53, 1977.

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

RAMNANI, P. et al., Keratinolytic potencial of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, p. 191-196, 2005.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Optimization of medium composition for keratinase production by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnology and applied biochemistry**, Duluth, v. 40, p. 191–196, 2004.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Keratinases vis-à-vis conventional proteases and feather degradation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 23, p. 1537-1540, 2007.

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

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, London, v. 290, p. 205–218, 1993.

RIFFEL, A. **Isolamento e caracterização de uma nova bactéria queratinolítica**. 2002. 85f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 29, p. 255-258, 2002.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 395-399, 2006.

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

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

RISSEN, S.; ANTRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**, Tokyo, v. 5, p. 399- 408, 2001.

ROMERO, F. J. et al. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown on whey. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 507–515, 2001.

SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006.

SINHA, R. et al. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 55, p. 163–166, 1996.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 735- 743, 2000.

SILVEIRA, S. T. et al. Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, DOI 10.1007/s12010-009-8835-1, 2010.

SHIH, J. C. H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization- A review. **Poultry Science**, Champaign, v. 72, p. 1617-1620, 1993.

SPELZINI, D.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. Dependence of chymosin and pepsin partition coefficient with phase volume and polymer pausidispersity in polyethyleneglycol–phosphate aqueous two-phase system. **Colloids and Surfaces . B : Biointerfaces**, Amsterdam, v. 51, p. 80–5, 2006.

STOCKER, W. et al. The metzincins -Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases)

define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v. 4, p. 823-840, 1995.

SUH, H. J.; LEE, H. K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal of protein chemistry**, New York, v. 20, p. 165–169, 2001.

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

SZABO, L. et al. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 16, p. 252–255, 2000.

TAKAMI, H. et al. Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from alkalophilic *Bacillus* sp. no. AH-101. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, p. 1667–1669, 1992.

TAO, K. et al. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 45–49, 2006.

TAO, K. et al. Cloning, expression, and purification of insecticidal protein Pr596 from locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 228–233, 2007.

TATINENI, R. et al. Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp.7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 141, p. 187–202, 2007.

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

THANIKAVELAN, P. et al. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, London, v. 22, p. 181–186, 2004.

TOMARELLI, R. M.; CHARNEY, J.; HARDING, M. L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 34, p. 428-433, 1949.

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

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

THYS, R. C. S. et al. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 67–73, 2006.

USTÁRIZ, F. J. et al. Fermentation of individual proteins for protease production by *Serratia marcescens*. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 19, p. 147–153, 2004.

VESELÁ, M.; FRIEDRICH, J. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 14, p. 84–90, 2009.

VENTER, H.; OSTHOFF, G.; LITTHAUER, D. Purification and Characterization of a Metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* Ix9a and Determination of the Amino Acid Specificity with Electrospray Mass Spectrometry. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 15, p. 282–295, 1999.

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

VIGNARDET, C. et al. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using as an experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 224, p. 115-122, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. Three-dimensional structure of proteins. In: Stiefel J (ed) **Biochemistry** (2. ed). New York: Wiley, p. 154–156, 1995.

WANG, J. J.; SHIH, J. C. H. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 22, p. 608-616, 1999.

WANG, J. J.; SWAISGOOD, H. E.; SHIH, J. C. H. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 81, p. 421–429, 2003a.

WANG, J. J.; SWAISGOOD, H. E.; SHIH, J. C. H. Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 812–819, 2003b.

WANG, J. J.; ROJANATAVORN, K.; SHIH, J. C. H. Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the kerA gene. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 87, p. 459–464, 2004.

WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, Athens, v. 15, p. 544–550, 2006.

WANG, S. L. et al. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 343, p. 1316–1323, 2008a.

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

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

WANG, S. L. et al. Conversion of squid pen by using *Serratia* sp. TKU020 fermentation for the production of enzymes, antioxidants, and N-acetyl chitooligosaccharides. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 44, p. 854–861, 2009a.

WANG, S. L. et al. Conversion of squid pen by *Serratia ureilytica* for the production of enzymes and antioxidants. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 100, p. 316–323, 2009b.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. **Poultry Science**, Champaign, v. 76, p. 491–496, 1997.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697–703, 1991.

WERLANG, P. O.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 120, p. 71–79, 2005.

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

WOODGATE, S. Animal by products the case for recycling: possibilities for profitable nutritional upgrading. In: LYON, T.P. **Biotechnology in feeding industry**. Nicholasville: Alltech Technical, p. 395-407, 1993.

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

YAMAMURA, S. et al. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **Journal of Biosciences and Bioengineering**, Osaka, v. 93, p. 595-600, 2002a.

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

ZAGHLOUL, T. I. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (*aprA*) gene showing high level of keratinolytic activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70, n. 72, p. 199–205, 1998a.

ZAGHLOUL, T. I.; AL-BAHRA, M.; AL-AZMEH, H. Isolation, identification, and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 70, n. 72, p. 207- 213, 1998b.

ZHANG, B. et al. Isolation and characterization of a new *Bacillus* sp. 50-3 with highly alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* faeces. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 25, p. 583–590, 2009.