



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Carlos Eduardo Duffeck

**Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica
funcional**

São José do Rio Preto

2020

Carlos Eduardo Duffeck

Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica funcional

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

São José do Rio Preto

2020

D856p Duffeck, Carlos Eduardo
Prospecção de queratinases microbianas: produção e
caracterização bioquímica funcional / Carlos Eduardo
Duffeck. -- São José do Rio Preto, 2020
56 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas,
São José do Rio Preto
Orientador: Ronivaldo Rodrigues da Silva

1. Enzimas. 2. Queratinase. 3. Queratina. 4. Penas de
frango. 5. Microrganismos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Carlos Eduardo Duffeck

Prospecção de queratinases microbianas: produção e caracterização bioquímica funcional

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

IBILCE – Unesp/São José do Rio Preto/SP

Orientador

Dr^a. Ana Carolina dos Santos Gomes

Pós-doutoranda UNESP – Ilha Solteira/SP

Dr^a. Tatiane Beltramini Souto

Instituto Federal de Minas Gerais - Passos/MG

São José do Rio Preto

15 de Maio de 2020

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Atualmente, a avicultura é um dos setores de grande impacto na economia brasileira. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na produção de frangos de corte, fazendo com que este segmento da indústria gere toneladas de queratina com o descarte de penas. Isso aponta para a necessidade de degradar este material que emerge como um problema ambiental. Neste cenário, as enzimas queratinolíticas têm despertado interesse biotecnológico devido a peculiar capacidade para a degradação de queratina e a possibilidade de aplicar o hidrolisado protéico para suplementação de ração animal e uso como biofertilizantes. Desta forma, neste trabalho, nós propomos prospectar queratinases pela bactéria *Citrobacter diversus* e o fungo *Corioloropsis byrsina* e, em seguida, investigar as características bioquímicas destas enzimas, a fim de propor aplicação na degradação de penas de frango. Em nossos resultados, a bactéria *C. diversus* foi capaz de degradar quase completamente as penas de frango (0,5%) em meio submerso após 36 h de fermentação. O estudo com o extrato enzimático mostrou máxima atividade caseinolítica a pH 9-10,5 e 50-55 °C, e queratinolítica a pH 8,5-9,5 e 50 °C. Em destaque, conforme a estabilidade em incubação por 1 h a 50°C, foi detectado aproximadamente 50% e 100% da atividade queratinolítica e caseinolítica, respectivamente. Sob estabilidade a pH por 48 h a 4°C, o extrato enzimático manteve maior atividade na faixa de pH 6-8. A atividade caseinolítica foi inibida por EDTA e PMSF, e atividade queratinolítica foi inibida por EDTA. Para o fungo *C. byrsina*, nós observamos a secreção de diferentes enzimas proteolíticas, cuja atividade caseinolítica atingiu picos a pH 7,0-9,0 e 60-70 °C, e a pH 10,5 e 55-60°C; e máxima atividade queratinolítica a pH 7,0-7,5 e 40-55°C, e pH 9,0 e 55 °C. Enzimas com melhor atividade caseinolítica na faixa de pH 8,5 demonstraram maior estabilidade a pH 5-6. Enzimas com melhor atividade caseinolítica a pH 10,5 exibiram melhor estabilidade na faixa de pH 6-10. Para atividade queratinolítica, enzimas com melhor atividade a pH 7,5 demonstraram maior estabilidade quando incubadas a pH 10-11, enquanto que enzimas com máxima atividade a pH 9,0 exibiram estabilidade em ampla faixa de pH (5-11). Atividade queratinolítica manteve cerca de 63% de atividade residual em 1 h a 50 °C. A atividade caseinolítica a pH 10,5 mantém-se estável até 1 h a 50 °C, em contraste a atividade a pH 8,5, cuja atividade residual foi 50%. A atividade caseinolítica foi inibida somente por PMSF, enquanto a atividade queratinolítica foi reduzida por PMSF e EDTA. Conforme a atividade e estabilidade em pH alcalino, estas enzimas aparecem como atrativos candidatos para uso em indústria de detergente.

Palavras chaves: Bactéria, detergente, enzimas, fungo, queratina, peptidase, protease

ABSTRACT

Currently, poultry is one of the sectors of great impact on the Brazilian economy. In recent years, there has been an increase in the production of broilers, causing this segment of the industry to generate tons of keratin with the disposal of feathers. This points to the need to degrade this material, which emerges as an environmental problem. In this scenario, keratinolytic enzymes have aroused biotechnological interest due to the peculiar capacity for the degradation of keratin and the possibility of applying protein hydrolyzate to supplement animal feed and use as biofertilizers. Thus, in this work we propose to prospect keratinases for the bacterium *Citrobacter diversus* and the fungus *Corioloropsis byrsina* and, next, to investigate the biochemical characteristics of these enzymes, in order to propose application in the degradation of chicken feathers. In our results, the bacterium *C. diversus* was able to degrade chicken feathers almost completely (0.5%) in submerged medium after 36 h. The study with the enzymatic extract showed maximum caseinolytic activity at pH 9-10.5 and 50-55 °C, and keratinolytic activity at pH 8.5-9.5 and 50 °C. Notably, after enzyme pre-incubation for 1 h at 50 °C, approximately 50% and 100% of keratinolytic and caseinolytic activity were detected, respectively. Under pH stability for 48 h at 4°C, the enzyme extract maintained greater activity in the pH 6-8 range. Caseinolytic activity was inhibited by EDTA and PMSF, and keratinolytic activity was inhibited by EDTA. For the fungus *C. byrsina*, we observed the secretion of different proteolytic enzymes, whose caseinolytic activity reached peaks at pH 7.0-9.0 and 60-70 °C, and at pH 10.5 and 55-60°C; and maximum keratinolytic activity at pH 7.0-7.5 and 40-55°C, and pH 9.0 and 55 °C. Enzymes with better caseinolytic activity at pH 8.5 demonstrated the highest stability at pH 5-6. Enzymes with better caseinolytic activity at pH 10.5 exhibited the highest stability in the pH range 6-10. For keratinolytic activity, enzymes with better activity at pH 7.5 showed the highest stability when incubated at pH 10-11, while enzymes with maximum activity at pH 9.0 exhibited stability at pH range 5-11. Keratinolytic activity maintained approximately 63% of residual activity after incubation for 1 h at 50 °C. The caseinolytic activity at pH 10.5 remains stable for 1 h up to 50 °C, in contrast to the activity at pH 8.5, whose residual activity was 50%. Caseinolytic activity was inhibited only by PMSF, while keratinolytic activity was reduced by PMSF and EDTA. Depending on the activity and stability at alkaline pH, these enzymes appear as attractive candidates for use in the detergent industry.

Keywords: Bacteria, detergent, enzymes, fungus, keratin, peptidase, protease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de queratinases.....	14
Figura 2. Crescimento de <i>C. diversus</i> em meio submerso.....	27
Figura 3 Degradação de pena de frango por <i>C. diversus</i> em meio submerso	28
Figura 4. Efeito de pH na atividade caseinolítica e queratinolítica no extrato fermentativo de <i>C. diversus</i>	29
Figura 5. Efeito de temperatura na atividade caseinolítica e queratinolítica no extrato fermentativo de <i>C. diversus</i>	30
Figura 6. Efeito de pH na estabilidade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. diversus</i>	31
Figura 7. Efeito de temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. diversus</i>	31
Figura 8. Efeito de inibidores na atividade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. diversus</i>	33
Figura 9. Produção de enzimas proteolíticas por cultivo submerso do fungo <i>C. byrsina</i>	36
Figura 10. Efeito de pH na atividade caseinolítica e queratinolítica no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	37
Figura 11. Efeito de temperatura na atividade caseinolítica e queratinolítica no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	38
Figura 12. Efeito de pH na estabilidade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	39
Figura 13. Efeito de temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	40
Figura 14. Efeito de inibidores na atividade das enzimas proteolíticas do extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	42
Figura 15. Zimograma para atividade proteolítica do extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Degradação enzimática de queratina.....	17
Tabela 2. Exemplos do potencial de aplicação de queratinases.....	20

ABREVIACOES UTILIZADAS

D.O.	Densidade 3tica
DTT	Dithiothreitol (Ditiotreitolo)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (3cido etilenodiamino tetra-ac3tico)
PDA	Potato Dextrose Agar (3gar de dextrose de batata)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenil-metil-sulfonila)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de s3dio)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de s3dio)
TCA	Trichloroacetic acid (3cido tricloroac3tico)
TRITON X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol (4-(1,1,3,3 –Tetrametil-butil) fenil-polietileno glicol)
U.A.	Unidade de atividade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Avicultura e queratina.....	12
2.2 Degradação de queratina.....	13
2.3 Os diferentes processos para a biodegradação da queratina.....	15
2.4 Aplicações de queratinases.....	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 Microrganismos e fermentação submersa.....	22
4.2 Ensaio de atividade proteolítica.....	23
4.3 Caracterização bioquímica funcional das peptidases do extrato bruto.....	24
4.3.1 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases.....	24
4.3.2 Efeito de inibidores na atividade das peptidases.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Capítulo I: Produção e caracterização bioquímica funcional de queratinases secretadas por <i>Citrobacter diversus</i>.....	26
5.1.1 Resultados e discussão.....	27
5.1.1.1 Degradação de penas de frango em meio de cultivo submerso.....	27
5.1.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas.....	29
5.1.1.3 Efeito de inibidores na atividade caseinolítica e queratinolítica.....	33
5.2 Capítulo II: Produção e caracterização bioquímica funcional de queratinases secretadas por <i>Corioloopsis byrsina</i>.....	35
5.2.1 Resultados e discussão.....	36
5.2.1.1 Cultivo em meio submerso e produção de enzimas proteolíticas.....	36
5.2.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases.....	37
5.2.1.3 Efeito de inibidores na atividade das peptidases.....	41
6. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação mundial quanto ao aumento populacional tem provocado discussões a respeito da demanda por alimentos, com necessidade em aumentar a produção de vegetais e carne. Como consequência, este cenário aponta para a intensificação no uso de fertilizantes químicos em agricultura, assim como a geração de resíduos derivados da indústria de carne, por exemplo, penas de frango.

Em 2018, a produção mundial de frangos alcançou aproximadamente 95 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor de frango, responsável por 14% deste mercado. Em virtude do aumento na produção de frangos de corte, o descarte de penas vem aumentando progressivamente em todo o mundo. Isso revela a importância em soluções para um destino apropriado deste material e a oportunidade em agregar valor comercial a esses resíduos.

A hidrólise ácida poderia ser utilizada para completa degradação de queratina, entretanto, isso demandaria o uso de alta concentração de ácido forte (exemplo HCl 6M a 110 °C) e consequências para um descarte apropriado deste material. Além disso, a hidrólise ácida pode comprometer a estrutura de alguns aminoácidos e, desta forma, reduzir o valor de mercado do hidrolisado protéico.

Como alternativa, a aplicação de enzimas queratinolíticas atende a demanda global por novas tecnologias que considera processos ecologicamente seguros, com redução no uso de compostos químicos nocivos ao meio ambiente. A tecnologia enzimática é considerada um substituto viável para transformações químicas e tratamentos térmicos na indústria, e para degradação de resíduos derivados da atividade industrial.

Ao nosso entendimento, a prospecção de queratinases oferece oportunidade para novas aplicações, em especial para degradar penas e direcionar os hidrolisados proteicos para uso como suplementação de ração animal e biofertilizantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Avicultura e queratina

A avicultura é um dos setores industriais que tem movimentado a economia global e gerado toneladas de queratina como descarte recalcitrante. Nos últimos anos têm sido observado um aumento na produção de frangos de corte, com destaques para Estados Unidos, Brasil e China (<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>).

No ano de 2018, a produção mundial de frangos atingiu um marca de aproximadamente 95 milhões de toneladas, e o Brasil tem se posicionado como o segundo maior produtor, tendo contribuído com cerca de 13,6 milhões de toneladas (<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>).

Considerando que as penas compreendem cerca de 5-7% do peso de frangos e são compostas por aproximadamente 90% de queratina (SUNTORNUSUK & SUNTORNUSUK, 2003; STAROŃ et al., 2011), uma grande quantidade de material queratinoso pode ser esperada a cada ano. Isso revela a importância em agregar valor comercial a esses resíduos.

A queratina é uma proteína natural e insolúvel presente na camada epidérmica e em estruturas especializadas, como penas, chifres, unhas e cascos de animais (GUPTA & SINGH, 2014; JIN et al. 2017). Com base no enovelamento da cadeia polipeptídica, estas proteínas podem ser classificadas em α -queratinas, cuja estrutura secundária demonstra predominância de hélice α , presentes por exemplo em epiderme de pele; e β -queratinas, que possuem uma estrutura secundária com predominância de folhas β -pregueada, presentes em estruturas como, penas, bicos e garras de pássaros (WANG et al., 2016; JIN et al. 2017; NAVONE & SPEIGHT, 2018).

Quanto ao conteúdo de cisteína, estas proteínas podem ser classificadas em *soft* queratina (<10% de cisteína) e *hard* queratina (10-14% de queratina) (JIN et al. 2017). A estrutura molecular das queratinas apresenta um grande número de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto que contribuem para um arranjo molecular altamente organizado, como ocorre em penas (*hard* queratina), tornando a proteína mecanicamente robusta e resistente à proteólise por peptidases convencionais, como papaína, pepsina e tripsina (SILVA, 2017).

2.2 Degradação de queratina

Hidrolisados de queratina podem ser obtidos por tratamento com álcalis, ácidos ou enzimas (WU et al., 2017). Entre estas opções de tratamento, a vantagem da hidrólise enzimática é bem conhecida; o processo enzimático ocorre sob condições de reação mais brandas e não requer a utilização de reagentes nocivos ao ambiente (MARTINEZ et al., 2020).

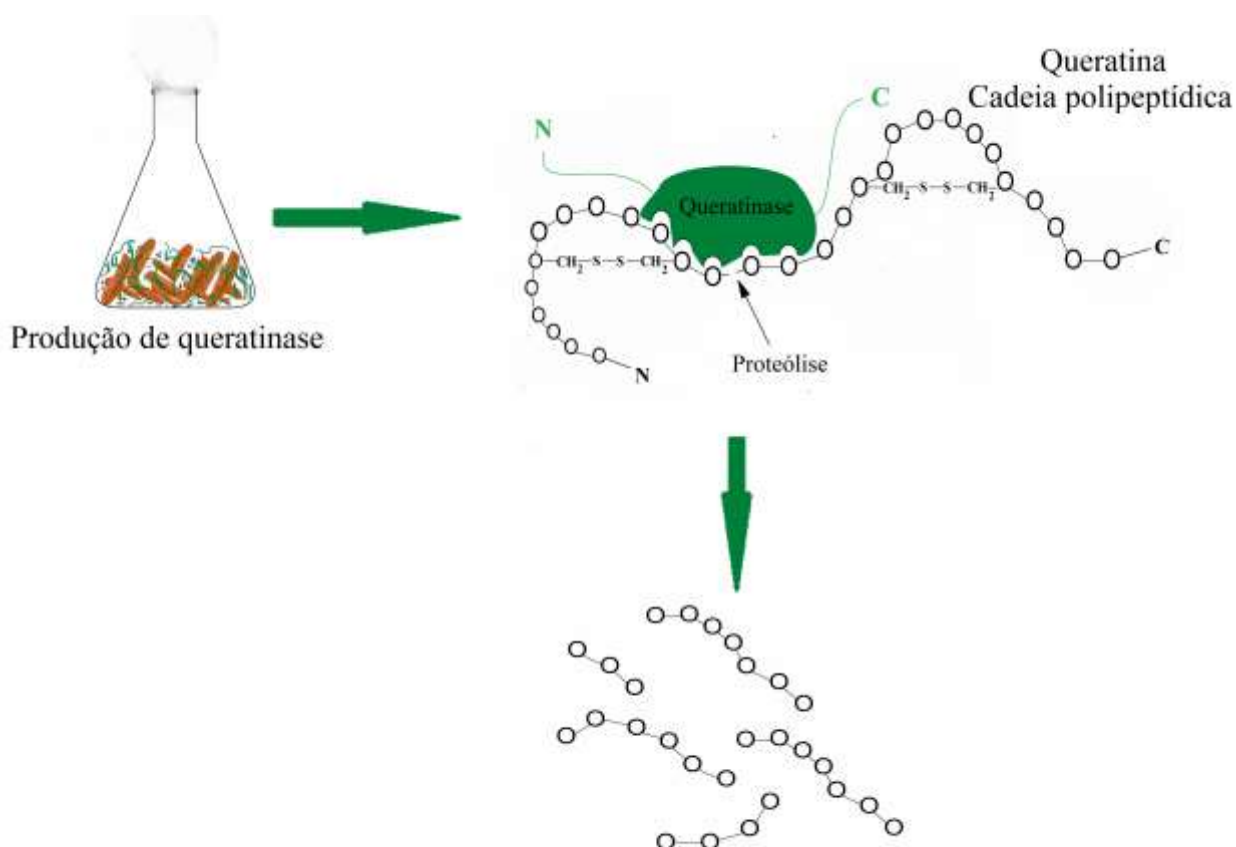
No que se refere ao uso de hidrolisado de queratina como fonte de aminoácidos, os tratamentos físico-químicos podem causar a desestruturação de aminoácidos (como metionina, glutamina e triptofano) e, conseqüentemente, diminuir seu valor nutricional (FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010; MARTINEZ et al., 2020).

A demanda global por novas tecnologias considera processos que são ecologicamente seguros, favorecendo a redução no uso de compostos químicos nocivos ao meio ambiente. A este respeito, a tecnologia enzimática é considerada um substituto viável para transformações químicas, e para degradação de resíduos derivados da atividade industrial (SILVA, 2018 a, b, c).

A falta de uso para o material queratinoso e seu descarte na natureza, torna-o um problema ambiental devido a dificuldade em sua decomposição (MARTINEZ et al.,

2020). Assim, a hidrólise da queratina tem sido estudada principalmente como um método para preparar hidrolisados de proteínas para suplementação de ração animal, produção de peptídeos bioativos e fertilização orgânica (SILVA, 2017). Por este motivo, a prospecção de queratinases tem recebido atenção nos últimos anos (Figura 1).

Figura 1. A ilustração mostra um esquema simples para a produção de queratinases a partir de microrganismos e sua ação na decomposição de queratina. As queratinases são biocatalisadores promissores para aplicação no processamento industrial sustentável de resíduos queratinosos e descontaminação de príons (Adaptado SILVA, 2018a).



Fonte: Adaptado SILVA, 2018a

Por definição, as queratinases são enzimas proteolíticas (peptidases ou proteases) capazes de clivar ligações peptídicas na queratina (SILVA, 2017). A maioria dos estudos sobre queratinases identificou serino peptidases monoméricas alcalinas

(ANBU et al., 2008; RAI et al., 2009; KAINOOR & NAIK, 2010; Lv et al., 2010; TIWARY & GUPTA, 2010; GEGECKAS et al., 2014; SANGHVI et al., 2016; BOUACEM et al., 2016; FELLAHI et al., 2016; VERMA et al., 2016) e, menos freqüentemente, as metalo peptidases monoméricas alcalinas (LEE et al., 2002; EL-GENDY, 2010; MAZOTTO et al., 2013; ZHANG et al., 2016a; MOHAMAD et al., 2017). Alguns estudos também descreveram queratinases aspárticas isoladas de leveduras (NEGI et al., 1984; LIN et al., 1993) e queratinases diméricas (TIWARY; GUPTA, 2010).

2.3 Os diferentes processos para biodegradação da queratina

Lange et al. (2016) discutiram a respeito do mecanismo de degradação de queratina na natureza. A decomposição da queratina pode depender de um repertório de peptidases (endo-, exo- e oligopeptidases) e enzimas auxiliares, como a dissulfeto redutase, ou reações de oxidoredução envolvendo sulfeto. Desta forma, na natureza, a degradação de queratina é realizada pela ação sinérgica de várias enzimas (YAMAMURA et al. 2002; LANGE et al., 2016; GUPTA & SINGH, 2014). Mecanismos semelhantes de degradação são observados com outros compostos complexos, como lignina, celulose e hemicelulose.

De fato, a quebra da ligação dissulfeto contribui para o aumento da atividade queratinolítica. Isso tem sido demonstrado em várias investigações nas quais os complexos de queratinase-queratina foram incubados com agentes redutores, como ditioneitol (DTT) ou β -mercaptoetanol (Lv et al., 2010; PRAKASH et al., 2010; JIN et al., 2017; KAINOOR & NAIK, 2010).

Contudo, apesar da sinergia entre sulfitólise e proteólise, também tem sido demonstrado que, em comparação às queratinases, muitas peptidases convencionais, como tripsina, pepsina e papaína, são menos eficientes para a hidrólise da queratina, mesmo após o rompimento das ligações dissulfeto (GUPTA et al., 2012). Isso reforça a peculiaridade de queratinases para a hidrólise desta proteína.

Em adição, ao contrário da ação sinérgica demonstrada anteriormente, algumas investigações reportaram atividade queratinolítica de queratinases purificadas, sugerindo que a queratinólise, nestes casos, foi independente da presença de enzimas auxiliares. Isso foi relatado, por exemplo, para as serino queratinases isoladas de *Bacillus thuringiensis* AD-12 (GEGECKAS et al., 2014), *Actinomadura keratinilytica* Cpt29 (HABBECHÉ et al., 2014), *Bacillus pumilus* K-9 (GONG et al., 2015), *Caldicoprobacter algeriensis* (BOUACEM et al., 2016), *Bacillus subtilis* DP1 (SANGHVI et al., 2016) e metalo queratinases de *Acinetobacter* sp. R-1 (ZHANG et al., 2016a) e *Bacillus pumilus* NRC21 (TORK et al., 2016). Além disso, alguns exemplos de queratinases recombinantes também foram relatados, como mostrado por Radha & Gunasekaran (2009), Hu et al. (2013) e Dong et al. (2017), entre outros (Tabela 1). Pillai et al. (2011) também purificaram uma serino queratinase isolada de *Bacillus subtilis* onde se observou atividade sulfitolítica e proteolítica na hidrólise de queratina (Tabela 1).

Tabela 1. Degradação enzimática de queratina

Microrganismo	Queratinólise	Referências
<i>Bacillus subtilis</i> (RSE163 e RSE165)	Extrato enzimático bruto: sulfitólise e proteólise	GUPTA, SINGH, 2014
<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain D-1	Enzimas puras: sulfitólise (disulfito reductase) e proteólise (peptidase)	YAMAMURA et al. (2002)
<i>Bacillus halodurans</i> PPKS-2		PRAKASH et al. (2010)
<i>Bacillus thuringiensis</i> AD-12	Queratinase pura	GEGECKAS et al. (2014)
<i>Actinomadura keratinilytica</i> Cpt29	Queratinase pura	HABBECHÉ et al. (2014)
<i>Thermoactinomyces</i> sp. RM4	Queratinase pura	VERMA et al. (2016)
<i>Bacillus pumilus</i> K-9	Queratinase pura	GONG et al. (2015)
<i>Caldicoprobacter algeriensis</i>	Queratinase pura	BOUACEM et al. (2016),
<i>Bacillus subtilis</i> DP1	Queratinase pura	SANGHVI et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> P13	Queratinase pura	PILLAI et al. (2011)
<i>Acinetobacter</i> sp. R-1	Queratinase pura	ZHANG et al. (2016a)
<i>Bacillus pumilus</i> NRC21	Queratinase pura	TORK et al. (2016)
Gene de <i>Bacillus licheniformis</i> MKU3 expresso em <i>Bacillus megaterium</i> MS941 e <i>Pichia pastoris</i> X33	Queratinase recombinante	RADHA & GUNASEKARAN (2009)
Gene de <i>Bacillus licheniformis</i> expresso em <i>Escherichia coli</i>	Queratinase recombinante	HU et al. (2013)
Gene de <i>Bacillus polyfermenticus</i> B4 expresso em <i>Bacillus subtilis</i>	Queratinase recombinante	DONG et al. (2017)
<i>Bacillus licheniformis</i> N22	Queratinase de <i>B. licheniformis</i> N22 e biosurfactante isolado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OKOROMA et al. (2013)

2.4 Aplicações de queratinases

A superpopulação já é uma realidade, e a necessidade por tecnologias alternativas para atender à crescente demanda por alimentos tem sido muito discutida no contexto da agricultura sustentável (COLLA et al., 2017). O aumento previsto da temperatura global, a escassez de água potável e a fertilidade e desertificação do solo são obstáculos que precisam ser superados para aumentar a produtividade das culturas com uma dependência muito reduzida de fertilizantes inorgânicos (SILVA, 2018d).

Uma prática promissora tem direcionado o uso de hidrolisados de proteínas como biofertilizantes para cultivo de plantas, a fim de reduzir o uso de fertilizantes inorgânicos (COLLA et al., 2017; SANTI et al., 2017; VERMA et al., 2017). Isso ganha mais destaque ao usar matéria-prima de valor econômico limitado, como a queratina derivada de aves, para uso como fonte básica desses fertilizantes. Essa tecnologia se encaixa no conceito de agricultura sustentável, podendo mitigar os efeitos práticos da infertilidade do solo e resolver um problema ambiental de descarte inadequado de penas de frango.

Outras aplicações para queratinases têm sido recentemente descritas, tais como o uso destas enzimas em tratamento capilar e cremes depilatórios (SANGHVI et al., 2016), aditivos em detergentes para remoção de manchas de proteína (PAUL et al., 2014; PAUL et al., 2016), biopesticidas para controle de mosquitos (BOUACEM et al., 2016), processamento de couro (BOUACEM et al., 2016; PAUL et al., 2016), produção de peptídeos (GEGECKAS et al., 2014), e o uso de hidrolisado de penas para a produção de biogás (FELLAHI et al., 2016; PATINVOH et al., 2016), entre outros (Tabela 2).

Aqui, vale ressaltar a atenção dedicada às tentativas para degradação de príons como um método de descontaminação segura. Nos últimos anos, alguns estudos demonstraram a aplicação bem-sucedida dessas enzimas na clivagem e desativação da ação patológica de príons.

Okoroma et al. (2013) isolaram uma queratinase de *Bacillus licheniformis* N22, que foi capaz de degradar príons. Após a exposição da proteína príon à enzima queratinase, os autores não conseguiram detectar o PrP^{Sc} (proteína príon Scrapie) por análise de *Western blot*. Chen et al. (2005) também já haviam demonstrado degradação de príons por queratinases. Mitsuiki et al. (2006) relataram degradação completa da proteína príon após a incubação de 4, 10 e 20 µg de queratinase purificada com um homogenato de cérebro contendo príon em tampão glicina 0,2 M a pH 11,0 e 50 °C. Yoshioka et al. (2007) também descreveram uma queratinase com capacidade de degradar proteínas de príons derivadas de homogenato de cérebro bovino (Tabela 2).

Tabela 2. Alguns exemplos do potencial de aplicação de queratinases

Fonte de queratinase	Tipo catalítico	Potencial de aplicação	Referências
<i>Bacillus subtilis</i> DP1	Serino queratinase	Cosméticos: tratamento de cabelo, creme depilatório	SANGHVI et al. (2016)
<i>Paenibacillus woosongensis</i> TKB2 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Serino queratinase	Aditivo em detergente	FANG et al. (2016), PAUL et al. (2014), PAUL et al. (2016), GONG et al. (2015)
<i>Gibberella intermedia</i> CA3-1	Não identificado	Aditivo em detergente	ZHANG et al. (2016b)
Espécies de bactérias <i>Caldicoprobacter algeriensis</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i>	Serino queratinase	Tratamento de couro: substituto para sulfites	FANG et al. (2016), PAUL et al. (2016), BOUACEM et al. [15], ZHANG et al. (2016c)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Serino queratinase	Biopesticidas para controle de mosquito	POOPATH et al. (2014)
<i>Bacillus thuringiensis</i> AD-12	Serino queratinase	Hidrolisado proteico a partir de queratina	GEGECKAS et al. (2014)
<i>Bacillus</i> sp.	Serino queratinase	Hidrolisado proteico para produção de biogás	FELLAHI et al. (2016), PATINVOH et al. (2016)
<i>Thermoactinomyces</i> sp. RM4	Serino queratinase	Agricultura: hidrolisado de pena para produção ácido indolacético e potencial função para crescimento vegetal	VERMA et al. (2016)
<i>Bacillus licheniformis</i> N22	Serino queratinase	Medicina: degradação de príons	OKOROMA et al. (2013), CHEN et al.

<i>Nocardiosis</i> sp. TOA-1			(2005), MITSUIKI et al.
<i>Bacillus</i> sp.			(2006), YOSHIOKA et al. (2007)
<i>Fusarium</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Microsporum</i> sp., <i>Trichophyton</i> sp.	-	Degradação de resíduos queratinosos	CĂLIN et al. (2017)
<i>Aphanoascus fulvescens</i>	-	Degradação de resíduos queratinosos	BOHACZ (2017)
<i>Chrysosporium articulatum</i>			

3. OBJETIVOS

Este projeto propôs investigar a capacidade do fungo filamentoso *Coriolopsis byrsina* e da bactéria *Citrobacter diversus* para degradar queratina de pena de frango, e caracterização bioquímica funcional das queratinases secretadas por estes microrganismos.

São os objetivos específicos:

- 1) Investigar a capacidade de produção de queratinases por fermentação submersa.
- 2) Investigar o efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da (s) enzimas (s), e o efeito de inibidores na atividade enzimática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e fermentação submersa

Neste trabalho nós utilizamos o fungo filamentoso *Coriolopsis byrsina* e a bactéria *Citrobacter diversus*. Estes microrganismos foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Unesp, São José do Rio Preto/SP.

Inicialmente, o fungo foi cultivado em Erlenmeyer (125 mL) contendo 30 mL de meio PDA. O meio de cultura foi incubado a 30 °C por 5 dias e após o crescimento microbiano, uma suspensão micelial foi feita por adição de 30 mL de água estéril. Então, 1 mL desta suspensão foi utilizada para inocular os meios de fermentação submersa composto por KH_2PO_4 (0,7%), K_2HPO_4 (0,2%), MgSO_4 (0,01%), CaCl (0,01%), extrato de levedura (0,1%) e pena de frango de granja (0,5 %), pH 6,0. O volume de meio de fermentação foi 50 mL em erlenmeyer de 250 mL e o cultivo em meio submerso foi conduzido por 15 dias (360 h), sendo que a cada 24 horas um frasco foi removido para dosagem de atividade proteolítica por método caseinolítico.

Para a bactéria, um cultivo inicial foi realizado em tubo de ensaio contendo meio inclinado com a seguinte composição: glicose (0,2%), NaCl (0,1%), triptona (1%), extrato de levedura (0,5%) e ágar (1,5%), e incubado por 2 dias a 30 °C. Em seguida, foi cultivado um pré-inóculo em meio submerso similar ao meio anterior (sem ágar), para fins de obtenção de uma suspensão de células. Após isso, ao meio fermentativo foi inoculado 0,3 mg de células. O meio de fermentação submersa foi composto por NaCl (0,05%), KH₂PO₄ (0,07%), K₂HPO₄ (0,15%), MgSO₄ (0,01%) e 0,5% pena de frango de granja, pH 7,2. O volume de meio foi 50 mL em erlenmeyer de 250 mL, e o cultivo foi conduzido por 10 dias (240 h), sendo que a cada 24 horas um frasco foi removido para dosagem de atividade proteolítica por método caseinolítico.

4.2 Ensaio de atividade proteolítica

A atividade caseinolítica e queratinolítica foi mensurada usando caseína bovina (1%) e queratina azure (0,5%), respectivamente.

Para atividade queratinolítica, 0,4 mL de enzima foi incubado com 1,2 mL de suspensão de queratina azure 0,5% imersa em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8, e mantido a 40 °C por 5 horas. Após isso, a reação enzimática foi interrompida com adição de ácido tricloroacético 10% (TCA). Tubos brancos tiveram o TCA 10% adicionado antes do substrato na mistura de reação. Em seguida os tubos de reação e brancos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 25 °C, e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática em espectrofotômetro a 595 nm.

Para atividade caseinolítica (SARATH et al., 1996), 0,1 mL de enzima foi incubado com 0,5 mL de caseína 1% diluída em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8, e mantido a 40 °C por 20 min. Após isso, a reação enzimática foi interrompida com

adição de ácido tricloroacético 10% (TCA). Tubos brancos tiveram o TCA 10% adicionado antes do substrato na mistura de reação. Em seguida os tubos de reação e brancos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 25 °C, e o sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade enzimática em espectrofotômetro a 280 nm.

A unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para promover o aumento de 0,01 na absorbância a 595 nm para queratina azure (atividade queratinoítica U/mL/h) (VERMA et al., 2016), e a 280 nm para caseína (atividade caseinolítica (U/mL/min) (KOCABIYIK & OZDEMIR, 2006)

4.3 Caracterização bioquímica funcional das peptidases do extrato bruto

4.3.1 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases

Estes estudos foram realizados utilizando os substratos mencionados no item anterior. A determinação do pH ótimo para a atividade caseinolítica foi realizada a 45 °C utilizando os seguintes tampões: acetato (pH 5,0), MES (pH 5,5; 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 e 7,5), POPSO (pH 8,0 e 8,5), glicina (pH 9,0 e 9,5) e CAPS (pH 10,0 e 10,5), todos a 0,1 M. Para atividade queratinolítica, a faixa de pH ótimo avaliada foi de pH 7 a 11, utilizando os tampões descritos anteriormente para esta faixa de tamponamento.

O efeito da temperatura na atividade das peptidases foi investigado conforme o perfil de atividade de cada extrato. Para o extrato proveniente da fermentação da bactéria *C. diversus*, a temperatura ótima foi avaliada na faixa de 40 °C a 65 °C, enquanto que para o fungo *C. byrsina* foi na faixa de 30 °C a 80 °C.

Quanto a estabilidade térmica, os extratos foram previamente incubados por 1 hora na faixa de temperatura de 30 °C a 60 °C. Enquanto a estabilidade por efeito de pH

foi avaliada por incubação do extrato da fermentação durante 48 h a 4 °C nos diferentes pH (pH 5,0 a 11). Em ambos os casos, após o tempo de incubação, a reação enzimática foi conduzida utilizando o pH e temperatura ótimos de atividade pré-determinado para cada extrato.

4.3.2 Efeito de inibidores na atividade das peptidases

Para determinar o mecanismo de ação das peptidases, utilizamos os seguintes inibidores: fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) e E-64, na concentração final de 5 mM.

Em todos os ensaios as enzimas foram pré-incubadas por 5 min a temperatura de reação. As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada extrato.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão abordados separadamente para cada microrganismo, como capítulo I e II

5.1 CAPÍTULO I

Produção e caracterização bioquímica funcional de queratinases secretadas por *Citrobacter diversus*

Resumo

Atualmente, a avicultura é um dos setores de grande impacto na economia mundial. Nos últimos anos, tem sido observado um aumento na produção de frangos de corte, fazendo com que este segmento da indústria gere toneladas de queratina com o descarte de penas. Isso aponta para a necessidade de degradar este material que emerge como um problema ambiental. Desta forma, neste capítulo nós discutimos a capacidade de degradação de queratina pela bactéria *Citrobacter diversus* e as características bioquímicas destas enzimas. Em nossos resultados, a bactéria foi capaz de degradar quase completamente as penas de frango (0,5%) em meio submerso após 36 h de fermentação. O estudo com o extrato enzimático mostrou máxima atividade caseinolítica a pH 9-10,5 e 50-55 °C, e queratinolítica a pH 8,5-9,5 e 50 °C. Em destaque, conforme a estabilidade em incubação por 1 h a 50 °C, foi detectado aproximadamente 50% e 100% da atividade queratinolítica e caseinolítica, respectivamente. Sob estabilidade a pH por 48 h a 4 °C, o extrato enzimático manteve maior atividade na faixa de pH 6-8. A atividade caseinolítica foi inibida por EDTA e PMSF, e atividade queratinolítica foi inibida somente por EDTA. Conforme a atividade e estabilidade em pH alcalino, estas enzimas podem ser aplicadas como aditivos em detergentes.

Palavras chaves: Bacteria, detergente, enzimas, queratina, peptidase, protease

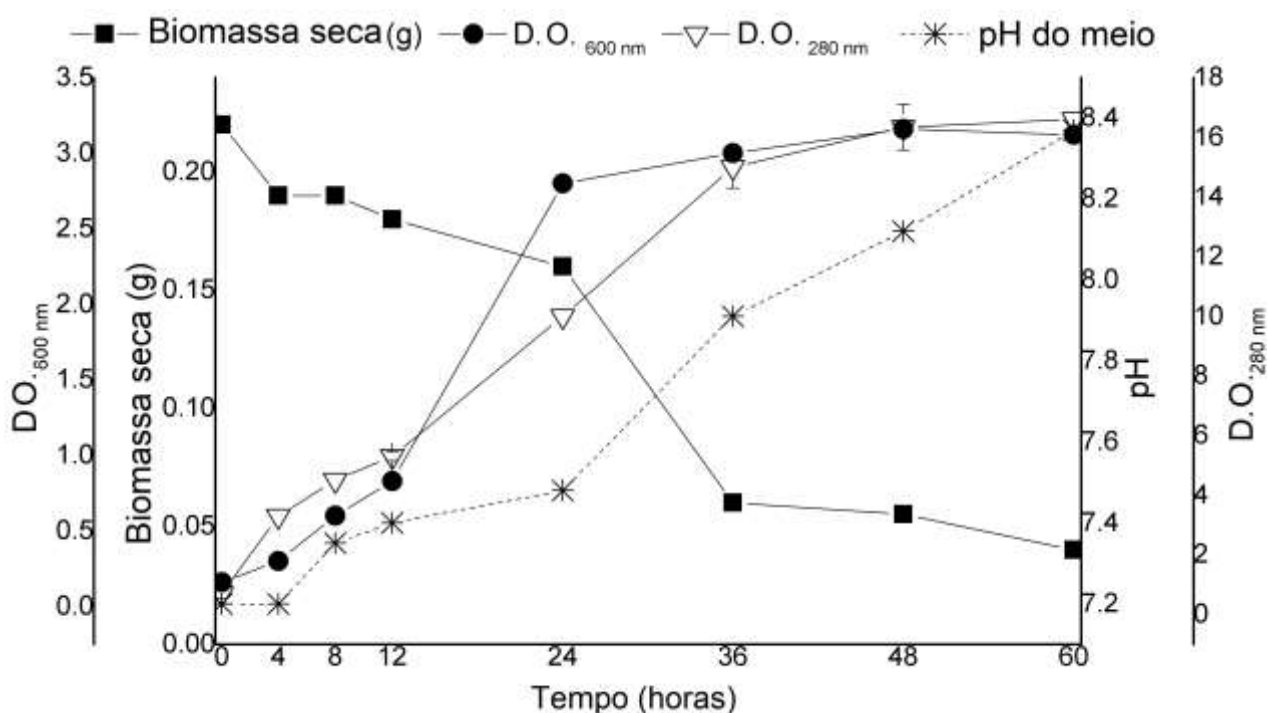
5.1.1 Resultados e discussão

5.1.1.1 Degradação de penas de frango em meio de cultivo submerso

Em meio de cultivo submerso, a bactéria exibiu máxima degradação da pena de frango (0,5%) durante 36 h de cultivo. Na figura 2, é possível acompanhar a degradação da pena de frango por quantificação da biomassa seca final e sua relação com o aumento da turbidez do meio em medida de densidade óptica a 600 nm e o aumento de absorvância a 280 nm. Fica notório que a perda de biomassa da fermentação está relacionada ao aumento da turbidez do meio resultante da degradação da pena de frango e crescimento microbiano.

Na figura 3 é possível observar a comparação entre a pena de frango antes e após 36 horas de cultivo em meio submerso.

Figura 2. Crescimento de *C. diversus* em meio submerso contendo 0,5% de pena de frango, pH inicial 7,2. Amostras foram coletadas em diferentes tempos (4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 60 h) e avaliadas quanto a D.O. 280 nm e 600 nm, pH final e degradação das penas.



Fonte: Autoria própria

Figura 3 Degradação de pena de frango por *C. diversus* em meio submerso



Fonte: Autoria própria

Como resultado do crescimento microbiano e metabolismo de aminoácidos derivados da hidrólise proteica, o aumento da turbidez e pH do meio foi observado, demonstrando a capacidade da bactéria para eficientemente degradar queratina (GURAV et al., 2016). A performance de degradação de queratina demonstrada aqui (~80% em 36 h) foi superior a bactéria *Kocuria rhizophila* p3-3, cujo degradou apenas 52% da pena de frango em 96 h de cultivo submerso (LABA et al., 2018) e similar ao demonstrado por *Alcaligenes* sp. AQ05-001 em 36 h de cultivo (YUSUF et al., 2016).

O uso de enzimas microbianas para a degradação de resíduos queratinosos, em especial penas, se mostra uma valiosa alternativa para solucionar problemas de acúmulo deste subproduto da avicultura. Diferentemente da hidrólise ácida, a ação de queratinase ocorre em condições mais brandas com reduzido comprometimento ao hidrolisado proteico (SILVA, 2018ac).

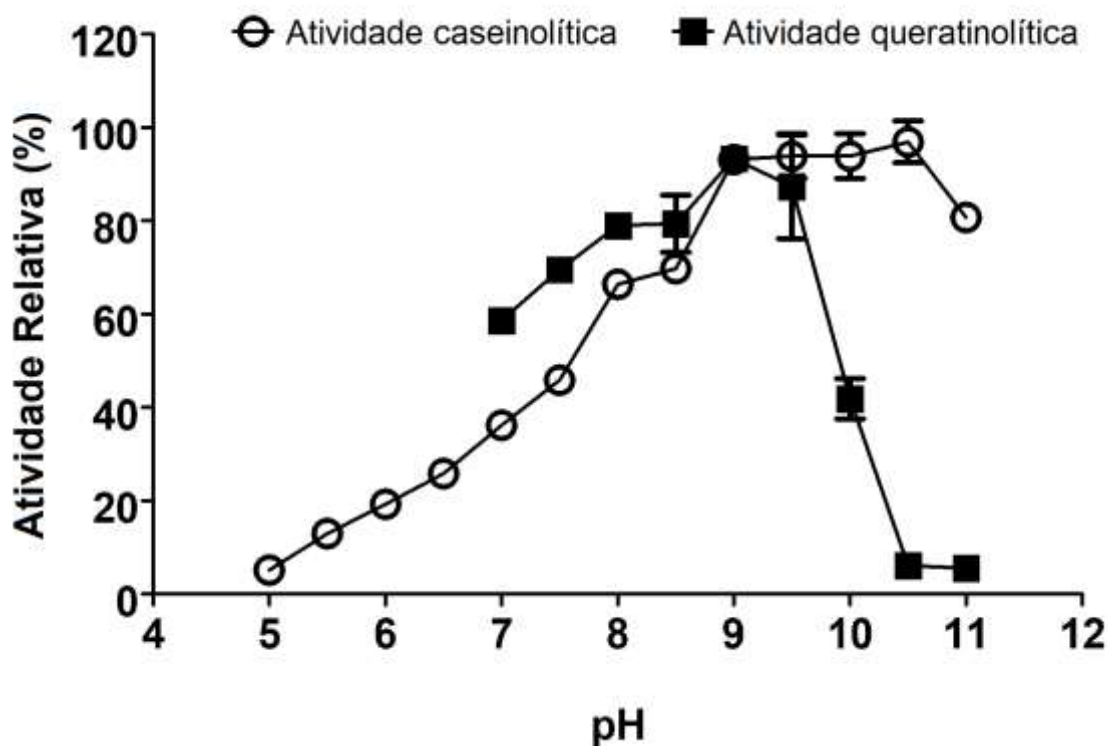
Após 36 h, o extrato fermentativo foi removido e utilizado para caracterização bioquímica funcional das enzimas.

5.1.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das enzimas

As enzimas proteolíticas presentes no extrato fermentativo foram avaliadas quanto a atividade caseinolítica e queratinolítica. Conforme mostrado nas figuras 4 e 5, a máxima atividade caseinolítica ocorreu a pH 9-10,5 ($p = 0,6$) e 50-55 °C ($p = 0,12$), enquanto que a maior atividade queratinolítica foi encontrada a pH 8,5-9,5 ($p = 0,14$) e 50 °C.

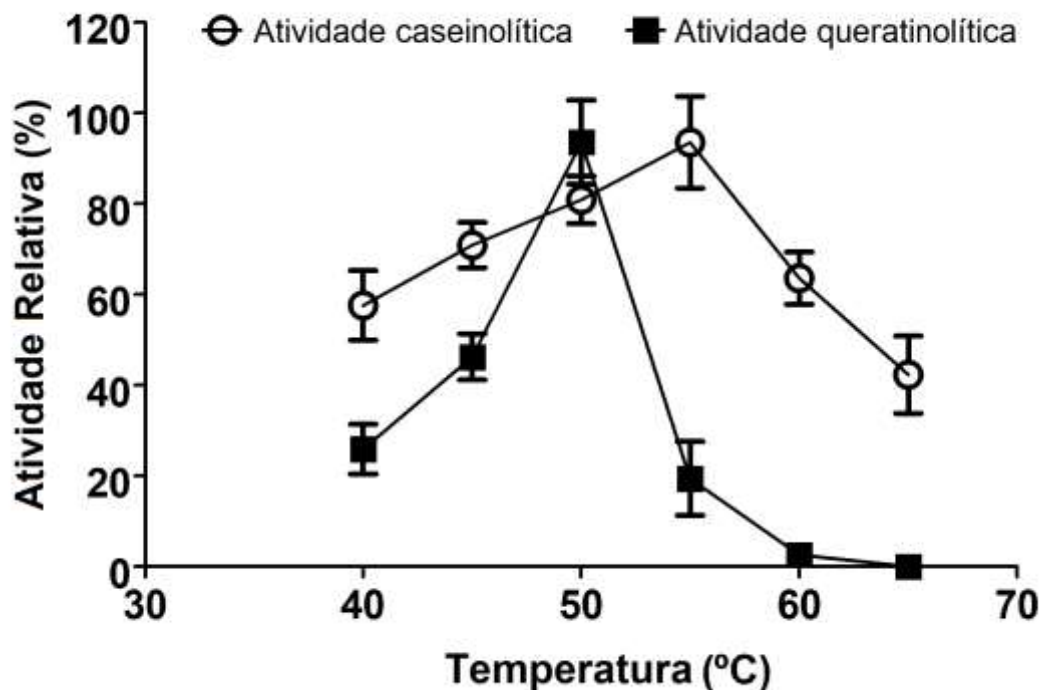
Para ambos os substratos, a atividade proteolítica foi melhor em pH alcalino, entretanto a atividade caseinolítica mostrou-se mais estável a pH acima de 9,5, tendo sido observado aproximadamente 80% de atividade a pH 11, enquanto que a atividade queratinolítica foi completamente perdida a pH 10,5-11. Um comportamento similar ocorreu sob efeito de temperatura na catálise, a atividade caseinolítica mostrou-se menos sensível do que a atividade queratinolítica, a 60 °C a atividade queratinolítica não foi observada, enquanto que 60% de atividade caseinolítica foi mantida.

Figura 4. Efeito de pH na atividade caseinolítica e queratinolítica. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos a 40 °C.



Fonte: Autoria própria

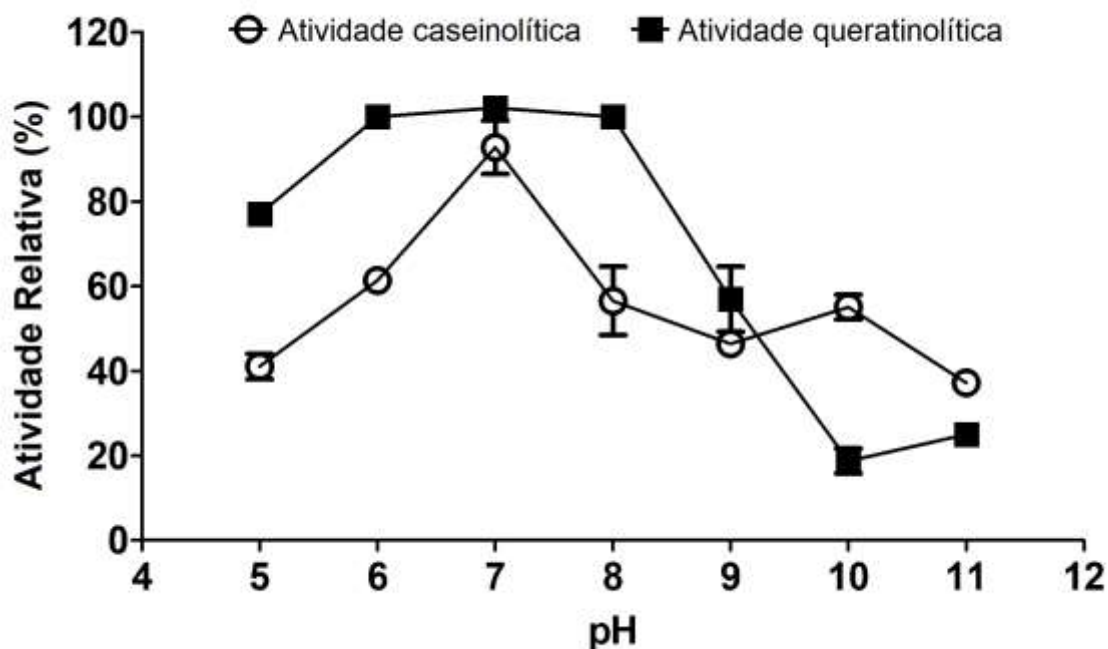
Figura 5. Efeito de temperatura na atividade caseinolítica e queratinolítica. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos em pH ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

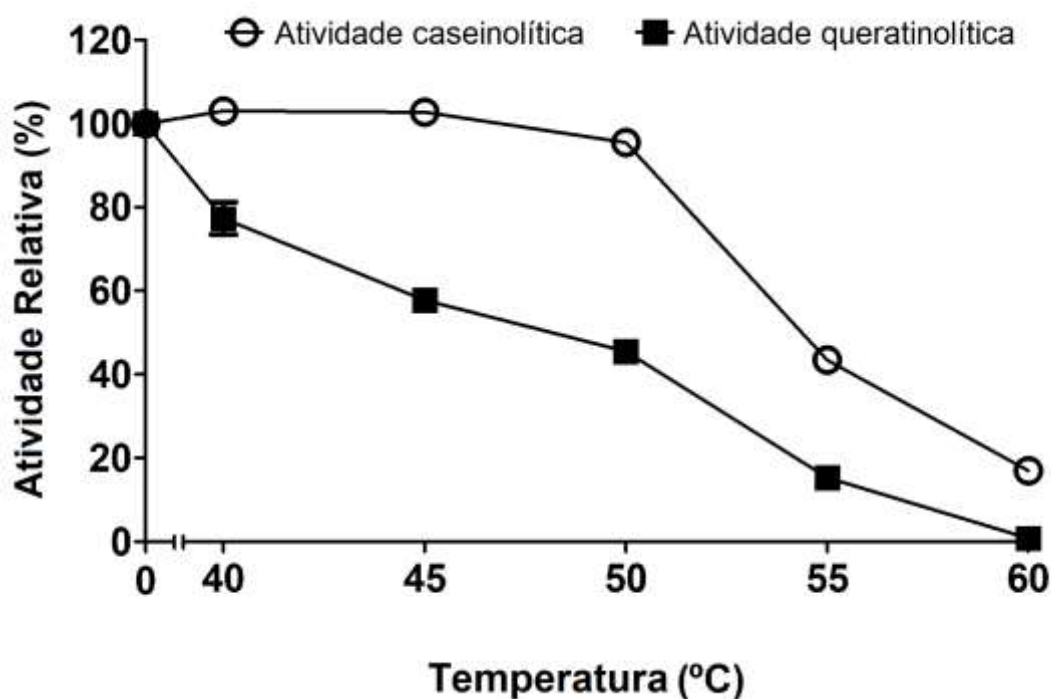
Em teste com incubação a diferentes pH a 4 °C por 48 horas, uma maior atividade caseinolítica e queratinolítica (acima de 60%) foi mantida na faixa de pH 6-8 (Figura 6). Quando incubado por 1 h a diferentes temperaturas, a atividade queratinolítica foi mantida em 80% a 40 °C, 45% a 50 °C, 20% a 55 °C e perda total da atividade a 60 °C (Figura 7). Em contraste, a atividade caseinolítica manteve-se mais estável em temperaturas até 50 °C, não tendo sido observado nenhuma perda de atividade quando exposta por 1 h a 40, 45 e 50 °C.

Figura 6. Efeito de pH na estabilidade das enzimas. O extrato enzimático foi pré-incubado por 48 h a 4 °C em diferentes pH. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

Figura 7. Efeito de temperatura na estabilidade das enzimas. O extrato enzimático foi pré-incubado por 1 hora a diferentes temperaturas. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

É de conhecimento que a interação enzima-substrato é peculiar para cada complexo reacional (SILVA, 2017). Em interação com queratina azure e caseína, diferenças no pico de atividade enzimática foi observado, cuja atividade queratinolítica apresentou pH e temperatura ótima inferior a atividade caseinolítica, porém, ambas com máxima atividade em pH alcalino. Diferentemente da caseína, é importante ressaltar que a degradação de queratina é um processo sinérgico que depende de enzimas capazes de agir neste substrato, por meio de sulfitólise e proteólise (LANGE et al., 2016). Isso também pode provocar diferenças nos picos de atividade enzimática entre estes dois substratos.

Uma variedade de estudos tem demonstrado atividades queratinolíticas em pH similar ao encontrado aqui, Lv et al., (2010) e Barman et al. (2017) reportaram queratinases de *Chryseobacterium* L99 sp. nov. e *Arthrobacter* sp. NFH5 com ótima atividade a pH 8, respectivamente. Zhang e colaboradores (2016bc) descreveram uma queratinase de *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798 com atividade ótima a pH 8 e maior estabilidade na faixa de pH 6-8, e uma atividade queratinolítica de *Gibberella intermedia* CA3-1 com ótima performance a pH 9 e estabilidade em faixa de pH 6-9. Além da estabilidade a pH, a termoestabilidade das enzimas descrita aqui mostrou-se superior ao reportado em *Gibberella intermedia* CA3-1 cujo aproximadamente 20% de atividade residual foi observada após pré-incubação a 40 °C por 1 h. Outros resultados com mesma faixa de atividade ótima têm sido reportados em *Actinomyces*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Fervidobacterium*, *Micrococcus*, *Microsporium*, *Nocardiopsis*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* (TAMREIHAO et al., 2019).

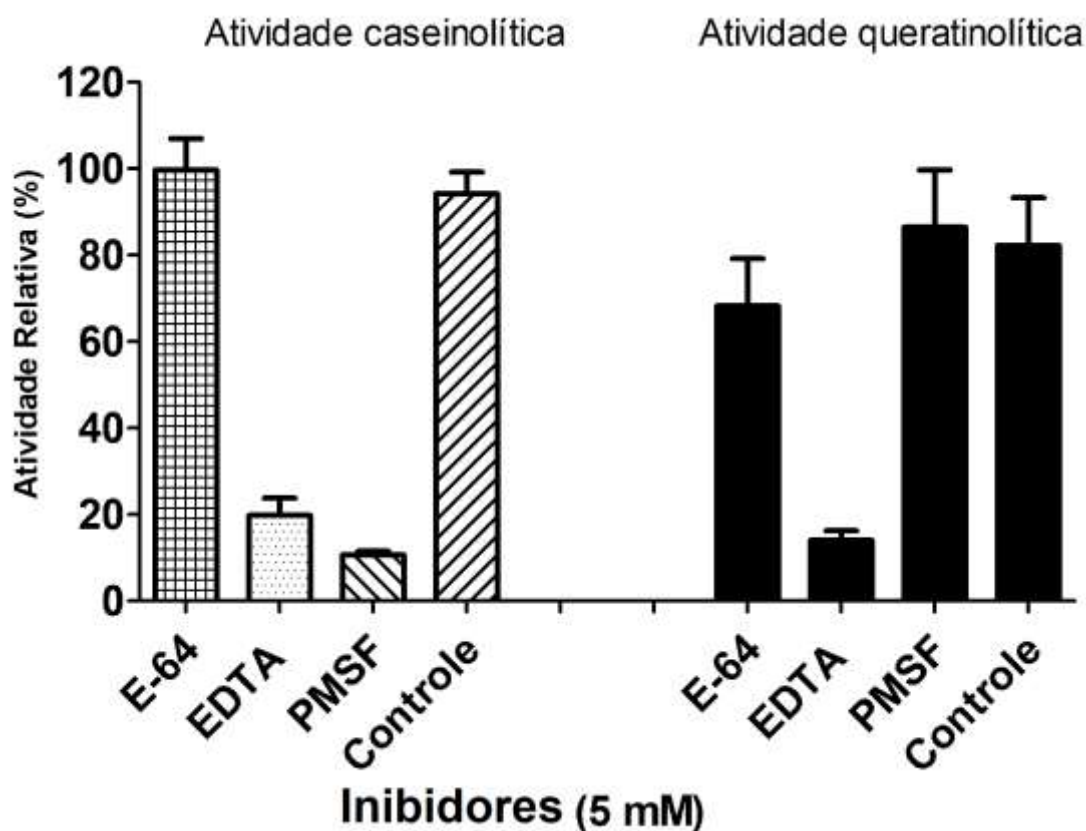
Sob olhar da biotecnologia, peptidases com atividades em faixa de pH alcalino favorece estudos de aplicação em composição de detergente. Devido a atividade e estabilidade em pH alcalino, aliado ao amplo espectro de ação sob diferentes proteínas,

em recentes anos, tem sido observado um aumento na procura por enzimas queratinolíticas para aplicação na indústria de detergentes (ZHANG et al., 2016b).

5.1.1.3 Efeito de inibidores na atividade caseinolítica e queratinolítica

Testes de inibição da proteólise indicaram que o extrato fermentativo apresenta duas classes de peptidases (Figura 8). No ensaio caseinolítico, a atividade enzimática foi inibida por PMSF (90% de inibição) e EDTA (80% de inibição), enquanto que no ensaio com queratina azure, a queratinólise foi inibida com mais destaque por EDTA (inibição de 85%). Isso indica a presença de serino e metalo peptidase no extrato fermentativo, sendo a queratinólise dependente de uma metalo enzima.

Figura 8. Efeito dos inibidores E-64, EDTA e PMSF (5 mM) na atividade caseinolítica e queratinolítica do extrato enzimático. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

Sob efeito de inibidores, encontramos que a degradação de queratina é dependente de metalo enzimas, e possivelmente algumas serino peptidases estão envolvidas no processo de hidrólise auxiliar de fragmentos derivados da degradação parcial de queratina. Lange et al. (2016) tem demonstrado que a degradação de queratina depende de um arsenal de enzimas proteolíticas, onde endo e exo peptidases são importantes para a completa degradação deste substrato. Além disso, em geral, a queratinólise depende de um processo de sulfitólise que pode ser desempenhado por dissulfeto redutase, ou outros agentes redutores, desta forma o EDTA pode também ser um agente que comprometa esta reação, e conseqüentemente, inibir a degradação de queratina.

5.2 CAPÍTULO II

Produção e caracterização bioquímica funcional de queratinases secretadas por *Corioloropsis byrsina*

Resumo

Como consequência ao aumento populacional no mundo, tem sido observado um correspondente aumento da demanda por alimentos, e por esta razão, acúmulo de resíduos agropecuários, como penas de frango derivadas da indústria avícola. A queratina presente na pena é uma proteína recalcitrante que tem sido pouco aproveitada. Neste cenário, neste capítulo nós discutimos a capacidade do fungo *Corioloropsis byrsina* para degradar penas de frango. Nossos resultados indicaram a secreção de diferentes enzimas proteolíticas, cuja atividade caseinolítica atingiu picos a pH 7,0-9,0 e 60-70 °C, e a pH 10,5 e 55-60 °C; e máxima atividade queratinolítica a pH 7,0-7,5 e 40-55 °C, e pH 9,0 e 55 °C. Enzimas com melhor atividade caseinolítica na faixa de pH 8,5 demonstraram maior estabilidade a pH 5-6. Enzimas com melhor atividade caseinolítica a pH 10,5 exibiram melhor estabilidade na faixa de pH 6-10. Para atividade queratinolítica, enzimas com melhor atividade a pH 7,5 demonstraram maior estabilidade quando incubadas a pH 10-11, enquanto enzimas com máxima atividade a pH 9,0 exibiram estabilidade em ampla faixa de pH (5-11). Atividade queratinolítica manteve cerca de 63% de atividade residual em 1 h a 50 °C. A atividade caseinolítica a pH 10,5 mantém-se estável até 1 h a 50 °C, em contraste a atividade a pH 8,5, cuja atividade residual foi 50%. A atividade caseinolítica foi inibida somente por PMSF, enquanto a atividade queratinolítica foi reduzida por PMSF e EDTA. Conforme a atividade e estabilidade em pH alcalino, estas enzimas aparecem como atrativos candidatos para uso em indústria de detergente. Adicionalmente, a atividade colagenolítica capacita esta enzima para segmentos industriais que usam enzimas colagenolíticas, por exemplo, para produção de hidrolisados de colágeno a partir de fontes animais como frango e boi.

Palavras chaves: Detergente, enzima, queratina, peptidase, protease, sustentabilidade

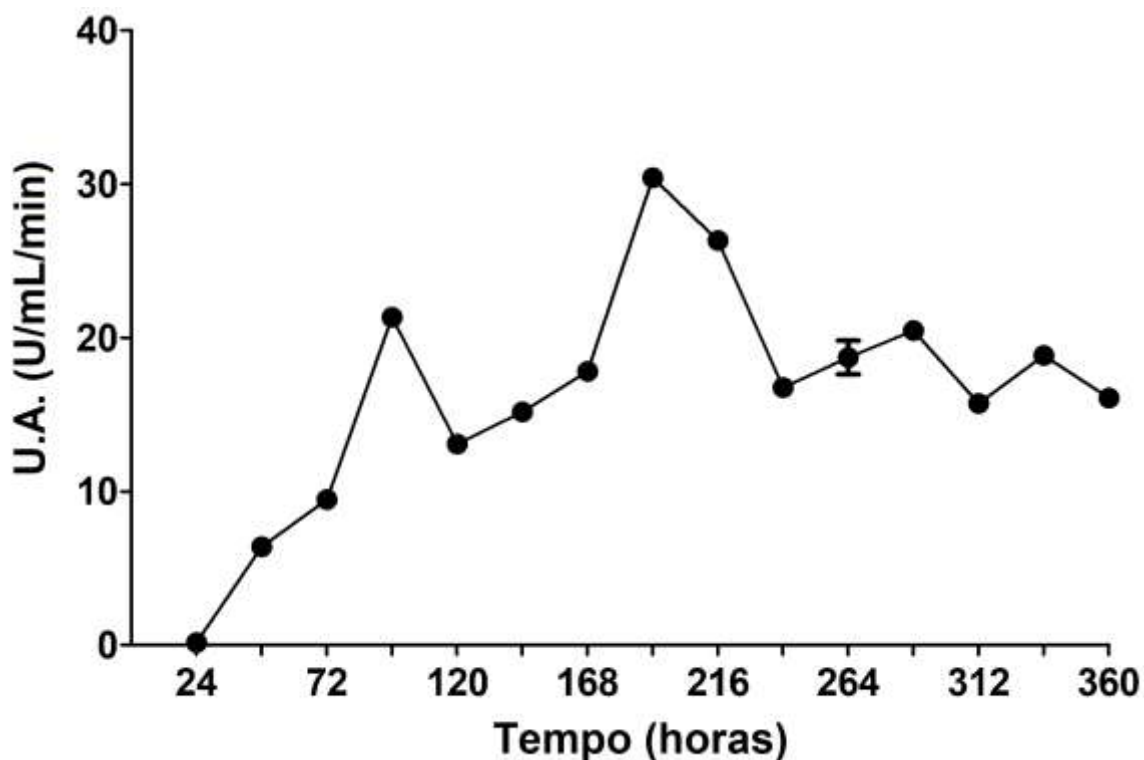
5.2.1 Resultados e Discussão

5.2.1.1 Cultivo em meio submerso e produção de enzimas proteolíticas

Em meio submerso, o fungo *C. byrsina* exibiu melhor produção de enzimas proteolíticas, quantificadas por ensaio caseinolítico, no tempo de 192 horas (8 dias). A figura 9 mostra o perfil de produção de enzimas proteolíticas em cultivo submerso com coletas a cada 24 horas. Como pode ser observado, aproximadamente 30 U.A. foram detectadas em 192 horas de cultivo.

Em vista disso, o extrato submerso coletado neste tempo de cultivo foi utilizado para prosseguimento dos experimentos de caracterização bioquímica funcional das enzimas.

Figura 9. Cultivo submerso do fungo *C. byrsina* em meio contendo 0,5% de pena de frango. Amostras foram coletadas a cada 24 horas de cultivo e analisadas quanto a presença de enzimas proteolíticas. As reações enzimáticas foram realizadas utilizando 1% de caseína em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8 a 40 °C.

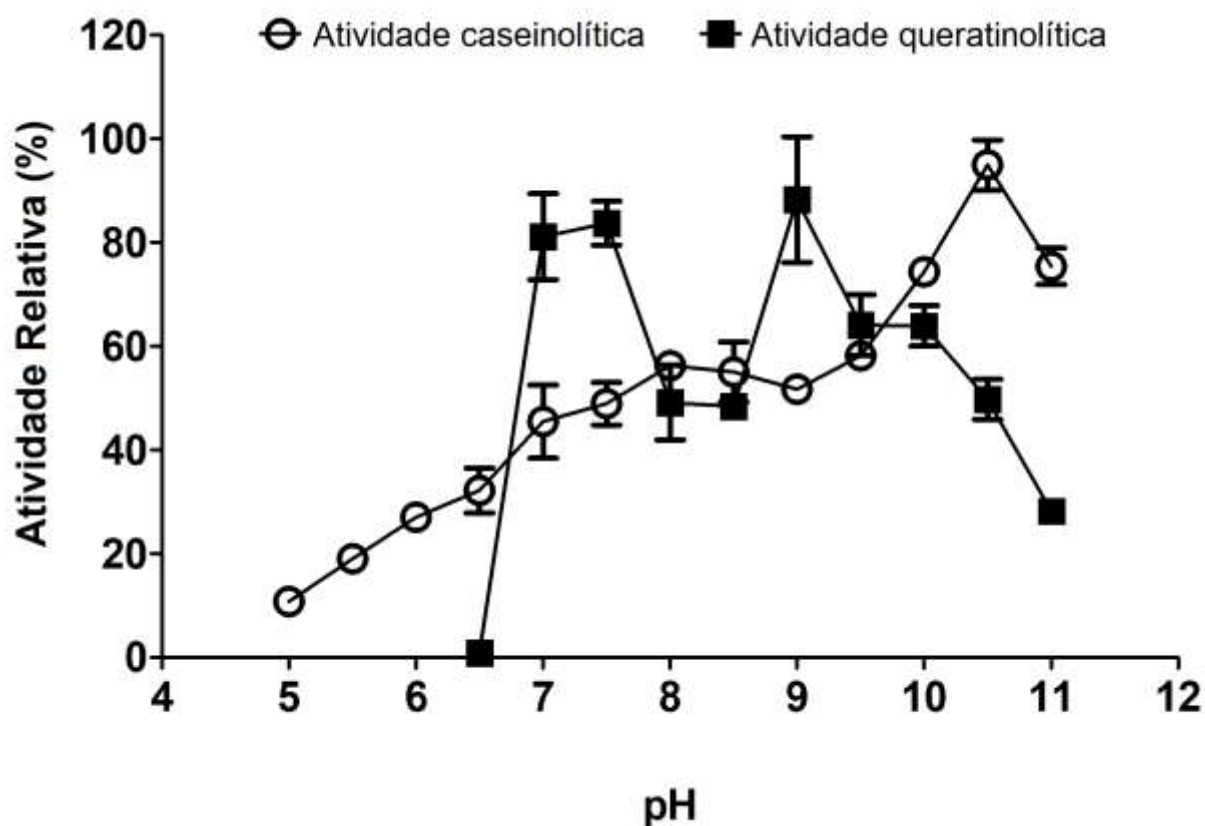


Fonte: Autoria própria

5.2.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases

Sob a influência de pH na atividade enzimática, a figura 10 mostra duas faixas distintas de elevação da atividade caseínolítica, a pH 7,0-9,0 ($p=0,1$) e a pH 10,5; e máxima atividade queratinolítica a pH 7,0-7,5 ($p=0,6$) e pH 9,0. Observa-se que em condições ácidas a atividade enzimática é reduzida, não tendo sido notada degradação de queratina abaixo de pH 7,0. Também nota-se que a atividade caseínolítica foi mais tolerante a pH elevado, ainda sendo possível detectar uma alta performance catalítica a pH 11 (~75%).

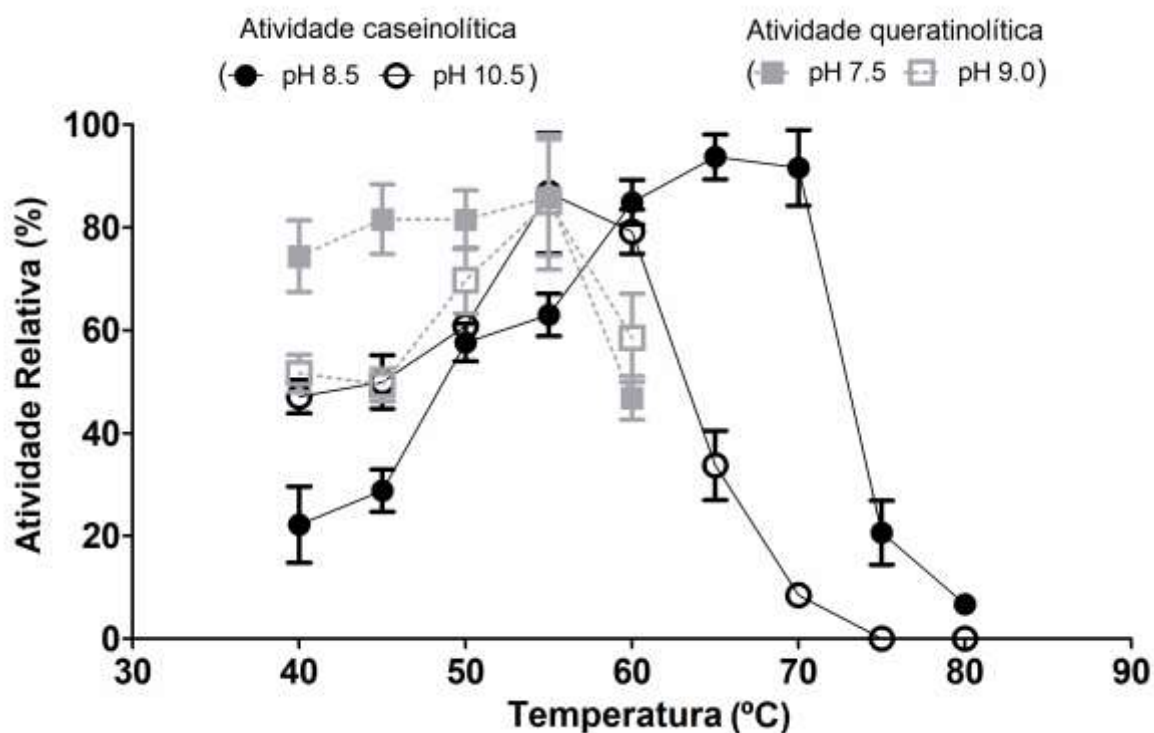
Figura 10. Efeito de pH na atividade caseínolítica e queratinolítica. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos a 40 °C.



Fonte: Autoria própria

Desta forma, o efeito de temperatura na atividade caseinolítica e queratinolítica foi estudado nos diferentes pH de melhor atividade (Figura 11). A atividade caseinolítica, quando analisada a pH 8,5 e 10,5, alcançou maior valor a temperaturas de 60-70 °C ($p=0,2$) e 55-60 °C ($p=0,3$), respectivamente. A atividade queratinolítica quando analisada a pH 7,5 e 9,0, alcançou maiores valores nas temperaturas de 40-55 °C ($p=0,2$) e 55 °C, respectivamente.

Figura 11. Efeito de temperatura na atividade caseinolítica e queratinolítica. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos em pH ótimo de reação pré-determinados.

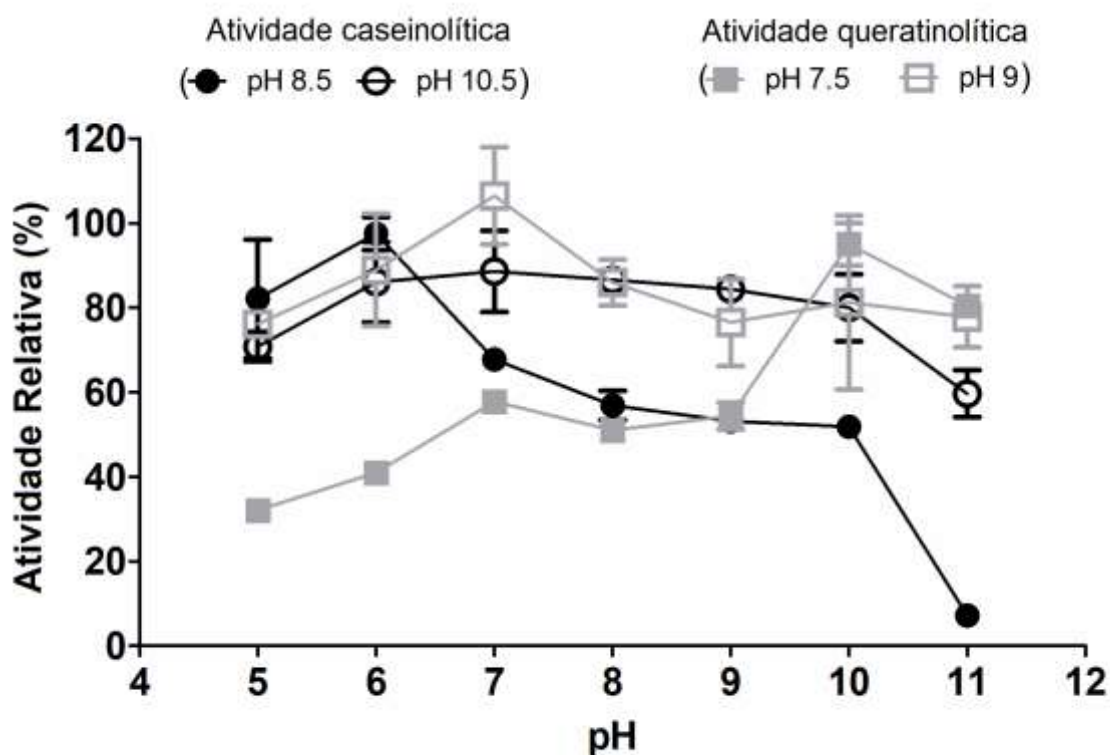


Fonte: Autoria própria

Conforme mostrado na figura 12, enzimas com melhor atividade caseinolítica na faixa de pH 8,5 demonstraram maior estabilidade a pH 5-6. Enzimas com melhor atividade caseinolítica a pH 10,5 exibiram melhor estabilidade na faixa de pH 6-10. Para atividade queratinolítica, enzimas com melhor atividade a pH 7,5 demonstraram

maior estabilidade quando incubadas a pH 10-11, enquanto enzimas com máxima atividade a pH 9,0 exibiram estabilidade em ampla faixa de pH (5-11). Estes grupos de enzimas, nestas faixas de pH citadas, mantiveram uma atividade residual mínima em torno de 80% após incubação por 48 h a 4 °C.

Figura 12. Efeito de pH na estabilidade das enzimas. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.

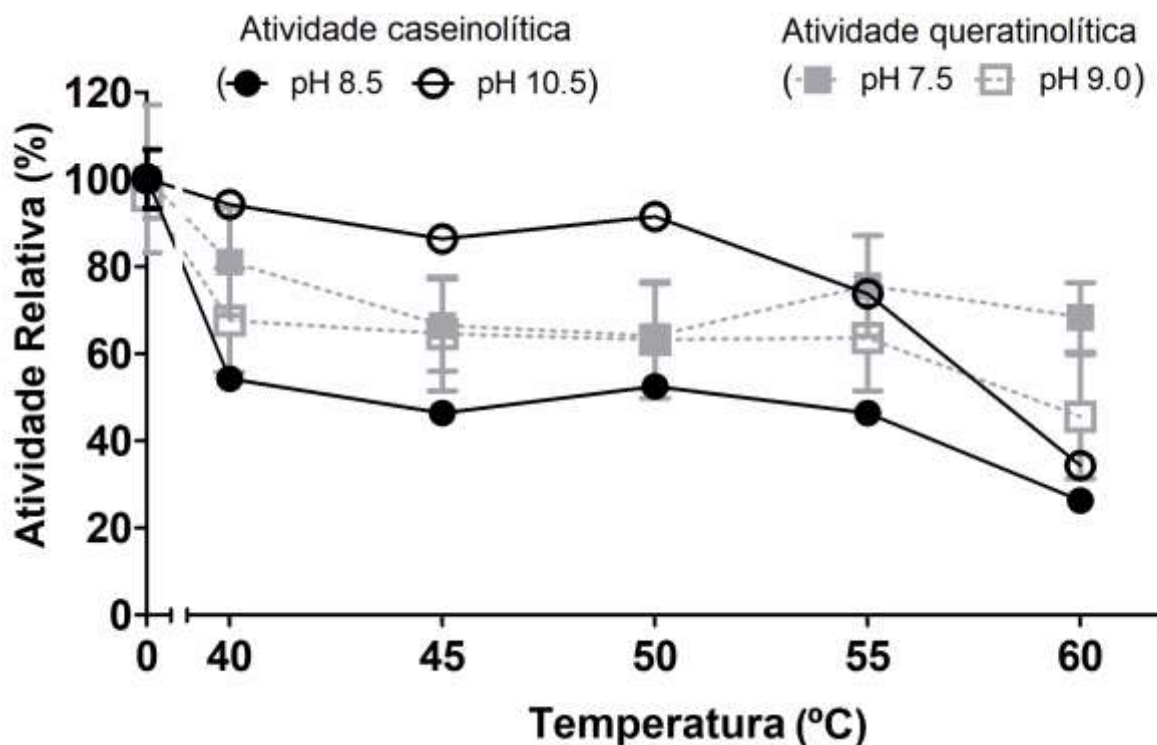


Fonte: Autoria própria

Em avaliação da termoestabilidade (Figura 13), é possível observar que as enzimas capazes de degradar a queratina exibiram estabilidade similar, mantendo em torno de 63% de atividade residual após incubação por 1 h a 50 °C. Para ensaio caseinolítico, é notório a maior estabilidade térmica das enzimas com atividade a pH 10,5, cuja atividade inicial se manteve inalterada em incubação por 1 h a temperaturas

até 50 °C, em comparação a atividade residual de aproximadamente 50% para enzimas com atividade ótima a pH 8,5.

Figura 13. Efeito de temperatura na estabilidade das enzimas. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

Em análise de estabilidade a pH, em geral, as enzimas cuja melhor atividade ocorreu em pH mais alcalino (atividade queratinolítica a pH 9 e caseinolítica a pH 10,5) exibiram uma maior faixa de estabilidade. Estes grupos de enzimas alcalinas tem atraído a atenção para aplicação na formulação de detergente, sendo fundamentais para remoção de manchas de natureza proteica. Para as enzimas estudadas aqui, esta é uma possibilidade para testes de aplicação.

Presentes neste extrato enzimático, as enzimas com atividade proteolítica a pH 10,5 se destacam com potencial uso como aditivos na formulação de detergente, sendo ativa e estável em pH similar ao do detergente comercial (pH 10), além de apresentar a melhor estabilidade térmica até 50 °C, e considerável atividade na faixa de 40-55 °C, permitindo testes de performance de lavagens em diferentes temperaturas.

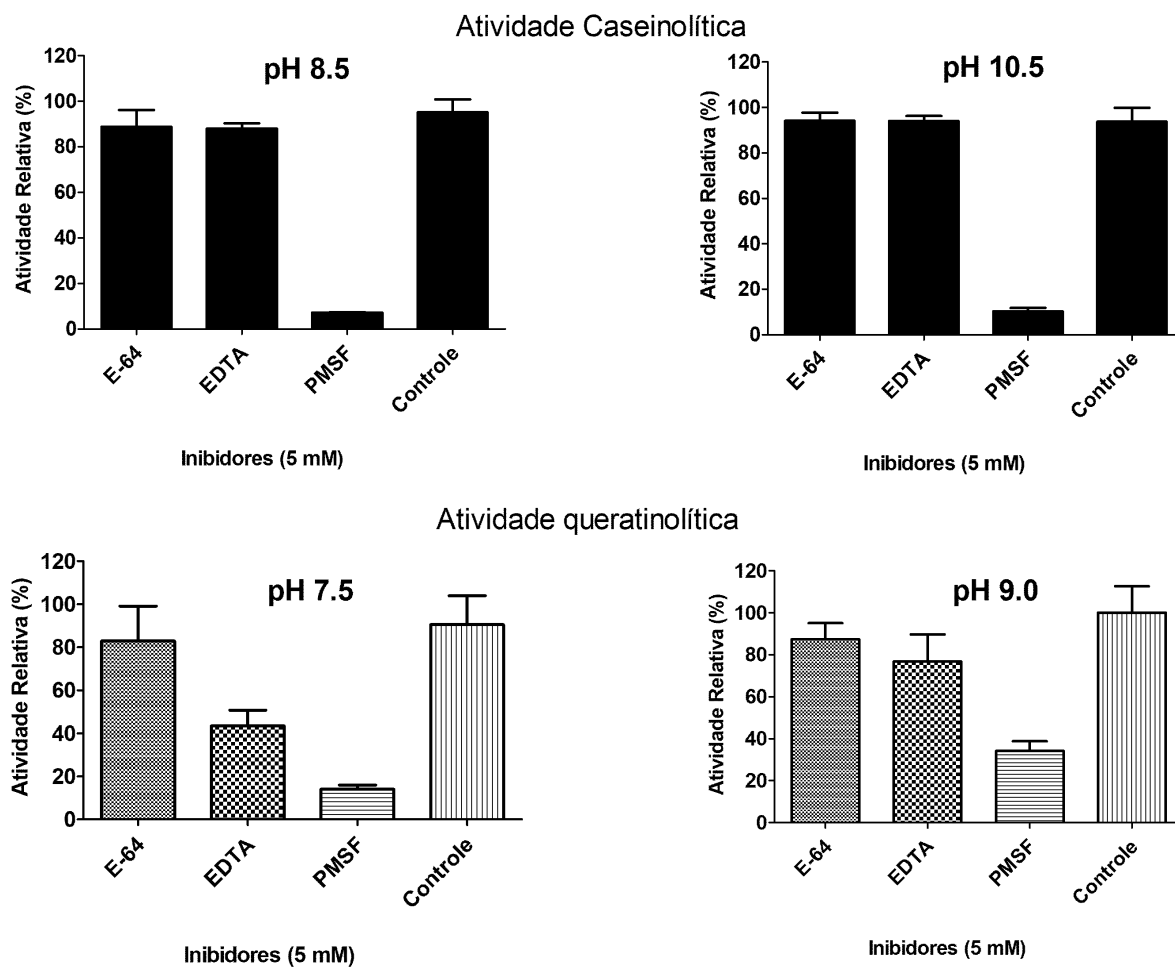
Enzimas alcalinas têm sido, ao longo dos anos, muito exploradas para fins de aplicação em indústria de detergentes. Preparações contendo peptidases são aplicáveis em diferentes categorias de detergentes, como limpeza de roupa e louça (NAGANTHRAN et al., 2017; RAZZAQ et al., 2019).

5.2.1.3 Efeito de inibidores na atividade das peptidases

Quando incubado com inibidores, a atividade caseinolítica em ambos os pH foi inibida somente por PMSF (~90% de inibição), enquanto a atividade queratinolítica foi reduzida por PMSF e EDTA, especialmente para reação a pH 7,5, onde EDTA inibiu 55% e PMSF inibiu 85% da atividade (Figura 14).

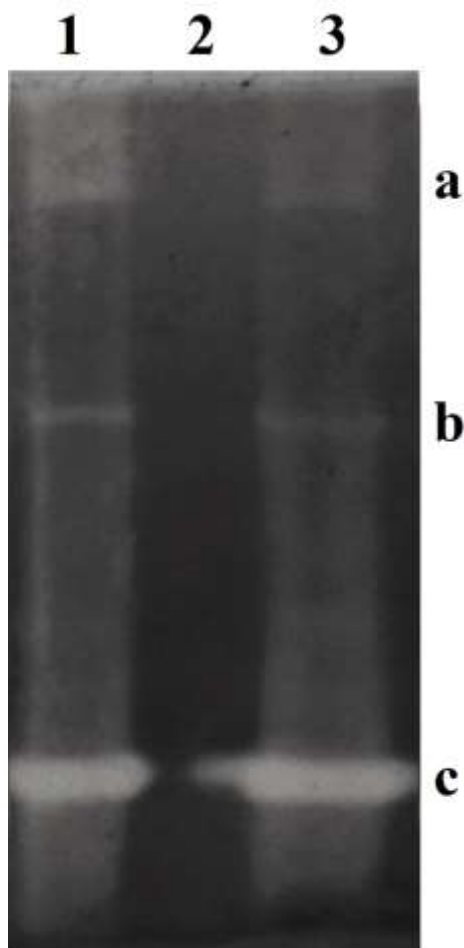
No zimograma (Figura 15), sob influência de inibidores, observamos que a amostra controle (linha 1) e contendo EDTA (linha 3) são similares, apresentando 3 evidentes bandas de proteólise (*a*, *b* e *c*) enquanto a amostra contendo PMSF não exibiu bandas de atividade proteolítica (linha 2).

Figura 14. Efeito dos inibidores E-64, EDTA e PMSF (5 mM) na atividade caseinolítica e queratinolítica do extrato enzimático. As reações foram realizadas utilizando 1% de caseína e 0,5% de queratina azure como substratos, em pH e temperatura ótimo de reação pré-determinados.



Fonte: Autoria própria

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida (zimograma): 1 (controle, amostra sem inibidor), 2 (amostra + 5 mM PMSF) e 3 (amostra + 5 mM EDTA), a, b, c são bandas de hidrólise proteolítica. Gel 8% contendo 0,2% de gelatina (Oxoid/England).



Fonte: Aatoria própria

Nós observamos que o extrato enzimático derivado do cultivo de *C. byrsina* em meio submerso contendo pena de frango apresentou diferentes enzimas que contribuíram para a degradação de queratina. Devido a seu arranjo molecular com alta incidência de pontes dissulfeto, a queratina é uma proteína de difícil degradação por peptidases convencionais (GUPTA et al., 2012). Lange et al. (2016) mostrou que a degradação de queratina é um processo cooperativo entre proteólise, que depende de endo e exopeptidases, e sulfitólise, que depende de agente redutores ou enzimas, como

dissulfeto redutase, cujo capacita a acessibilidade de peptidases para hidrólise completa de queratina.

Por ensaio de inibidores, notamos que a atividade queratinolítica foi reduzida na presença de PMSF e agente quelante EDTA em pH 7,5. É importante ressaltar que na degradação de queratina, o EDTA pode ter agido comprometendo sulfitólise e/ou proteólise. Neste caso, como observado na degradação de caseína (ensaio caseinolítico) ou de colágeno (gelatina no gel de eletroforese - zimograma), o EDTA não é limitante para a ação das peptidases nestes substratos, entretanto, ele é um inibidor limitante para a degradação da queratina. Isso pode ter ocorrido por este inibidor quelar íons metálicos importantes para a ação de algumas queratinases, ou por sua ação no processo de sulfitólise a pH 7,5. Algumas metodologias têm mostrado que EDTA pode ser utilizado para interromper reação de sulfitólise (KELLA et al., 1988; GONZALEZ & DAMODARAN, 1990; WINTHER & THORPE, 2014).

O zimograma (Figura 15) permite-nos comprovar a presença de serino peptidases no extrato enzimático e também evidencia a atividade colagenolítica destas enzimas. Este resultado comprova o potencial para uso deste extrato na degradação de material contendo colágeno, por exemplo para recuperação de prata imobilizada em filmes de raio-X, e para produção de hidrolisado de colágeno a partir de resíduos derivados da indústria de carne (SILVA, 2018b).

6. CONCLUSÃO

A difícil degradação de queratina tem atraído atenção para microrganismos capazes de produzir queratinases. Por meio dos resultados expostos aqui, foi possível confirmar o potencial de *C. diversus* e *C. byrsina* para decomposição de penas de frango, sendo mais uma alternativa atrativa para aproveitamento deste resíduo derivado da avicultura.

Em meio submerso, em 36 horas de cultivo, encontramos que a a bactéria *C. diversus* foi capaz de degradar aproximadamente 80% da pena de frango e secretar enzimas com atividade queratinolítica e caseinolítica, das quais foram sensíveis aos inibidores PMSF e EDTA (atividade caseinolítica) e EDTA (atividade queratinolítica). O fungo *C. byrsina* secretou peptidases alcalinas que exibiram atividade caseinolítica e colagenolítica sensíveis a PMSF (serino peptidases), e queratinolítica sensíveis a PMSF e EDTA.

Com a tendência mundial por adotar tecnologias sustentáveis, a hidrólise enzimática de queratina por estes microrganismos abre oportunidade futura para testes no uso do hidrolisado proteico como biofertilizante, uso de enzimas em detergente e degradação de colágeno.

REFERÊNCIAS

ANBU, P.; HILDA, A.; SUR, H-W.; HUR, B-K.; JAYANTHI, S. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p. 287–292, 2008.

BARMAN, N. C.; ZOHORA, F. T.; DAS, K. C.; MOWLA, M. G.; BANU, N. A.; SALIMULLAH, M.; HASHEM, A. Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples. **AMB Express**, v. 7, p. 181, 2017.

BOHACZ, J. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33: 13, 2017.

BOUACEM, K.; BOUANANE-DARENFED, A.; ZARAÏ JAOUADI, N.; JOSEPH, M.; HACENE, H.; OLLIVIER, B.; FARDEAU, M. L.; BEJAR, S.; JAOUADI, B. Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 321-328, 2016.

CĂLIN, M.; CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D.; ALEXANDRESCU, E.; RĂUT, I.; DONI, M. B.; ARSENE, M-L.; OANCEA, F.; JECU, L.; LAZĂR, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 101–112, 2017.

CHEN, C-Y.; ROJANATAVORN, K.; CLARK, A. C.; SHIH, J. C. Characterization and enzymatic degradation of Sup35^{NM}, a yeast prion-like protein. **Protein Science**, v. 14, p. 2228–2235, 2005.

COLLA, G.; HOAGLAND, L.; RUZZI, M.; CARDARELLI, M.; BONINI, P.; CANAGUIER, R.; ROUPHAEL, Y. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 8:2202, 2017.

DONG, Y-Z.; CHANG, W-S.; CHEN, P. T. Characterization and overexpression of a novel keratinase from *Bacillus polyfermenticus* B4 in recombinant *Bacillus subtilis*. **Bioresources and Bioprocessing**. v. 4, 47, 2017.

EL-GENDY, M. M. Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp. Morsyl under solid-state fermentation using rice straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 780-794, 2010.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617–626, 2010.

FANG, Z.; ZHANG, J.; DU, G.; CHEN, J. Improved catalytic efficiency, thermophilicity, anti-salt and detergent tolerance of keratinase KerSMD by partially truncation of PPC domain. **Scientific Reports**. v. 6, p. 1-11, 2016. Doi. 10.1038/srep27953.

FELLAHI, S.; CHIBANI, A.; FEUK-LAGERSTEDT, E.; TAHERZADEH, M. J. Identification of two new keratinolytic proteases from a *Bacillus pumilus* strain using protein analysis and gene sequencing. **AMB Express**, v. 6, p. 42-50, 2016.

GEGECKAS, A.; GUDIUKAITĖ, R.; CITAVICIUS, D. Keratinolytic proteinase from *Bacillus thuringiensis* AD-12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 46-51, 2014.

GONZALEZ, J. M.; DAMODARAN, S. Sulfitolysis of Disulfide Bonds in Proteins Using a Solid-State Copper Carbonate Catalyst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 149-153, 1990.

GUPTA, R.; SHARMA, R.; BEG, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 216-228, 2012.

GUPTA, S.; SINGH, R. Hydrolyzing Proficiency of Keratinases in Feather Degradation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 466–470, 2014.

GURAV, R. G.; TANG, J.; JADHAV, J. P. Sulfitolytic and keratinolytic potential of *Chryseobacterium* sp. RBT revealed hydrolysis of melanin containing feathers. **3 Biotech**, v. 6, 145, 2016.

HABBECHÉ, A.; SAOUDI, B.; JAOUADI, B.; HABERRA, S.; KEROUAZ, B.; BOUDELAA, M.; BADIS, A.; LADJAMA, A. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, p. 413-421, 2014.

HU, H.; HE, J.; YU, B.; ZHENG, P.; HUANG, Z.; MAO, X.; YU, J.; HAN, G.; CHEN, D. Expression of a keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 239-244, 2013.

JIN, H-S.; PARK, S. Y.; KIM, K.; LEE, Y-J.; NAM, G-W.; KANG, N. J.; LEE, D-W. Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates. **Plos One**, 2017.

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

KELLA, N. K. D.; KANG, Y. J.; KINSELLA, J. E. Effect of Oxidative Sulfitolysis of Disulfide Bonds of Bovine Serum Albumin on Its Structural Properties: A Physicochemical Study. **Journal of Protein Chemistry**, v. 7, p. 535-548, 1988.

KOCABIYIK, S.; OZDEMIR, I. Purification and characterization of an intracellular chymotrypsin-like serine protease from *Thermoplasma volcanium*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 126–134, 2006.

ŁABA, W.; ŻAROWSKA, B.; CHORAŻYK, D.; PUDŁO, A.; PIEGZA, M.; KANCELISTA, A.; KOPEĆ, W. New keratinolytic bacteria in valorization of chicken feather waste. **AMB Express**, v. 8, 9, 2018.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P. K. Microbial decomposition of keratin in nature— a new hypothesis of industrial relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2083–2096, 2016.

LEE, H.; SUH, D. B.; HWANG, J. H.; SUH, H. J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 97, p. 123–133, 2002.

LIN, X.; TANG, J.; KOELSCH, G.; MONOD, M.; FOUNDLING, S. Recombinant Canditropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 20143–20147, 1993.

LV, L-X.; SIM, M-H.; LI, Y-D.; MIN, J.; FENG, W-H.; GUAN, W-J.; LI, Y-Q. Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1236–1244, 2010.

MARTINEZ, J. P. O.; CAI, G.; NACHTSCHATT, M.; NAVONE, L.; ZHANG, Z.; ROBINS, K.; SPEIGHT, R. Challenges and Opportunities in Identifying and Characterising Keratinases for Value-Added Peptide Production. **Catalysts**, v. 10, 184, 2020.

MAZOTTO, A. M.; COURI, S.; DAMASO, M. C. T.; VERMELHO, A. B. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.

MITSUIKI, S.; HUI, Z.; MATSUMOTO, D.; SAKAI, M.; MORIYAMA, Y.; FURUKAWA, K.; KANOUCHI, H.; OKA, T. Degradation of PrP^{Sc} by Keratinolytic Protease from *Nocardiosis* sp. TOA-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, p. 1246–1248, 2006.

MOHAMAD, N.; PHANG, L-Y.; ABD-AZIZ, S. Optimization of metallo-keratinase production by *Pseudomonas* sp. LM19 as a potential enzyme for feather waste conversion. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, p. 41-50, 2017.

NAGANTHRAN, A.; MASOMIAN, M.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; ALI, M. S. M.; NOOH, H. M. Improving the Efficiency of New Automatic Dishwashing Detergent

Formulation by Addition of Thermostable Lipase, Protease and Amylase. **Molecules**, v. 22, 1577, 2017.

NAVONE, L.; SPEIGHT, R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. **Plos One**, v. 13(8): e0202608, 2018.

NEGI, M.; TSUBOI, R.; MATSUI, T.; OGAWA, H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 83, p. 32–36, 1984.

OKOROMA, E. A.; PURCHASE, D.; GARELICK, H.; MORRIS, R.; NEALE, M. H.; WINDL, O.; ABIOLA, O. O. Enzymatic Formulation Capable of Degrading Scrapie Prion under Mild Digestion Conditions. **Plos One**, v. 8, e68099, 2013.

PATINVOH, R. J.; FEUK-LAGERSTEDT, E.; LUNDIN, M.; SÁRVÁRI HORVÁTH, I.; TAHERZADEH, M. J. Biological Pretreatment of Chicken Feather and Biogas Production from Total Broth. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 1401-1415, 2016.

PAUL, T.; DAS, A.; MANDAL, A.; HALDER, S. K.; JANA, A.; MAITY, C.; DASMOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with detergent: towards industrial viewpoint. **Journal of Cleaner Production**, v. 66, p. 672-684, 2014.

PAUL, T.; JANA, A.; MANDAL, A. K.; MANDAL, A.; DAS MOHPATRA, P. K.; MONDAL, K. C. Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 3, p. 8-22, 2016.

PILLAI, P.; MANDGE, S.; ARCHANA, G. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1110-1117, 2011.

POOPATH, S.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; MANI, C.; LAKSHMI, P. V.; RAGUL, K. Purification and characterization of keratinase from feather degrading bacterium useful for mosquito control – A new report. **Tropical Biomedicine**, v. 31, p. 97–109, 2014.

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

RADHA, S., GUNASEKARAN, P. Purification and characterization of keratinase from recombinant *Pichia* and *Bacillus* strains. **Protein Expression and Purification**, v. 64, p. 24-31, 2009.

RAI, S. K.; KONWARH, R.; MUKHERJEE, A. K. Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline β -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 218–225, 2009.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 110, 2019.

SANGHVI, G.; PATEL, H.; VAISHNAV, D.; OZA, T.; DAVE, G.; KUNJADIA, P.; SHETH, N. A alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in

cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 256-262, 2016.

SANTI, C.; ZAMBONI, A.; VARANINI, Z.; PANDOLFINI, T. Growth stimulatory effects and genome-wide transcriptional changes produced by protein hydrolysates in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 8:433, 2017.

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University, 1996, p. 25-55.

SILVA, R. R. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, v. 1–19, 2017.

SILVA, R. R. Comment on mRNA-Sequencing analysis reveals transcriptional changes in root of maize seedlings treated with two increasing concentrations of a new biostimulant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 2061–2062, 2018a.

SILVA, R. R. Enzymatic Synthesis of Protein Hydrolysates From Animal Proteins: Exploring Microbial Peptidases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 735, 2018b.

SILVA, R. R. Keratinases as an Alternative Method Designed To Solve Keratin Disposal on the Environment: Its Relevance on Agricultural and Environmental Chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 7219-7221, 2018c.

SILVA, R. R. Different Processes for Keratin Degradation: The Ways for Biotechnological Application of Keratinases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 9377-9378, 2018d.

STAROŃ, P.; BANACH, M.; KOWALSKI, Z. Keratin – origins, properties, application. **Chemik**, v. 65, 10, p. 1019-1026, 2011.

SUNTORNSUK, W.; SUNTORNSUK L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 239-234, 2003.

TAMREIHAO, K.; MUKHERJEE, S.; KHUNJAMAYUM, R.; DEVI, L. J.; ASEM, R. S.; NINGTHOUJAM, D. S. Feather degradation by keratinolytic bacteria and biofertilizing potential for sustainable agricultural production. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, p. 4–13, 2019.

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

TORK, S. E.; SHAHEIN, Y. E.; EL-HAKIM, A. E.; ABDEL-ATY, A. M.; ALY, M. M. Purification and partial characterization of serine-metallokeratinase from a newly isolated *Bacillus pumilus* NRC21. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 189-196, 2016.

VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, M. S.; KUMAR, S.; ANSARI, M. W.; AGRAWAL, S. Production of Thermostable Organic Solvent Tolerant Keratinolytic Protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: IAA Production and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Microbiology**, v. 7:1189, 2016.

VERMA, A.; SINGH, H.; ANWAR, S.; CHATTOPADHYAY, A.; TIWARI, K. K.; KAUR, S.; DHILON, G. S. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, 476–491, 2017.

WANG, B.; YANG, W.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, p. 229–318, 2016.

WINTHER, J. R.; THORPE, C. Quantification of Thiols and Disulfides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 38-46, 2014.

WU, W-L.; CHEN, W-L.; TU, I-F.; LIN, Y-C.; ESWARKUMAR, N.; CHEN, M-Y.; HO, M-C.; WU, S-H. The discovery of novel heat-stable keratinases from *Meiothermus taiwanensis* WR-220 and other extremophiles. **Scientific Reports**, v. 7, 4658, 2017.

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

YOSHIOKA, M.; MIWA, T.; HORII, H.; TAKATA, M.; YOKOYAMA, T.; NISHIZAWA, K.; WATANABE, M.; SHINAGAWA, M.; MURAYAMA, Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, 509–515, 2007.

YUSUF, I.; AHMAD, A. S.; PHANG, L. Y.; SYED, M. A.; SHAMAAN, N. A.; ABDUL KHALIL, K.; DAHALAN, F. A.; SHUKOR, M. Y. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-*Alcaligenes* sp. AQ05-001. **Journal of Environmental Economics and Management**, v. 183, p. 182-195, 2016.

ZHANG, R. X.; GONG, J. S.; ZHANG, D. D.; SU, C.; HOU, Y. S.; LI, H.; SHI, J. S.; XU, Z. H. A metallo-keratinase from a newly isolated *Acinetobacter* sp. R-1 with low collagenase activity and its biotechnological application potential in leather industry. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 193-204, 2016a.

ZHANG, R. X.; GONG, J. S.; SU, C.; ZHANG, D. D.; TIAN, H.; DOU, W. F.; LI, H.; SHI, J. S.; XU, Z. H. Biochemical characterization of a novel surfactant-stable serine keratinase with no collagenase activity from *Brevibacillus parabrevis* CGMCC 10798. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 843-851, 2016c.

ZHANG, R. X.; GONG, J-S.; DOU, W-F.; ZHANG, D-D.; ZHANG, Y-X.; LI, H.; LU, Z-M.; SHI, J-S.; XU, Z-H. Production and characterization of surfactant-stable fungal keratinase from *Gibberella intermedia* CA3-1 with application potential in detergent industry. **Chemical Papers**, v. 70, p. 1460–1470, 2016b.