
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PAULA NATÁLIA SANTA ROSA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
QUERATINASE PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. LM-21
ISOLADO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE ABATEDOURO DE
FRANGOS.**

PAULA NATÁLIA SANTA ROSA

ESTUDO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUERATINASE
PRODUZIDA POR *Bacillus* sp. LM-21 ISOLADO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS
DE ABATEDOURO DE FRANGOS.

Orientador: JONAS CONTIERO.

Co-orientadora: MARIANA CORTEZI.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2013

547.758 Santa Rosa, Paula Natália
S233p Estudo da produção e caracterização de queratinase produzida por
Bacillus sp. LM-21 isolado de águas residuárias de abatedouro de frangos.
/ Santa Rosa, Paula Natália. - Rio Claro, 2013
94 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Mariana Cortezi

1. Enzimas. 2. Biodegradação. 3. Penas. 4. Avicultura. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família.

Meus pais, João e Cidinha, e irmãos, Leandro e Mariana.

À Dayana, Marcelo, Manú, Mario, Delma e Walison.

Agradeço por estarem ao meu lado durante cada momento, seja de dificuldade ou conquista. E, em especial, agradeço ao meu esposo William, companheiro e amigo, por ser a minha inspiração de vida.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da Vida, por me guiar durante minhas escolhas e estar comigo em todos os momentos. Agradeço a Nossa Senhora, por sua intercessão e proteção de mãe.

Ao meu esposo, William, eu quero dizer que sem você nenhuma das minhas conquistas seria possível. É você quem me inspira para o sucesso, seu sorriso todos os dias enobrece a minha alma e me faz a pessoa mais realizada do mundo. Eu te amo muito.

Sou imensamente grata á minha mãe, Cidinha, e meu pai, João, sem os quais eu não teria recebido esta educação. Obrigada por vocês serem o meu porto seguro, por me acolherem e me darem as mãos, me encorajarem e me fortalecerem. Agradeço ainda aos meus irmãos, Leandro e Mariana, e meus cunhados, Dayana e Marcelo, por me ajudarem a passar pelos obstáculos repentinos, por me fazerem rir, por tornarem minha vida mais feliz. E a minha pequenininha, Manuela, eu agradeço a graça de ser sua segunda mãe, de estar com você e ter a chance de dividir seus sonhos. Uma casa precisa de quatro paredes para existir e as minhas quatro paredes são, sem duvida, meus pais e meus irmãos.

À minha sogra Delma, meu sogro Mario e meu cunhado Walison eu agradeço por me receberem em sua casa como parte da família e cuidarem de mim com tanto carinho.

À todos os meus familiares e amigos eu agradeço o apoio, a compreensão por tantas festas que deixei de participar devido aos estudos, tenham certeza que todo este esforço foi recompensado. Agradeço em especial, a tia Dri, o Robson e as crianças por me ajudarem a relaxar durante os momentos mais difíceis e estarem sempre prontos para conversar e brincar.

À Débora, Franciele e Aline, minhas amigas, eu agradeço toda a energia boa que me enviaram, mesmo com as nossas dificuldades de se encontrar.

Um agradecimento mais do que especial quero fazer as duas pessoas que me abriram as portas do mundo acadêmico, meu orientador Jonas Contiero e coorientadora, Mariana Cortezi. Agradeço a confiança, o trabalho em parceria realizado no LMI e por vocês terem compartilhado comigo seus conhecimentos. Obrigada pelo apoio, incentivo e a amizade. Sem vocês eu não teria realizado um trabalho tão construtivo para minha carreira profissional.

À todos os meus amigos do LMI, Laboratório de Microbiologia Industrial da UNESP – RC, Mary, Fran, Fabrício, Paulo, Kate, Natália, Roberta, Vinicius, Túlio, Luciana, Marcela e Paola, eu agradeço todos os dias de trabalho, por me auxiliarem nas dificuldades da pesquisa e me fazerem sorrir com as brincadeiras que tornavam o nosso ambiente um local tão agradável.

À doutora Ana Carolina Marchiori e o senhor Antonio Teruyoski Yabuki agradeço pela ajuda prestada durante o desenvolvimento de minhas atividades nesta pesquisa, vocês foram cruciais para os resultados acontecerem.

Agradeço ainda a toda a turma do CBN 2009, nossa passagem pela UNESP foi marcada pela amizade que mesmo nos momentos de discussão foi mais forte, obrigada por cada grupo de estudos que fizemos juntos e por todos procurarem sempre agir de forma a ajudar todo o grupo.

Fran, Bruna, Nati Marim, Renato, Socorro, Sibeli, Kethy e Jú, à vocês eu deixo um abraço especial pela imensa amizade, pelos momentos de alegria que eu jamais esquecerei, pelas piadas ruins e a divisão de salgadinhos e lanches na cantina, isto com certeza tornou a graduação melhor.

Aos amigos da cervejaria Baumgartner eu agradeço a confiança e o companheirismo. Obrigada Renato e Nirlei por vocês me auxiliarem durante a entrada no mercado de trabalho, por me orientarem nas dúvidas e dividirem comigo boas histórias.

À todas as pessoas queridas que me ajudaram, incentivaram e apoiaram no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

À FAPESP agradeço o apoio financeiro da pesquisa.

À todos vocês a minha imensa gratidão e os votos de sucesso.

Paula Santa Rosa.

RESUMO

O principal constituinte das penas é a queratina, composta por uma longa cadeia polipeptídica e insolúvel. As penas constituem o principal subproduto das indústrias de processamento de frangos e por serem ricas em aminoácidos, podem ser utilizadas como suplemento proteico em ração animal. Todavia, as penas não podem ser degradadas por proteases comuns, mas sim por enzimas denominadas queratinases. A crescente preocupação com o meio ambiente, aliada à bioconversão de resíduos queratinosos, estimulam o isolamento e estudo de micro-organismos produtores de enzimas queratinolíticas. O objetivo deste trabalho foi estudar a estirpe *Bacillus* sp. LM-21, analisando sua potencialidade em sintetizar enzimas queratinolíticas e degradar penas de frango. *Bacillus* sp. LM-21 foi isolado de águas residuárias de abatedouro de frangos e identificado por sequenciamento de DNA. Posteriormente, foi realizada a caracterização enzimática da queratinase obtida. As condições ótimas para produção de queratinase foram 35°C, 150 rpm e 1% de penas, com pH inicial de 7,4 e 2% (m/v) de inóculo, cuja atividade queratinolítica foi de 48,5 U/mL (72 horas de cultivo). Maior atividade proteolítica (346,24 µg/mL - 96 horas de cultivo) e maior porcentagem de degradação de penas (100%) também foram observadas nestas condições. Maior crescimento celular (13,40 UFC/mL - 96 horas de cultivo) e concentração de proteínas (7,448 mg/mL) foram obtidos nas condições de 35°C, 150 rpm e 3% de penas. Na caracterização da enzima bruta foram avaliadas a influência do pH (4,0 - 10,0), temperatura (30 - 70°C) e algumas substâncias, sendo elas: BaCl₂·2H₂O; CaCl₂; CuSO₄·5H₂O; FeCl₃·6H₂O; HgCl₂; MgCl₂·6H₂O; MnSO₄·H₂O (5 mM); Triton (0,1% - v/v), Tween (0,1% - v/v), Dimetilsulfóxido - DMSO (1% - v/v), Isopropanol (1% - v/v), ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (5 mM - m/v) e Mercaptoetanol (0,1% - v/v). Para valores de pH inferiores a 6,0 a enzima não apresentou atividade queratinolítica e o pH ótimo para ação da queratinase foi 9,0 (48,75 U/mL). Quanto à temperatura, a enzima mostrou-se mais ativa quando incubada entre 40 e 60°C, apresentando ótimo a 50°C (43,4 U/mL). Já quanto à influência de substâncias químicas sobre a enzima, observou-se que mercaptoetanol (0,1% - v/v) promoveu ativação da enzima (177,01%), enquanto que DMSO (1% - v/v), EDTA (5 mM - m/v), Isopropanol (1% - v/v), Triton (0,1% - v/v) e Tween (0,1% - v/v) exerceram inibição da mesma, com atividades queratinolíticas relativas iguais a 32,83%, 33,99%, 45,51%, 58,18%, 56,45%, respectivamente. Em adição, foi observado que a enzima sofreu inibição por todos os íons estudados: BaCl₂·2H₂O (37,93%); CaCl₂ (20,23%); CuSO₄·5H₂O (34,48%); FeCl₃·6H₂O (20,92%); MgCl₂·6H₂O (27,13%); MnSO₄·H₂O (0%) e HgCl₂ (84,14%) - (m/v). A queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 apresentou grande potencial em degradar penas de frango e estudos posteriores serão realizados.

Palavras chave: Queratinase. *Bacillus*. Biodegradação. Penas. Avicultura.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Azoqueratina comercial (Sigma).	38
Figura 2 - Sequência parcial DNA ribossomal 16S da amostra LM-21.	42
Figura 3 - Resultado obtido no NCBI (ZHENG et al., 2000) após inserção da sequencia de LM-21.	43
Figura 4 - Resultado obtido no <i>Ribosomal Database Project</i> (WANG et al., 2007) após inserção da sequencia de LM-21.	43
Figura 5 - Comparação entre colônias de <i>Bacillus subtilis</i> (Fujikawa e Matsushita, 1989) e <i>Bacillus</i> sp. LM-21.	44
Figura 6 - Crescimento celular de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em função das condições de cultivo estudadas.	46
Figura 7 - Porcentagem final de degradação de penas por <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em função das condições de cultivo estudadas.	49
Figura 8 - pH final do meio de cultivo em função das condições de cultivo estudadas.	51
Figura 9 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 100rpm e 1% penas).	53
Figura 10 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 1% penas).	54
Figura 11 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 200 rpm e 1% penas).	55
Figura 12 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (30°C, 150 rpm e 1% penas).	58
Figura 13 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (40°C, 150 rpm e 1% penas).	59
Figura 14 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 2% penas).	62
Figura 15 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 3% penas).	64
Figura 16 - MEV das penas em suspensão após cultivo de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 1200 x.	67

Figura 17 - MEV das penas em suspensão após cultivo de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 1800 x.	67
Figura 18 - MEV das penas em suspensão após cultivo de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 2000 x.	68
Figura 19 - MEV das penas em suspensão após cultivo de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 4000 x.	68
Figura 20 - MEV das penas em suspensão após cultivo de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 7000 x.	69
Figura 21 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes valores de pH.	71
Figura 22 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes temperaturas.	74
Figura 23 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas com diferentes íons.	77
Figura 24 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas com diferentes substâncias.	80
Figura 25 - Cromatografia em camada delgada (da esquerda para direita: amostra do material fermentado com bandas I, II, III e IV (150 rpm, 35°C, 1% após 72 horas de cultivo), ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, ácido glutâmico, histidina, leucina, lisina, metionina; prolina e serina.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 100 rpm e 1% penas).....	52
Tabela 2 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 1% penas).....	54
Tabela 3 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 200rpm e 1% penas).....	55
Tabela 4 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (30°C, 150rpm e 1% penas).....	57
Tabela 5 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (40°C, 150rpm e 1% penas).....	59
Tabela 6 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 2% penas).....	62
Tabela 7 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 3% penas).....	63
Tabela 8 - Média das atividades queratinolíticas obtidas para cada variável estudada na caracterização físico-química da enzima produzida por <i>Bacillus</i> sp. LM-21.....	70
Tabela 9 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes valores de pH, médias e desvios padrões.....	71
Tabela 10 - Médias e desvios padrão das atividades queratinolíticas residuais obtidas quando a queratinase foi incubada em diferentes temperaturas.	74
Tabela 11 - Médias e desvios padrão das atividades queratinolíticas obtidas quando a enzima foi incubada com diferentes íons.	76
Tabela 12 - Atividades queratinolíticas quando incubadas com diferentes substâncias, suas médias e desvios padrão.	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Queratina.....	15
2.2 Penas de frango	16
2.3 Enzimas Queratinolíticas.....	18
2.4 Micro-organismos produtores de queratinase e produção da enzima.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Micro-organismos	32
3.2 Identificação molecular por sequenciamento do DNA ribossomal 16S	33
3.2.1 <i>Extração do DNA genômico pelo método de TNES</i>	33
3.2.2 <i>Quantificação de DNA por espectrofotometria</i>	34
3.2.3 <i>Amplificação do fragmento de DNA por Reação em cadeia da polimerase - PCR.....</i>	34
3.2.4 <i>Purificação do produto de PCR</i>	35
3.2.5 <i>Sequenciamento do DNA ribossomal.....</i>	35
3.2.6 <i>Análises dos dados</i>	36
3.3 Obtenção do inóculo e determinação do crescimento bacteriano	36
3.4 Estudo da influência das condições de cultivo na produção de queratinase e degradação de penas por <i>Bacillus</i> sp. LM-21	37
3.5 Determinações analíticas	37
3.5.1 <i>Avaliação da porcentagem de degradação das penas.....</i>	37
3.5.2 <i>Atividade queratinolítica</i>	38
3.5.3 <i>Determinação da atividade proteolítica</i>	38
3.5.4 <i>Determinação da concentração da proteína.....</i>	39
3.6 Cromatografia em camada delgada	39
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40

3.8 Caracterização do caldo enzimático bruto.....	40
3.8.1 <i>Influência do pH sobre a atividade queratinolítica de Bacillus sp. LM-21.....</i>	<i>40</i>
3.8.2 <i>Influência da temperatura sobre a atividade queratinolítica de Bacillus sp. LM-21</i>	<i>40</i>
3.8.3 <i>Influência de substâncias químicas sobre a atividade queratinolítica de Bacillus sp. LM-21</i>	<i>41</i>
4.1 Identificação do micro-organismo.....	42
4.2 Estudo das condições ótimas de cultivo para a cepa <i>Bacillus sp. LM-21</i>	45
4.3 Caracterização físico-química do caldo enzimático de <i>Bacillus sp. LM-21</i> ...	69
5 CONCLUSÃO	84

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A indústria avícola apresenta suma importância no contexto de desenvolvimento socioeconômico do Brasil. Dentre os produtos comercializados pelo país, a carne de frango tem destaque especial na exportação.

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Carne de Frango (ABEF, 2013), no último relatório disponibilizado, a produção de carne de frango mundial alcançou 82,317 milhões de toneladas em 2012. No ranking de países produtores, o Brasil manteve a posição de terceiro lugar com uma produção de 12,645 milhões de toneladas (apresentando uma redução de 3,17% em relação a 2011) atrás dos Estados Unidos da América (EUA) com 16,476 milhões de toneladas e China com 13,700 milhões de toneladas.

Já no que se refere à exportação, o Brasil foi em 2012, o maior exportador mundial de carne de frango destinando para outros países 3,918 milhões de toneladas das 10,301 milhões de toneladas exportadas no mundo. Em relação ao ano de 2011, houve redução de 0,6% nos embarques feitos, o que gerou uma queda de 6,1% na receita cambial (US\$ 7,7 bilhões). O segundo maior exportador de carne de frango em 2012 foi os EUA com 3,211 milhões de toneladas e o terceiro foi a União Europeia (UE) com 1,080 milhões de toneladas (ABEF, 2013). Atualmente cerca de 40% da carne exportada no mundo tem origem no Brasil, até 2018 acredita-se que as exportações deverão representar 90% do comércio mundial, o que indica que o Brasil continuará a manter a posição de primeiro exportador mundial de carne de frango (BRASIL, 2013a).

Do volume total de carne de frango produzida no Brasil, 69% foi destinada ao consumo interno, enquanto que 31% foram destinados à exportação. Deste modo, o consumo per capita de carne de frango no país atingiu 45 quilos por habitante (ABEF, 2013).

Conforme descrito no site do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2013a), atualmente, a carne de frango produzida no Brasil chega a 142 países. Presente em todo território nacional, a carne de frango se destaca na região Sul, sendo o Paraná (30,39%) e Santa Catarina (17,29%) os principais fornecedores no abate.

Os maiores importadores da carne de frango produzida no Brasil são o Oriente Médio, que importou 1,396 milhões de toneladas em 2012, com pequena

retração de 1,2% para o ano anterior e receita de US\$ 2,624 bilhões; a Ásia cujas importações provenientes do Brasil foram de 1,137 milhões de toneladas com redução de 0,5% e receita de US\$ 2,396 bilhões; e a África, o terceiro maior mercado de destino em volumes, no qual as encomendas foram de 598 mil toneladas, gerando aumento de 20% e receita cambial igual a US\$ 822 milhões (crescimento de 19%) - (ABEF, 2013).

O Brasil investiu em fatores como qualidade, sanidade e preço para aperfeiçoar a produtividade no setor avícola. O país buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo adequado do aviário, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada. A parceria entre indústria e avicultores também contribuiu para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, resultando em reduzidos custos de transação e na qualidade, que atende às demandas de todo o mundo (BRASIL, 2013a).

A grande demanda na produção e consumo de carnes de frangos, no entanto, gera resíduos tais como as penas. Estas sofrem lenta deterioração no ambiente, originando compostos sulfurosos de odor desagradável, acarretando em um problema ambiental (CORTEZI et al., 2008). Neste sentido, micro-organismos queratinolíticos vêm sendo pesquisados quanto à sua aplicação em processos biotecnológicos, representando uma alternativa para o manejo destes resíduos (DAROIT, 2011).

É grande o interesse por pesquisas na área da biotecnologia visando à bioconversão de resíduos agroindustriais em metabólitos de interesse industrial, mediante o uso de micro-organismos. O interesse econômico para produção de insumos de maior valor agregado (enzimas, proteínas, pigmentos, antibióticos e outros) e a utilização de subprodutos agroindustriais leva a uma melhor qualidade do meio ambiente, através do desenvolvimento de tecnologias limpas orientadas por uma transformação sustentável desses recursos naturais. A busca por matérias primas de baixo custo e de fácil aquisição que possam ser utilizados como substratos fermentáveis (fontes de carbono e nitrogênio) na preparação de meios microbiológicos constituem um desafio interessante na biotecnologia industrial. Deste modo, existe um grande número de subprodutos da agroindústria que podem ser utilizados, estando as penas de frango inseridas nesse contexto (COELLO et al., 2003).

O processo convencional de produção da farinha de penas a partir de penas de frango apresenta alto custo termoeenergético e baixa digestibilidade do produto. Uma alternativa que visa melhorar a qualidade da farinha de penas é a sua obtenção através da hidrólise enzimática, buscando aumentar seu valor nutricional por resultar em um produto com maior disponibilidade de aminoácidos. O processamento biotecnológico de penas em contrapartida ao seu processamento físico-químico oferece vantagens relacionadas ao enriquecimento proteico do produto pela própria biomassa microbiana, e a não destruição de aminoácidos essenciais tais como metionina, lisina e histidina encontrados em níveis sub ótimos (ONIFADE et al., 1998). Portanto, a farinha de penas produzida pelo processo enzimático apresenta um valor nutricional superior ao produzido por processo tradicional, podendo apresentar alta digestibilidade.

As penas por serem ricas em queratina, representam ainda um potencial substrato para produção de queratinase. Esta protease por possuir alta especificidade pela queratina apresenta importantes aplicações biotecnológicas além da acima citada, podendo ser utilizada na indústria do couro, com potencial depilatório, substituindo parcial ou totalmente o uso de sulfetos (THANIKAIVELAN et al., 2004).

A indústria do curtume no Brasil é um setor que merece atenção, sabe-se que o rebanho brasileiro é um dos maiores do mundo em termos comercializáveis, caracterizando-se como um dos pontos fortes da cadeia produtiva. Segundo o site do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (BRASIL, 2013b), a indústria do couro no Brasil é formada por cerca de 800 curtumes. Hoje, o setor no Brasil tem uma capacidade instalada para processar couros crus bovinos e caprinos estimada em 40 milhões de peças, sendo a maior capacidade instalada de curtumes do mundo. Ao mesmo tempo em que a importância econômica dos curtumes é evidente, também é de conhecimento que o processo produtivo é extremamente agressivo ao meio ambiente, despejando efluentes ricos em cromo, sulfeto, deixando resíduos sólidos de difícil destino, causando odores, alterações térmicas no ambiente de trabalho além de outros problemas.

A tecnologia para processamento do couro é conhecida e dominada mundialmente. Porém a necessidade de diminuir a poluição gerada pelos despejos líquidos tem originado tecnologias alternativas de produção menos agressivas ao meio ambiente. Assim, a utilização da enzima queratinase aliada a outras proteases

oferece uma alternativa viável no processo de depilação do couro, pois, pode minimizar o uso de grandes quantidades de sulfeto de sódio, que representa 80% de toda a poluição do curtume. A substituição ou adição de enzimas proteolíticas ao processo além de representar uma alternativa para redução da quantidade de sulfeto empregado, melhora a qualidade do couro, recupera os pelos e elimina a necessidade de um banho extra para remoção dos agentes responsáveis pela depilação.

Em adição as aplicações citadas acima, a queratinase pode ser ainda utilizada em cremes depilatórios e em formulações para alisamento capilar e na eliminação de acne e calos humanos, apresentando a vantagem de serem atóxicas (GUPTA; RAMNANI, 2006).

Como observado, a crescente preocupação com o meio ambiente, aliado ao surgimento de novas tecnologias para conversão desses resíduos, tem motivado o interesse e estudo de micro-organismos queratinolíticos.

O objetivo deste trabalho foi estudar a estirpe *Bacillus* sp. LM-21, analisando sua potencialidade em sintetizar enzimas queratinolíticas e degradar penas de frango.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queratina

A queratina é uma proteína insolúvel composta por uma longa cadeia polipeptídica, responsável por torna-la resistente à ação por proteases comuns como tripsina e pepsina (RIFFEL et al., 2007). É o principal constituinte da epiderme e seus anexos, tais como cabelos, unhas, chifres, lã e penas (GHASEMI et al., 2011) sendo que nas penas, representa 87% da proteína total (BUREAU et al., 1999).

Caracterizada como uma proteína fibrosa é formada por um único tipo de estrutura secundária com as cadeias polipeptídicas arranjadas em longos filamentos, as α -hélices, ou em folhas, as folhas β - α queratina e β queratina, respectivamente (NELSON; COX, 2011). Sua estrutura tridimensional garante à queratina microfilamentos elásticos e resistentes (NAGAL; JAIN, 2010) e a alta concentração de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes tanto em seu interior como em sua superfície a torna impermeável à água (NELSON; COX, 2011). Deste modo, a queratina é uma proteína que apresenta funções estruturais e protetoras nos vertebrados. Sua estabilidade mecânica e resistência à degradação microbiana dependem do forte enovelamento da cadeia proteica em α -hélice e folhas β , ao alto grau de ligações cruzadas cisteína dissulfeto, além de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (LIN et al., 1992; ANBU et al., 2005).

As α -queratinas são conhecidas como proteínas de filamento intermediário e são caracterizadas por apresentarem funções estruturais (NELSON; COX, 2011). Estão presentes em células epiteliais, cabelos, unhas e lã de mamíferos (SAID; PIETRO, 2004). As β -queratinas apresentam em sua molécula uma estrutura primária que consiste de longa sequência polipeptídica alternando resíduos de glicina, alanina e serina, sempre com uma glicina entre um resíduo e outro (CORTEZI et al., 2008). Sendo assim, as glicinas situam-se no plano superior da folha β pregueada enquanto que os demais resíduos permanecem abaixo do plano. Os pares de folhas β pregueadas se empacotam perfeitamente. As ligações de hidrogênio neste estágio são as principais interações que permitem a estabilidade, não ocorre formação de pontes dissulfeto. Os monômeros são então, associados linearmente dando origem aos microfilamentos, e estes, estabilizados por pontes dissulfeto, originam as fibras de β queratina (GARRET; GRISHAM, 1995). A β

queratina é o principal constituinte de bicos e penas de aves, além de outras estruturas epidérmicas presentes nestas e em répteis (SAID; PIETRO, 2004).

Quando exibida na conformação β a queratina é mais facilmente hidrolisada que se exibida na conformação α (OLIVEIRA, 2006). Por conseguinte, as penas de frango se tornam um substrato potencialmente atrativo para sofrer ação enzimática e servir como fonte de aminoácidos.

2.2 Penas de frango

As penas das aves representam uma estrutura responsável por seu isolamento térmico, locomoção (voo) e conformação estrutural (OFANIDE et al., 1998). Estas possuem como principal componente a β -queratina (ICHIDA et al., 2001; SUH; LEE, 2001; RAMNANI; GUPTA, 2004; THYS et al., 2004; ZERDANI et al., 2004), sendo o material queratinoso mais abundante na natureza (CORTEZI et al., 2008).

As penas são constituídas por 80% de queratina, 1,2% de gordura e 1,3% de cinzas. Desta maneira, podem ser uma fonte de nutrientes rica e balanceada para cultivo de micro-organismos decompositores, com a possibilidade de não necessitar da suplementação com outros nutrientes (ZERDANI et al., 2004). Aminoácidos potencialmente úteis são de passível obtenção a partir das penas de aves domésticas (ricas em serinas, cisteínas e prolinas, que são aminoácidos raros), sendo que estes podem ser utilizados como complemento em rações animais (CORTEZI et al., 2008).

A indústria avícola é responsável pela geração de uma grande quantidade de subprodutos, sendo um deles as penas, estas quando descartadas no ambiente podem resultar em fonte poluente (ONIFADE et al., 1998). Assim, a utilização deste resíduo em processos fermentativos para produção da enzima queratinase proporciona uma redução substancial no gasto com a produção das mesmas, visto que este substrato é de fácil acesso e de baixo custo (GESSESSE et al., 2003). Na produção de enzimas indústrias até 30 a 40% do custo da produção é relacionado ao custo do substrato de crescimento do micro-organismo produtor (CORTEZI et al., 2008). Logo, a utilização de penas de aves domésticas como substrato para a fermentação de micro-organismos queratinolíticos oferece uma possível tecnologia

para obtenção de enzimas proteolíticas (BERNAL et al., 2003). A utilização de restos de penas constitui uma solução ecológica na medida em que seu acúmulo pode ser causa de poluição, além de favorecer o desenvolvimento de patógenos (SINGH, 1999).

A partir de penas residuárias oriundas da indústria avícola é possível a produção da farinha de penas, cujo processo utiliza vapor pressurizado. Este processo além de requerer uma quantidade significativa de energia, destrói certos aminoácidos essenciais e nutricionalmente importantes como metionina, lisina e triptofano. O resultado é um produto de baixa digestibilidade e com nutrientes de qualidade variável (WILLIAMS et al., 1990; NITRISINPRASERT et al., 1999; SANGALI; BRANDELLI, 2000). Contudo, a hidrólise enzimática é um método alternativo e promissor. Micro-organismos com atividade queratinolítica agem na degradação das penas melhorando seu valor nutricional por enriquecimento proteico, pela própria biomassa microbiana, evitando ainda, a destruição de certos aminoácidos essenciais (WILLIAMS et al., 1991; MANCZINGER et al., 2003; SAID; PIETRO, 2004).

Szabo et al. (2000) pesquisando a cepa termotolerante *Streptomyces graminofaciens* observaram, no caldo de cultivo, uma porcentagem grande de aminoácidos como arginina e treonina. Nam et al. (2002) estudaram a degradação de penas pela bactéria anaeróbica termofílica *Fervidobacterium islandicum* Aw-1 e verificaram um aumento em aminoácidos livres tais como histidina, cisteína e lisina, bem como outros nutricionalmente essenciais, como triptofano e metionina, os quais são raros na queratina de penas, sendo provavelmente produzidos como metabólitos pela bactéria. Jain et al. (2011) avaliaram a degradação de penas pelo isolado de actinomiceto *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 e observaram a presença de 21 µg/mL de aminoácidos livres no hidrolisado, sendo constatada a presença de seis aminoácidos essenciais, sendo eles, arginina, lisina, fenilalanina, isoleucina, leucina e valina.

Nos meios de cultivo, as penas são importantes fontes de carbono, enxofre e energia para o crescimento do micro-organismo. As penas podem ser adicionadas ao meio de cultivo inteiras (BOCKLE et al., 1995; SANGALI; BRANDELLI, 2000; RIFFEL et al., 2003; THYS et al., 2004; RAMNANI; GUPTA, 2004) ou moídas na forma de um pó fino (WILLIAMS et al., 1991; LIN et al., 1992; CHENG et al., 1995; NITISINPRASERT et al., 1999; SZABO et al., 2000; KIM et al., 2001; SUH; LEE,

2001). Neste caso, o ato de moê-las resulta na clivagem das ligações dissulfeto, o que torna a queratina mais susceptível à digestão proteolítica por proteases tais como tripsina e proteinase K. Szabo et al. (2000), entretanto, estudando a estirpe de *Streptomyces graminofaciens* observaram que a queratinase dessa bactéria parece ser mais eficiente na digestão de penas não moídas.

2.3 Enzimas Queratinolíticas

As proteases ou enzimas proteolíticas são enzimas capazes de realizar clivagem das ligações peptídicas de proteínas e peptídeos (NEURATH, 1989). Estas pertencem à classe das hidrolases, ou seja, são enzimas que promovem reações de hidrólise, transferência de grupos funcionais para água (NELSON; COX, 2011). São importantes biologicamente, tanto em patologia e fisiologia humana como na tecnologia, pois, apresentam grande potencial em hidrolisar substratos (BARRET et al., 2001). As proteases formam um complexo grupo de enzimas que variam enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (RAO et al., 1998).

Devido ao fato das proteases catalisarem, essencialmente, a mesma reação, ou seja, a hidrólise de ligações peptídicas, estas não são satisfatoriamente classificadas conforme os métodos utilizados para maioria das enzimas (BARRET et al., 2001). Todavia, critérios majoritários são utilizados para classificação das proteases, como, (i) o tipo de reação catalisada, sendo endo ou exoproteases; (ii) pH de atividade ótima, sendo proteases ácidas, neutras ou alcalinas; (iii) natureza química e mecanismo do sítio catalítico, sendo nomeadas as serino, cisteíno, aspartil, treonino, ou metaloproteases; e (iv) relações evolutivas quanto à sua estrutura (RAO et al., 1998; RAWLINGS; BARRET, 1999; EKICL et al., 2008; PAGE; DI CERA, 2008).

As queratinases constituem um grupo de proteinases cujo mecanismo de ação catalítica não é ainda completamente compreendido, porém são importantes na hidrólise de penas, cabelos, pelos, colágeno, no tratamento de águas residuárias e desobstrução de sistemas de esgoto (CHITTE et al., 1999), além de serem aplicadas em indústrias de alimentos, têxteis, de couro, na medicina, em cosmético e no processamento industrial de aves domésticas (FARAG; HASSAN, 2004). Estas

enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo produzidas por uma gama de micro-organismos (NITISINPRASERT et al., 1999). A maioria das queratinases, independente do micro-organismo produtor, é extracelular com massa molecular geralmente inferior a 50 kDa, sendo predominantemente classificadas como serino ou metaloproteases (GUPTA; RAMNANI, 2006).

As queratinases que são ativas extracelularmente são exportadas do local de síntese dentro da célula para agirem no meio externo. Entretanto, vários estudos sugerem evidências de atividade associada à célula, como no caso das proteases de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (ONIFADE et al., 1998). As queratinases descritas na literatura são em sua maioria, moderadamente termofílicas (45° - 90°C), alcalinas (pH 7,5 - 10,0) sendo que existem poucas informações disponíveis sobre as condições físico-químicas que melhorariam a sua secreção (BERNAL et al., 2003).

A maioria das queratinases requer a presença de queratina como indutor, porém, existem queratinases que agem sobre outros substratos, como aquela sintetizada por *Bacillus licheniformis*, que atua sobre soro albumina bovina, colágeno e elastina além de atuar sobre a queratina de penas (LIN et al., 1992; CHITTE et al., 1999).

De fato, essa classe particular de enzimas proteolíticas ganhou importância nos últimos anos por conta de seu potencial de hidrólise de substratos queratinosos (LATEEF et al., 2010) e consequente aplicação no mercado biotecnológico.

2.4 Micro-organismos produtores de queratinase e produção da enzima

A hidrólise enzimática de penas a partir de micro-organismos queratinolíticos representa uma alternativa eficaz para produção de farinha de penas (MANCZINGER et al., 2003), pois, resulta em um produto com maior valor nutricional devido à preservação de aminoácidos essencial nesse substrato (SANGALI; BRANDELLI, 2000).

Estes micro-organismos, sejam termofílicos ou mesofílicos, são encontrados em muitos locais, com e sem histórico de deposição ou presença de material queratinoso, incluindo ambientes aeróbicos ou anaeróbicos. Assim, a produção de queratinase por micro-organismos, aparentemente, é comum na natureza em

diversas condições ecológicas, indicando que estes micro-organismos participam dos processos de ciclagem do carbono, nitrogênio e enxofre das moléculas de queratina. Neste sentido, explorar a diversidade microbiana pode resultar no conhecimento de novas queratinases com potencial para aplicação biotecnológica (BRANDELLI et al., 2010).

Diversos micro-organismos podem sintetizar a enzima queratinase, portanto, a busca pelo isolamento de micro-organismos que produzam enzimas queratinolíticas mais resistentes, específicas e termoestáveis, a fim de serem aplicadas na indústria, tem o interesse de diminuir possíveis impactos ambientais (RIESSEN; ANTRANIKIAN, 2001). Dentre os micro-organismos com atividade queratinolítica encontram-se os fungos (BOCKLE et al., 1995) e as bactérias (WILLIAMS et al., 1991).

A produção de queratinase é geralmente induzida pela queratina (CHAO et al., 2007; ANBU et al., 2005; CAI et al., 2008; GHOSH et al., 2008) presente em substratos queratinosos no meio de cultivo. Contudo, existem estudos que relatam a produção de queratinase a partir de outros substratos, na ausência de queratina (CHENG et al., 1995; KIM et al., 2001; KUBLANOV, 2009), dentre eles, a farinha de soja (GRADISAR et al., 2005), farelo de soja (PILLAI; ARCHANA, 2008), leite desnatado (MITSUIKI et al., 2002), pó de casca de camarão (WANG et al., 2008), gelatina (THYS et al., 2006), caseína de soro de queijo (CASARIN et al., 2008).

O gênero *Bacillus* apresenta representantes que se destacam como importantes produtores de queratinase (GIONGO et al., 2007; CORRÊA et al., 2010; NAGAL; JAIN, 2010; BRANDELLI et al., 2010). Entre as espécies descritas como queratinolíticas podem ser destacadas, *B. cereus* (KIM et al., 2001; GHOSH et al., 2008; LATEEF et al., 2010); *B. amyloliquefaciens* (GIONGO et al., 2007; CORTEZI et al., 2008); *B. subtilis* (KIM et al., 2001; MACEDO et al., 2005; GIONGO et al., 2007; BALAJI et al., 2008; PILLAI; ARCHANA, 2008; CAI; ZHENG, 2009; MAZOTTO et al., 2010; JEONG et al., 2010); *B. pumilus* (KIM et al., 2001; KIM et al., 2005; SON et al., 2008); *B. megaterium* (PARK; SON, 2009); *B. licheniformis* (WILLIAMS et al., 1990; MANCZINGER et al., 2003; FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2009; TIWARY; GUPTA, 2010); *B. pseudofirmus* (GESSESSE et al., 2003; KOJIMA et al., 2006) e *B. halodurans* (TAKAMI et al., 1999; PRAKASH et al., 2010).

Nitisinprasert et al. (1999) observaram que as cepas *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*, isoladas de resíduos de aves domésticas e solo, exerceram ação sinérgica na degradação de penas.

Szabo et al. (2000) isolaram uma cepa de *Streptomyces graminofaciens* termotolerante que utilizou penas trituradas como única fonte de carbono e nitrogênio. A adição de glicose e peptona em baixas concentrações mostrou-se benéfica para o crescimento celular, especialmente logo após a inoculação. Verificou-se que em baixas concentrações de penas a degradação foi mais rápida (24 - 48 horas), quando utilizada concentração de 10% (m/v) de penas, esta ocorreu mais lentamente e apresentou seu ápice com uma semana de cultivo.

Kim et al. (2001) isolaram bactérias a partir de resíduos de processamento de aves domésticas, sendo que *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus* foram as cepas que degradaram penas de forma mais eficaz. Penas de frango foram usadas como substrato para produção da enzima queratinase pelas três cepas. Na presença de caseína, *B. subtilis* apresentou um aumento considerável na produção de enzima, enquanto que *B. pumilis* sofreu inibição. A farinha de penas também foi utilizada no cultivo dos três micro-organismos, mostrando ser um substrato ineficiente para produção de enzimas no cultivo de *B. subtilis* e *B. cereus*, mas eficiente quando adicionado ao meio de cultivo de *B. pumilis*.

Ainda neste sentido, as condições ótimas para a produção de enzimas por *B. subtilis* foram 40°C e pH 5,0 – 9,0; para o *B. pumilis* 40°C e pH 5,0 - 6,0; já para o *B. cereus* foram 30°C e pH 7,0. Vale ressaltar que os três isolados demonstraram ser termotolerantes, sendo que *B. subtilis* e *B. pumilis* foram capazes de crescer a 55°C, já *B. cereus* foi capaz de crescer a 40°C. A atividade queratinolítica foi determinada para cada cepa, sendo a máxima de 161 U/mL para *B. subtilis* e de 149 U/mL para *B. pumilis*, ambas obtidas após 72 horas de cultivo. Para *B. cereus*, a atividade queratinolítica máxima foi de 117 U/mL após 60 horas de cultivo.

Gessesse et al. (2003) isolaram duas bactérias alcalofílicas produtoras de queratinase. As bactérias utilizaram penas de frango como única fonte de carbono e nitrogênio, sendo capazes de crescer e produzir queratinase. A adição de 0,5% (m/v) de glicose ao meio de cultura resultou em um aumento na produção da enzima produzida por *Bacillus pseudofirmus* e suprimiu a produção por *Nestemkoria* sp.

Suntornsuk e Suntornsuk (2003) estudaram as condições que influenciaram a degradação de penas pela cepa *Bacillus* sp. Os resultados mostraram que as penas

foram quase totalmente degradadas quando utilizadas inteiras a 1% (m/v), 5% (v/v) de inoculo, temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 250 rpm. Foi estudado ainda a influência da adição de glicose, metanol, Tween 80 e Triton X-100, comprovando-se que os mesmos não exerceram influência na degradação de penas.

El-Rafai et al. (2005) isolaram, a partir de amostra de solo, diferentes bactérias com capacidade de degradar penas. Uma das cepas apresentou alta atividade queratinolítica e foi identificada por sequenciamento do gene que codifica para RNA ribossomal 16S como *Bacillus pumilus* FH9. As condições de cultivo que resultaram em completa degradação de penas foram pH 8,0; 2% (v/v) de inoculo, velocidade de agitação de 200 rpm, 37°C em 48 horas. Nestas condições, a atividade queratinolítica reportada foi de 647 U/mL.

Anbu et al. (2005) realizaram um estudo com a cepa *Scopulariopsis brevicaulis* isolada de solo de indústria de frango na Índia. Uma queratinase extracelular foi isolada e purificada a partir deste fungo. A enzima purificada foi caracterizada como uma proteína monomérica com massa molecular de 39 kDa quando avaliada por dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE). Planejamento do tipo Box-Behnken Design foi realizado para verificar a estabilidade da enzima em diferentes valores de pH (4,0 – 11,0) e temperatura (15 - 65°C). Os resultados mostraram que a queratinase foi ativa em condições alcalinas, com um ótimo de pH 8,0. Os valores obtidos para atividade da queratinase decaíram com o aumento do pH a partir deste valor. A temperatura ótima para atuação da queratinase foi determinada como 40°C. Acima de 50°C a enzima foi aproximadamente inativada.

Giongo et al. (2007) obtiveram 86 isolados a partir de peixes da bacia Amazônia Brasileira dentre os quais selecionaram três cepas de *Bacillus* spp. denominadas P6, P7 e P11. Por análises morfológicas e bioquímicas os isolados foram identificados e análises das sequências de DNA ribossomal 16S apresentaram mais de 99% de similaridade com *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus valesensis*, respectivamente. Atividade proteolítica foi observada para as três cepas na faixa de pH 7,0 - 11,0, sendo a atividade queratinolítica também monitorada. Penas de frango foram utilizadas como fonte primária de carbono, nitrogênio e energia, sendo que considerável degradação das

mesmas foi observada após 72 horas de incubação, contudo as raques das penas não foram extensivamente degradadas.

A influência da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima também foi determinada. As enzimas se apresentaram relativamente estáveis a 37°C, mas depois de 60 minutos foram inativadas a 55°C. A atividade máxima foi avaliada a uma temperatura em torno de 45°C para todas as enzimas. A atividade queratinolítica foi determinada em diferentes valores de pH e a 45°C. As proteases produzidas por P7, P6 e P11 mostraram-se ativas em pH alcalino com máxima atividade em pH 9,0 e ainda apresentaram eficiência quanto à capacidade depilatória em pele de bovinos. Em pH 7,0 foi notada uma redução significativa da atividade enzimática. Íons metálicos como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} foram testados não apresentando importantes efeitos na atividade enzimática, mas Hg^{2+} apresentou capacidade de inibir completamente a atividade proteolítica. Detergentes como Triton X-100, Tween 20 e SDS (dodecil-sulfato de sódio) não foram capazes de inibir as proteases secretadas.

Cortezi et al. (2008a) isolaram e estudaram uma bactéria com grande capacidade em degradar penas de frango inteiras. A mesma foi identificada como *Bacillus amyloliquefaciens*. Neste estudo, fermentações realizadas em mesa agitadora (Shaker) mostraram que maior atividade da enzima e consequente degradação de penas foram obtidas quando a estirpe foi cultivada sob as condições de 40°C, 150 rpm, 1% (m/v) de penas, 2% (v/v) de inoculo em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Análises do hidrolisado de penas revelou a presença dos aminoácidos cisteína, prolina, serina, metionina, sugerindo desta forma sua utilização em rações animais. Em outro trabalho, Cortezi et al. (2008b) caracterizaram a enzima bruta sintetizada por *Bacillus amyloliquefaciens*, verificando que a mesma apresentou pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 50°C. A atividade queratinolítica foi significativamente inibida por EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético (50 mM) e ativada quando incubada com mercaptoetanol (0,1 e 0,5% v.v).

Ghosh et al. (2008) objetivaram em seu estudo a degradação de penas por *Bacillus cereus* DCUW. Neste trabalho, penas “in natura” foram utilizadas como substrato para produção de queratinase, sendo a temperatura de crescimento variada em uma faixa de 25 – 40°C, com temperatura ótima para atividade queratinolítica observada entre 30 – 37°C. Após degradação das penas, a composição de aminoácidos do hidrolisado foi avaliada por análise em sistema de

cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (LC-10A, Shimadzu), de modo que os mesmos foram encontrados nas seguintes concentrações: ácido aspártico 2,7 µg/mL; treonina 4,9 µg/mL; serina 2,59 µg/mL, ácido glutâmico 4,6 µg/mL; prolina 1,44 µg/mL; glicina 2,36 µg/mL; alanina 2,27 µg/mL; valina 2,23 µg/mL; metionina 0,63 µg/mL; isoleucina 2,0 µg/mL; leucina 3,35 µg/mL; tirosina 3,59 µg/mL; fenilalanina 1,67 µg/mL; histidina 3,4 µg/mL; lisina 9,5 µg/mL; triptofano 1,33 µg/mL; argenina 2,5 µg/mL.

Cai et al. (2008) isolaram uma cepa com potencial em degradar penas de frango identificada como *Bacillus subtilis*. Um screening de bactérias mutantes foi realizado utilizando metagênese N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina e a cepa mutante KD-N2 produziu 2,5 vezes maior atividade queratinolítica (60,9 U/mL) que a cepa selvagem (24,3 U/mL). A cepa KD-N2 foi então cultivada em diferentes substratos queratinosos (penas, pelos, lã e seda). Penas de frango a 1% foi considerado o melhor substrato para produção de queratinase. As melhores condições de cultivo para a cepa KD-N2 e produção de queratinase foram determinadas como pH inicial de 7,5, 2% (v/v) de inóculo, 23°C e 200 rpm.

Park e Son (2009) estudaram a cepa mesofílica *Bacillus megaterium* F7-1 com o objetivo de avaliar as melhores condições de cultivo e produção da enzima queratinase. As condições ótimas de crescimento foram pH 7,0 – 11,0 e temperatura de 25 - 40°C. A produção de queratinase foi induzida na presença de penas de frango, sendo estas totalmente degradadas após sete dias. A adição no meio de cultivo de 0,6% (m/v) de leite desnatado aumentou em 9,4 vezes a produção da enzima, resultando em uma atividade queratinolítica de 468 U/mL quando comparado ao cultivo realizado na ausência de leite desnatado.

Considerando o grupo actinobactérias, muitos representantes também estão em constante estudo por sua elevada capacidade de produção da queratinase. Letourneau et al. (1998) isolaram a partir de penas degradadas naturalmente, uma *Streptomyces* sp. produtora de elevada atividade queratinolítica quando cultivado em meio de cultura contendo farinha de penas.

Kansoh et al. (2009) isolaram a partir de amostras de solo coletadas em diversas localidades do Egito diferentes espécies de *Streptomyces* spp. Vinte e um desses isolados apresentaram atividade proteolítica, oito demonstraram capacidade em degradar queratina, desses, dois apresentaram alta atividade queratinolítica, sendo estes identificados como *Streptomyces albidus* E4 e *Streptomyces*

griseoaurantiacus E5. Algumas condições de cultivo foram avaliadas com a finalidade de obter máxima produção de queratinase. A suplementação do meio de cultivo com galactose proporcionou a maior produção da enzima por ambas as cepas, já a adição de nitrato de amônio foi considerada uma boa fonte de nitrogênio para a produção de queratinase por *S. albidus* E4. A máxima produção de enzima foi obtida no quinto dia de incubação e sob as condições de 30°C e pH 8,0 para *Streptomyces* ssp. E4 e E5. Ambas as cepas produziram queratinase quando cultivadas em diferentes substratos queratinosos, sendo estes, pena, lã, unha e cabelo.

Lateef et al. (2010) isolaram a cepa *Bacillus cereus* LAU 08 a partir de penas de frango. Para produção de queratinase foram utilizadas, separadamente, três fontes de queratina, a saber, cascos, chifres e penas. A temperatura de crescimento utilizada foi a mesma para os três substratos, sendo de 37°C. As atividades queratinolíticas e proteolíticas foram avaliadas em cada caso e valores considerados elevados pelos autores foram registrados para as três fontes de queratina. Conforme o substrato e a atividade em estudo, as atividades máximas foram obtidas dentro de 24 a 96 horas de cultivo. Os autores reportaram atividades de 67,9; 63,1 e 51,7 U/mL, respectivamente para cascos, chifres e penas. Já para atividade proteolítica, os máximos valores reportados foram 11860, 820 e 126 U/mL, sendo os substratos queratinosos, concomitantemente, penas, cascos e chifres. Segundo os autores, as condições ótimas para obter a maior atividade queratinolítica foram determinadas em pH 7,0 e 50°C, contudo, a enzima apresentou mais de 50% de sua atividade em uma faixa de pH 7,0 – 9,0 e temperatura de 40 - 70°C. O isolado se mostrou capaz de degradar completamente penas de frango inteiras em um período de sete dias a uma temperatura de 30 ± 2°C.

Fakhfakh-Zouari et al. (2010) isolaram uma bactéria queratinolítica a partir de água poluída de matadouro de frangos, esta foi identificada como *Bacillus pumilus* A1. A composição do meio de cultivo e condições para produção de queratinase foram otimizadas utilizando dois métodos estatísticos: palanejamento Plackett-Burman e Delineamento Composto Central. A otimização do meio de cultivo resultou em um aumento de 3,4 vezes na produção da enzima (87,73 U/mL) em comparação ao meio inicial (25,9 U/mL). Os autores observaram completa solubilização das penas após 6 horas de incubação.

Quando realizada a caracterização da queratinase, verificou-se que a mesma apresentou-se mais ativa quando incubada entre 50 e 70°C, sendo que a máxima atividade queratinolítica ocorreu a 55°C em pH 9,0. Quanto a influência de íons metálicos na atividade da enzima observou-se que a adição de Ca^{2+} e Na^+ aumentaram a atividade queratinolítica em 50 e 22%, respectivamente. No entanto, Cu^{2+} , Mn^{2+} e Hg^+ inibiram a atividade queratinolítica (28, 47, e 92%, respectivamente), Mg^{2+} , Ba^{2+} e K^+ não demonstraram influência sobre a enzima e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) - (5 mM) inibiram a ação da enzima.

Lin e Yin (2010) isolaram e identificaram uma espécie de *Bacillus licheniformis* YJ4 com alta atividade queratinolítica. A cepa foi cultivada por 72 horas em meio de cultura contendo farinha de penas (0,5%), NH_4Cl (0,05%), NaCl (0,05%), K_2HPO_4 (0,04%), KH_2PO_4 (0,03%), MgCl_2 (0,01%) extrato de levedura (0,01%) e casca de arroz (0,1%), o cultivo foi realizado a 37°C. Deste cultivo, foram purificadas duas queratinases (queratinase I e II) com massas molares de 35,5 e 32,8 kDa, respectivamente. A estabilidade das queratinases foram avaliadas em diferentes valores de pH (3,0 - 11,0) e temperatura (10 - 90°C), sendo que ambas se mantiveram estáveis em uma faixa de pH 6,0 - 10,0 e temperatura de 10 - 50°C. O pH e temperatura ótimos foram semelhantes para as queratinases, a saber pH 9,0 e temperatura 60°C. O estudo com inibidores metálicos e agentes redutores mostraram que a queratinase I foi considerada uma cisteína protease, enquanto que a queratinase II foi considerada uma serina protease.

Shrinivas e Naik (2011) estudaram uma protease alcalina termofílica produzida por *Bacillus* sp. JB 99 que exibiu atividade queratinolítica. A enzima foi purificada por precipitação com sulfato de amônio seguida por cromatografia CM-celulose e Sephadex G-100, e apresentou uma atividade específica de 2989,6 U/mg. A protease purificada apresentou massa molar de 29 kDa. A influência do pH (6,0 - 13,0), temperatura (30 - 90°C), possíveis inibidores de protease (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA 5 mM; fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF 1 mM; 1,10-fenantrolina 5 mM; 1-cloro-3-tosilamido-4-fenil-2-butanona - TPCK 1 mM) e íons metálicos foram avaliados. O pH ótimo para atividade queratinolítica foi 11,0, enquanto que a temperatura foi 70°C. Quanto a ação dos inibidores de proteases, PMSF inibiu completamente a atividade da enzima, TPCK inibiu 80% da atividade proteolítica e 75% da atividade queratinolítica, além disso EDTA e 1,10-fenantrolina

não inibiram a enzima. Os íons metálicos Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} exerceram aumento da atividade enzimática, já a adição de Zn^{2+} resultou em diminuição e Fe^{3+} não apresentou influência.

Jellouli et al. (2011) purificaram uma serino protease alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* MP1 com massa molar de 30 kDa. Um estudo da enzima foi realizado determinando-se a influência do pH na atividade e estabilidade da protease, a faixa de pH variou de 6,0 - 13,0 a 70°C, utilizando caseína 1% (w/v) como substrato. A influência da temperatura foi avaliada abrangendo uma faixa de 50 - 80°C. Os autores avaliaram também a influência de íons metálicos (5 mM) e inibidores de proteases na atividade da enzima, Na^+ ; K^+ ; Ca^{2+} ; Mn^{2+} ; Zn^{2+} ; Cu^{2+} ; Ba^{2+} ; Mg^{2+} ; Hg^{2+} ; PMSF, EDTA, β -Mercaptoetanol e DTNB (Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico). Além destes, estudou-se ainda a influência de solventes orgânicos na estabilidade da enzima (etanol, metanol, hexano, N,N-dimetil-formamida - DMF, dimetilsulfoxido - DMSO) assim como, surfactantes (Triton X-100, Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio - SDS). O pH e temperatura ótimos para atividade proteolítica foram 10,0 e 70°C, respectivamente. Os resultados revelaram alta estabilidade da enzima em pH alcalino, surfactantes não iônicos e relativa estabilidade em SDS.

Sapna e Yamini (2011) realizaram um estudo no qual coletaram amostras de solos com cabelo e penas residual, destas amostras isolaram micro-organismos queratinolíticos. Todas as coletas foram realizadas na Índia. As cepas descritas como BS-1, BS-2, BS-3 e BS-4 apresentaram potencial queratinolítico, sendo selecionadas para estudo da estabilidade da queratinase em diferentes valores de pH (6,0 - 9,0) e temperatura (26°C, 30°C, 34°C e 38°C). O pH ótimo para ação da queratinase de BS-1, BS-2, BS-3 e BS-4 foi de 7,5; 9,0; 8,0 e 8,5, enquanto que a temperatura ótima foi de 30, 38, 26 e 34°C, respectivamente.

Mazotto et al. (2011) isolaram dezessete diferentes micro-organismos queratinolíticos a partir de resíduos de aves em decomposição. Após cultivo em meio mínimo contendo penas de frango como única fonte de carbono e nitrogênio, três isolados apresentaram crescimento acentuado e degradação de penas, sendo identificados como *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1270, *Bacillus subtilis* LFB-FIOCRUZ 1273, e *Bacillus licheniformis* LFB-FIOCRUZ 1274. As três cepas foram cultivadas em meios contendo penas inteiras e farinha de penas, segundo os autores as queratinases extracelulares e peptidases foram produzidas após sete

dias de cultivo. Farinha de penas foi considerada o melhor substrato para produção da enzima peptidase pelos três *Bacillus* obtendo-se as atividades de 1273, 412 e 463 U/mL, respectivamente. As três cepas foram capazes de degradar penas inteiras (40 - 95%) produzindo de 1,9 a 3,3 mg/mL de proteínas solúveis.

Bach et al. (2011) avaliaram o potencial queratinolítico de três bactérias gram-positivas isoladas de solo brasileiro, sendo estas identificadas como *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3, objetivando-se o estudo de caracterização das proteases produzidas pelas cepas. As proteases sintetizadas pelas cepas K12, A22 e P3 apresentaram pH ótimo de 8,0; 7,5 e 6,0; respectivamente. As temperaturas ótimas foram determinadas abrangendo uma faixa de 45 - 55°C. Todas as três proteases foram ativas em azoqueratina e inibidas por EDTA, sugerindo que estas sejam metaloproteases. Solventes orgânicos e SDS estimularam a atividade proteolítica da cepa K12, sugerindo que essa enzima tem potencial para aplicação em formulação de detergentes e síntese de peptídeos.

Ali et al. (2011) realizaram um estudo com o fungo *Aspergillus oryzae* NRRL-447, utilizando meio com penas de frango como fonte de carbono e nitrogênio para produção de enzima queratinase. As condições ótimas para produção da enzima foram de 30°C e 150 rpm, sendo que a completa degradação das penas foi observada após cinco dias de incubação. Os autores também realizaram um estudo de caracterização enzimática no qual avaliaram a influência do pH, temperatura e íons metálicos na atividade queratinolítica. Os resultados demonstraram que a enzima parcialmente purificada foi ativa em condições alcalinas e neutra com ótimo de atividade em pH 7,0. Quanto à influência da temperatura, a faixa estudada foi de 40 - 90°C, com ótimo em 70°C. A adição de EDTA diminuiu a atividade queratinolítica em 28%. A adição de Mercaptoetanol resultou em aumento de 19% da atividade da queratinase. A enzima foi fortemente inibida por Hg^{2+} e Ag^{+} .

Ni et al. (2011) realizaram um estudo visando melhorar a produção de queratinase por *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410. Os experimentos foram realizados a partir de um planejamento fatorial simples e planejamento Box-Behnken (BBD). As variáveis estudadas foram concentração inicial de penas, pH inicial, adição de sais de amônia e sais de nitrato, adição de farinha de milho, concentração de glicose e K_2HPO_4 iniciais. Os resultados mostraram que a produção de queratinase foi dependente da concentração inicial de penas, sendo 2% a

concentração considerada ótima. A produção de queratinase quando utilizado 0,5% de penas foi aproximadamente sete vezes menor que a queratinase produzida a 2% de penas, além disso, a 2,5% de penas os autores reportaram repressão enzimática.

Jayalakshmi et al. (2011) investigaram as condições ideais para cultivo de *Streptomyces* sp. JRS19 e produção de queratinase. Dentre as condições estudadas, avaliou-se a influência da temperatura (20 - 40°C) e pH inicial (5,5 - 8,0), adição de diferentes fontes de carbono (dextrose, maltose, sacarose, galactose e manitol a 2%) e nitrogênio (extrato de carne, peptona, caseína, extrato de levedura e gelatina a 0,1%), além da adição de diferentes aminoácidos (alanina, valina, asparagina, metionina e histidina a 5 mM). Os resultados revelaram que a temperatura de 30°C foi considerada ótima para produção de queratinase resultando em 3,17 U/mL após seis dias de cultivo. Os autores relataram que 7,0 foi considerado o pH ótimo, além disso, a adição de sacarose e peptona resultaram em aumento significativo na produção de queratinase.

Sahoo et al. (2012) isolaram uma bactéria de solo de lixão na Índia, esta foi identificada como *Bacillus weihenstephanensis* PKD-5 por análise morfológica e físico-química, assim como análise da sequência do gene DNA ribossomal 16S. Uma queratinase extracelular foi produzida em cultivo realizado em meio de cultura contendo penas de frango como única fonte de carbono e nitrogênio. Um estudo das melhores condições para produção de queratinase foi realizado sendo que as condições ótimas para produção da enzima foram pH inicial 7,0; inoculo 2% (v/v) e 40°C. A maior atividade queratinolítica observada ocorreu após sete dias de cultivo e a velocidade de agitação de 120 rpm, resultando em 6,95 U/mL.

Cedrola et al. (2012) investigaram as condições de cultivo para produção de queratinases e degradação de penas de frango por *Bacillus subtilis* SLC, visando o potencial da cepa em reciclar resíduos descartados pela indústria do frango. A cepa foi isolada de resíduos da agroindústria coletados em uma granja localizada no Brasil e análises do gene DNA ribossomal 16S confirmaram a cepa como pertencente a espécie *Bacillus subtilis*. O estudo constatou elevada produção de queratinase quando o meio de cultivo foi feito em pH 8,0 com atividade queratinolítica de 280 U/mL. A atividade foi maior quando o inoculo foi propagado por 72 horas em 1% de penas, suplementado com 0,1% de extrato de levedura. Quanto ao extrato enzimático, as queratinases foram ativas em uma faixa de pH 2,0 - 12,0; com atividade máxima em pH 10,0 e temperatura de 60°C. Todas as

queratinases descritas foram consideradas serino peptidases. O extrato enzimático bruto degradou queratina, gelatina, caseína e hemoglobina. Microscopias eletrônicas de varredura mostraram que as células de *Bacillus* aderiram às superfícies das penas após 98 horas de cultivo e a degradação dos filamentos foi observada. A presença de sulfeto foi detectada no meio extracelular, provavelmente auxiliando a quebra das pontes de sulfeto na queratina das penas. A adição de sulfeto externo aumentou a degradação das penas.

Queiroga et al. (2012) realizaram estudo no qual isolaram 115 cepas provenientes de lã de ovinos Merino Portugêses. Destas, cinco cepas apresentaram potencial em degradar lã. Todas as cepas selecionadas pertencem ao gênero *Bacillus*, provavelmente *subtilis* e *licheniformis* como mostrou o sequenciamento de DNA ribossomal 16S. Os cinco isolados foram capazes de crescer, degradar lã e penas de galinha tanto nas formas nativas quanto moídas. Cabelo e unhas humanas também foram degradados, mas em menor grau. A melhor atividade queratinolítica foi observada quando utilizado farinha de penas para a maioria dos isolados.

Ghasemi et al. (2012) isolaram e identificaram bactérias com alta atividade queratinolítica de diferentes fontes de resíduos de aves em decomposição no solo de Shiraz, no Iran. Uma triagem inicial mostrou 30 cepas com alta atividade proteolítica que foram transferidas para meio basal contendo penas de frango como única fonte de carbono, enxofre e nitrogênio. As atividades queratinolíticas de 13 isolados que cresceram bem neste meio foram analisadas utilizando azoqueratina como substrato. Os isolados foram identificados através do sequenciamento do gene DNA ribossomal 16S, e destes, *Bacillus* sp. MKR5 foi o que exibiu maior atividade queratinolítica (225 U/mL), sendo, portanto, escolhido para posterior caracterização. MKR5 apresentou crescimento em uma vasta escala de temperatura, de 20- 50°C. A degradação completa de penas foi alcançada quando a temperatura de 40°C foi utilizada após 24 horas de fermentação. A cepa produziu uma queratinase termoestável com atividade ótima a 70°C e pH 8,0. A atividade da enzima cresceu significativamente quando mercaptoetanol foi utilizado com agente redutor. A queratinase teve ainda sua atividade substancialmente aumentada quando Co^{2+} , Mg^{2+} , Triton X-100, Tween-80 e EDTA foram adicionados ao meio, porém, a adição de SDS causou sua inibição.

Han et al. (2012) isolaram de solo contendo despejo de penas uma bactéria capaz de degradar penas de frango. Esta foi identificada com *Pseudomonas*

aeruginosa C11 com base em análises de sequências de DNA ribossomal 16S. Uma protease queratinolítica foi purificada do meio fermentado e caracterizada. Esta queratinase apresentou capacidade em degradar fortemente penas com 24 horas de fermentação a 37°C. A queratinase foi estável na faixa de pH entre 5,0 - 10,0; e a temperatura abaixo de 50°C, com ótimo de pH 7,5 e 60°C. A adição de Mn^{2+} a 2 mM estimulou a atividade queratinolítica em 21%, enquanto que Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} e Fe^{2+} inibiram a atividade queratinolítica. A atividade da queratinase também foi fortemente inibida por EDTA, mas não por PMSF o que indicou que a queratinase é uma metaloprotease.

Tork et al. (2013) cultivaram em meio contendo farinha de penas a cepa *Bacillus subtilis* NRC3 que secretou uma enzima queratinolítica de 32 kDa. A queratinase foi purificada e parcialmente caracterizada por ensaios bioquímicos. A atividade enzimática da queratinase purificada foi estimulada por Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} e inibida por inibidores de metaloproteases, o que indica ser a enzima pertencente a este grupo. O pH ótimo e temperatura para a enzima purificada foram de 7,5 e 50°C, respectivamente.

Sivakumar et al. (2013) isolaram a cepa *Bacillus thuringiensis* TS2 de solo contendo resíduos de penas. Uma queratinase produzida utilizando a cepa foi caracterizada. A produção de queratinase pela cepa *Bacillus thuringiensis* TS2 foi estável em pH 10,0 apresentando atividade específica máxima de 102,16 U/mg e a 50°C com atividade específica máxima de 52,16 U/mg. A atividade proteolítica foi ligeiramente estimulada por $CaCl_2$ e $MgCl_2$, mas foi fortemente inibida por $CuSO_4$ e $ZnSO_4$. 2-mercaptoetanol causou uma inibição moderada na atividade proteolítica, enquanto que EDTA inibiu quase que completamente a ação da enzima.

Villa et al. (2013) estudaram os efeitos de hidrolisados queratinolíticos obtidos a partir de penas de frango em fibras capilares. A cepa utilizada foi *Bacillus subtilis* AMR. O micro-organismo foi cultivado em meio contendo 1% de penas, pH 8,0, suplementado com 0,01% de extrato de levedura, durante 5 dias a 28°C sob agitação. Os hidrolisados foram obtidos por centrifugação e ultrafiltração em membrana (Millipore – YC05) do meio fermentado. Preparações comerciais de hidrolisados de queratina foram utilizadas como padrão. Após os cinco dias de fermentação 95% das penas foram degradadas pelas queratinases do micro-organismo. Análises de cromatografia em camada delgada instrumental – HPTLC, mostraram que os peptídeos obtidos no hidrolisado apresentavam menor massa

molecular que os que estavam presentes no hidrolisado comercial. Com o hidrolisado enzimático resultante da fermentação foi formulado um xampu aplicado em fibras capilares para avaliar o grau de hidratação das mesmas. A hidratação foi mais eficaz com a utilização de calor o que sugere uma incorporação mais completa dos hidrolisados as fibras. Microscopias eletrônicas de varredura mostraram depósitos de matéria orgânica nas junções das cutículas o que, provavelmente, colaborou para selagem destas, aumentando o brilho e maciez das fibras.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Inicialmente foi realizada uma triagem de micro-organismos preservados sob congelamento a -80°C pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia Industrial, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, IB, UNESP, Rio Claro – SP. Os micro-organismos foram crio-conservados em glicerol 30% durante o projeto de doutorado da Dra. Mariana Cortezi e concedidos pela mesma para este estudo.

Em seu projeto a Dra. Mariana Cortezi realizou o isolamento dos micro-organismos a partir de várias fontes, a seguir:

- a) Abatedouro de aves Fricock (localizado na cidade de Rio Claro – São Paulo), onde coletou água no decantador da granja; água do flotador e água de lavagem de vísceras;
- b) Sítio localizado na região de Ajapi (distrito de Rio Claro – São Paulo) onde retirou amostras de cama de frango; compostagem (mistura contendo camadas de restos de frango e cama de frango); e amostras de chorume.
- c) Abatedouro de aves da “Kori” (Fundação Mokito Okada – localizada em Rio Claro – São Paulo) onde retirou amostras de água de lavagem de vísceras e água de escaldamento.

Durante a triagem foram selecionados, a princípio, os sete micro-organismos com maior potencial de degradação de penas de frango. Para tal, foram realizadas fermentações em meio Williams et al. (1990) nas condições de 35°C , 150 rpm e 1% de penas inteiras com a finalidade de verificar o potencial queratinolítico de cada estirpe. Após 72 horas, foi observado qual dos isolados que apresentou a maior degradação de penas, sendo este o isolado LM-21, proveniente de água de lavagem

de vísceras (Kori). O mesmo foi escolhido como objeto de trabalho. Para reativação do micro-organismo foram realizados repiques sucessivos em meio Williams et al. (1990) a cada 24 horas durante uma semana.

3.2 Identificação molecular por sequenciamento do DNA ribossomal 16S

A identificação do micro-organismo selecionado foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular vinculado ao Centro de Estudos de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Rio Claro. A identificação foi feita pelo sequenciamento do gene que codifica para RNA ribossomal 16S ou parcial, orientada pela doutora Ana Carolina Marchiori.

3.2.1 Extração do DNA genômico pelo método de TNES

O isolado foi inoculado em caldo nutriente (extrato de carne 0,3%, peptona 0,5%) e incubado a 35°C, 150 rpm por 24 horas. Alíquota de dez mililitros da cultura foi centrifugada (10000 rpm por dez minutos), o sobrenadante foi descartado, a biomassa foi ressuspensa em um mililitro de TE pH 8,0 e transferida para microtubos de 1,5 mL, sendo realizada uma nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µL de solução de TNES, seguido por maceração. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução TNES. Toda esta etapa foi realizada em banho de gelo. A amostra foi agitada em vórtex por dez segundos. Foram adicionados 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e novamente a amostra foi agitada em vórtex e então incubada em banho a 55°C por 3 horas. Em seguida, a amostra foi retirada do banho e levada ao gelo e adicionou-se 20 µL da solução de RNase A (4 mg/mL). Agitou-se por inversão (aproximadamente 25 vezes) e a amostra foi incubada em banho a 37°C por 30 minutos, em seguida foi levada ao gelo quando se adicionou 200 µL de solução de precipitação de proteína (NaCl 5 M).

A amostra foi agitada vigorosamente em vórtex por 20 segundos e centrifugada por seis minutos a 15000g para precipitação de proteínas. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo microtubo e adicionou-se 600 µL de isopropanol 100%, agitando suavemente por inversão, centrifugou-se por cinco minutos, 15000g e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 600 µL

de etanol 70% e a amostra foi centrifugada por seis minutos, 15000 g. O sobrenadante foi descartado e após secar, o DNA foi hidratado com 30 µL de TE. A amostra foi levada a geladeira “over night” para ressuspender o DNA. A extração foi visualizada em gel de agarose 1%.

3.2.2 Quantificação de DNA por espectrofotometria

Para a quantificação do DNA foi realizada uma adaptação da metodologia de Azevedo et al. (2003). Para isso, a amostra de DNA foi diluída 500 vezes em TE (dois µL de DNA foram adicionados em 998 µL de TE). O espectrofotômetro foi zerado, colocando-se um mililitro de TE em cubeta de quartzo e a leitura realizada a 260 nm (específico para ácidos nucleicos). Repetiu-se a leitura em 280 nm (específico para proteínas). A pureza foi avaliada por meio da relação A_{260}/A_{280} . O cálculo utilizado foi o descrito abaixo, no qual A_{260} é igual à absorbância obtida na leitura, 0,05 é o valor da constante utilizada para DNA e 500 é o fator de diluição resultado de 1000/2:

$$a) \text{ [DNA] } \mu\text{g}/\mu\text{L} = A_{260} \times 0,05 \times 500$$

3.2.3 Amplificação do fragmento de DNA por Reação em cadeia da polimerase - PCR

Para amplificação do DNA foi utilizado o Kit PURE TAQ READY-TO-GO PCR BEADS (GE Healthcare) com os seguintes Primers:

27 F 5'AGAGTTTGATCA/CTGGCTCAG
1492 R 5' TACGGT/CTACCTTGTTACGACTT

A amplificação foi realizada em termociclador de acordo com o esquema abaixo:

95°C – 5 minutos	
95°C – 1 minuto	} <u>35 Ciclos</u>
50°C – 1 minuto	
72°C – 3 minutos	

A amplificação foi verificada em gel de agarose 1% corada com GelRed™ e visualizada em transluminador.

3.2.4 Purificação do produto de PCR

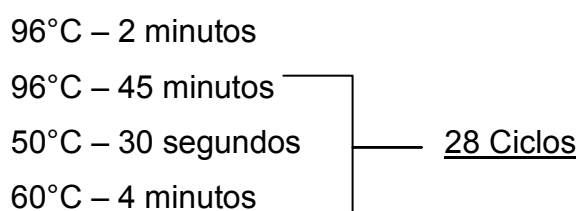
A purificação do produto de PCR foi realizada com o Kit: GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Os amplicons foram submetidos à eletroforese e posteriormente, visualizados em transluminador UV.

3.2.5 Sequenciamento do DNA ribossomal

A reação de sequenciamento conteve os seguintes reagentes:

- a) Água MilliQ;
- b) Big Dye 3.1;
- c) Save Money;
- d) Primer;
- e) DNA.

Após a mistura de todos os reagentes, o tubo foi inserido no termociclador seguindo o programa abaixo:



Ao final do programa foi adicionado um mililitro de solução de EDTA 125 mM ao fundo do tubo com a finalidade de reduzir a quantidade de terminadores não incorporados que precipitam o DNA, deste modo, manchas com potencial para distorcer os dados do sequenciamento, possivelmente, foram eliminadas.

Após este processo adicionou-se um mililitro de solução de acetado de sódio 3 M no tubo, seguido da adição de mais 60 µL de etanol 100%.

Procedeu-se a centrifugação por 25 minutos a 15000g e removeu-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com 170 µL de etanol 70% e centrifugado por mais dez minutos a 15000g.

No momento de aplicar a amostra no sequenciador, foram adicionados mais 10 µL de formamida e a amostra foi inserida no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

3.2.6 Análises dos dados

As sequências *Forward* e *Reverse* foram alinhadas com o programa Bio-Edit. O isolado foi identificado em nível de gênero e espécie pela comparação da sequência obtida com uma sequência conhecida do GenBank, usando a ferramenta BLAST (WANG et al., 2007).

3.3 Obtenção do inóculo e determinação do crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi monitorado pela medida das unidades formadoras de colônia (UFC/mL), como descrito por Silva et al. (2001).

Para obtenção do inóculo, foram utilizados 50 mL de caldo nutriente (0,5% peptona e 0,3% extrato de carne) ao qual foi adicionado um mililitro de estirpe crio-conservada. O pré-inóculo foi incubado a 35°C, 150 rpm durante 17 horas. Nessas condições, o caldo apresentou uma turbidez adequada para comparação com a escala de McFarland (entre 12 a 15 x 10⁸). Em seguida, 1mL do caldo nutriente foi transferido para um frasco contendo 100 mL de meio proposto por Williams et al. (1990) acrescido de penas inteiras. As fermentações foram realizadas de acordo com as condições de cultivo estudadas.

A cada 24 horas de cultivo, alíquotas de um mililitro do meio foram retiradas para diluição em solução salina 0,85%, onde foram realizadas as diluições até 10⁻²⁰, com o plaqueamento realizado em Ágar nutriente. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C e a contagem realizada entre 25 a 250 colônias. Os valores foram expressos em UFC/mL (unidades formadoras de colônia).

3.4 Estudo da influência das condições de cultivo na produção de queratinase e degradação de penas por *Bacillus* sp. LM-21

Com a finalidade de verificar as condições ótimas de cultivo para produção de queratinase e degradação de penas por *Bacillus* sp. LM-21 estudou-se a influência da temperatura, velocidade de agitação e concentração de substrato. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura proposto por Williams et al. (1990) acrescida de penas inteiras, o pH inicial para todas as fermentações foi de 7,4, ressalta-se que as fermentações foram realizadas em triplicata.

As condições de cultivo estudadas foram:

- a) Temperatura (30°C, 35°C e 40°C);
- b) Agitação (100, 150 e 200 rpm);
- c) Porcentagem de substrato/penas inteiras (1%, 2% e 3%).

A avaliação da influência desses parâmetros na fermentação foi realizada por ensaios de atividade queratinolítica, atividade proteolítica, concentração de proteínas e crescimento celular analisados a cada 24 horas e porcentagem de degradação de penas, pH final, analisados ao final do cultivo.

3.5 Determinações analíticas

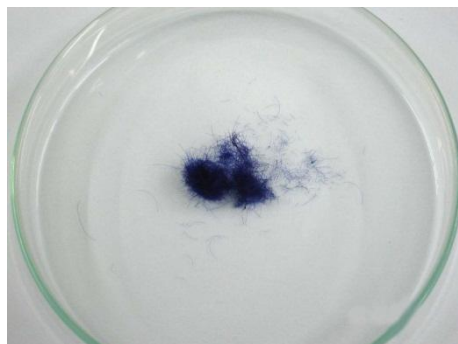
3.5.1 Avaliação da porcentagem de degradação das penas

Para determinação da porcentagem de degradação das penas foi utilizada o método descrito por Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Ao final das fermentações, os caldos foram filtrados em papel de filtro, secos em estufa a 105° C “overnight” e pesados. A porcentagem de degradação das penas foi calculada através da diferença no peso seco residual entre um controle (meio com penas sem inoculo) e amostra tratada.

3.5.2 Atividade queratinolítica

Para a determinação da atividade queratinolítica foi adotado método descrito por Bressollier et al. (1999). A mistura de reação foi composta por 800 μ L da solução enzimática, 3,2 mililitros de uma solução tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,5 acrescida de 0,013g de azoqueratina comercial - Sigma (Figura 1). A mistura foi incubada durante uma hora em velocidade de agitação de 100 rpm a 50°C. Ao final do período de incubação foram adicionados 800 μ L de solução de TCA 10%. A solução foi filtrada em peneira TYLER 200 (0,074mm) e posteriormente, foi determinada a absorbância do sobrenadante à 595 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica corresponde à quantidade de enzima que causa um aumento na absorbância de 0,01 nas condições citadas. Como branco foi utilizado 1,2 mililitro de solução TCA 10%, 1,2 mililitro de solução enzimática e 4,8 mililitro de tampão Tris HCl pH 8,5, acrescida de 0,013 grama de azoqueratina.

Figura 1- Azoqueratina comercial (Sigma).



Fonte: Fotografado por Mariana Cortezi.

3.5.3 Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica foi adotado método modificado de Mc Donald e Chen (1965), em que um mililitro da enzima foi adicionada a quatro mililitros de uma solução contendo caseína 1% em tampão Mcvaine pH 8,0. Esta solução foi incubada durante 20 minutos a 50°C sob velocidade de agitação de 100 rpm. Após incubação, foi retirado um mililitro desta amostra e este foi adicionado a um mililitro de TCA 10%. A amostra permaneceu em repouso por 12 horas a 4°C.

Após este período, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi adicionado a cinco mililitros de uma solução contendo 100 mL de Na_2CO_3 2%, 10 mL de NaOH 10%, um mililitro de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 2,7% e um mililitro de CuSO_4 1%. Após 10 minutos foram adicionados 0,5 mililitros de Folin Ciocautau (1:1). A leitura foi realizada a 700 nm. A unidade de atividade proteolítica foi determinada como a quantidade de protease que libera o equivalente de cor a um micrograma de tirosina/minuto. Para realização do branco o mesmo procedimento foi seguido, sendo que a enzima foi inativada por fervura durante cinco minutos.

3.5.4 Determinação da concentração da proteína

Para determinação da concentração de proteína foi utilizada a metodologia de Lowry et al. (1951), sendo que um mililitro da enzima foi adicionada a cinco mililitros de uma solução contendo 50 mL de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1N, 9,5mL de CuSO_4 1% em água e 0,5mL de tartarato de sódio e potássio 1%. Esta solução permaneceu em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 0,5 mililitros de Folin Cicauteau (1:1) à amostra e após 30 minutos a leitura foi efetuada a 660 nm. A concentração da proteína foi expressa em mg/mL.

3.6 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar os aminoácidos presentes no caldo de cultivo. Para este estudo uma fermentação foi realizada sob condições otimizadas (35°C, 150 rpm e 1% de penas durante 72 horas). Para realização da cromatografia utilizou-se placa de sílica-gel e como fase móvel a mistura: n-butanol/ácido acético/água (4:5:1). O agente revelador utilizado foi a ninidrina 0,2% (p/v) em acetona com adição de 5 gotas de piridina. A amostra consistiu do caldo de fermentação centrifugado, além dos padrões de aminoácidos ácido aspártico, asparagina, cisteína, fenilalanina, ácido glutâmico, histidina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina e tirosina.

3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O micro-organismo *Bacillus* sp. LM-21 foi cultivado em 100 mL de meio de cultura proposto por Williams et al. (1990) contendo 1% de penas inteiras, 2% de inóculo e incubado a 150 rpm, 35°C, pH inicial 7,4.

Para realização da análise microscópica foram retiradas alíquotas com 72 horas de cultivo. A amostra foi pré-fixada em uma solução de glutaraldeído 2,5 (v/v), paraformaldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato 50 mM, pH 7,0 por 24 horas. Em seguida, a amostra foi equilibrada no mesmo tampão e pós-fixada com tetróxido de ósmio (OsO_4) por 1 hora. Após fixação, a amostra foi desidratada com soluções crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV DSM940-A).

3.8 Caracterização do caldo enzimático bruto

3.8.1 Influência do pH sobre a atividade queratinolítica de *Bacillus* sp. LM-21

Para realização deste estudo a fermentação foi realizada utilizando meio Williams et al. (1990), e sob as condições de 35°C, 150 rpm e 1% de penas. A influência do pH na atividade queratinolítica foi analisada utilizando azoqueratina como substrato (Sigma). Os experimentos foram realizados na faixa de pH 4,0 - 10,0; utilizando-se os seguintes tampões: MacIvane (4,0; 5,0 e 6,0), $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ (7,0), Tris HCL (8,5 e 9,0) e Na_2CO_3 HCL (10,0). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa, sendo o valor da atividade realizada a pH 9,0 (melhor resultado) considerada 100%.

3.8.2 Influência da temperatura sobre a atividade queratinolítica de *Bacillus* sp. LM-21

A temperatura ótima para atividade queratinolítica foi determinada pela variação da temperatura de incubação nos intervalos de 30° a 70°C. Os resultados

foram expressos em porcentagem relativa, sendo o valor da atividade realizada a 50°C (melhor resultado) considerada 100%.

3.8.3 Influência de substâncias químicas sobre a atividade queratinolítica de Bacillus sp. LM-21

Para determinar a influência de substâncias químicas sobre a enzima, a solução enzimática foi incubada segundo metodologia modificada descrita por Bressolier et al. (1999) acrescidas com as seguintes substâncias, individualmente: $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; CaCl_2 ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; HgCl_2 ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (5 mM m/v); Triton (0,1% v/v); Tween (0,1% v/v); Dimetilsufóxido (1% v/v); Isopropanol (1% v/v); EDTA (5 mM m/v) e Mercaptoetanol (0,1% v/v). Após o tempo de incubação determinou-se a atividade queratinolítica. As atividades residuais foram expressas em porcentagem relativa, sendo que a enzima incubada isenta de substâncias foi expressa em 100%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação do micro-organismo

A identificação do micro-organismo selecionado foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP – Rio Claro. A identificação foi realizada por sequenciamento do DNA ribossomal 16S.

A figura abaixo (Figura 2) representa a sequência parcial do gene DNA ribossomal 16S obtida a partir de identificação por métodos moleculares da cepa LM-21.

Figura 2 - Sequência parcial DNA ribossomal 16S da amostra LM-21.

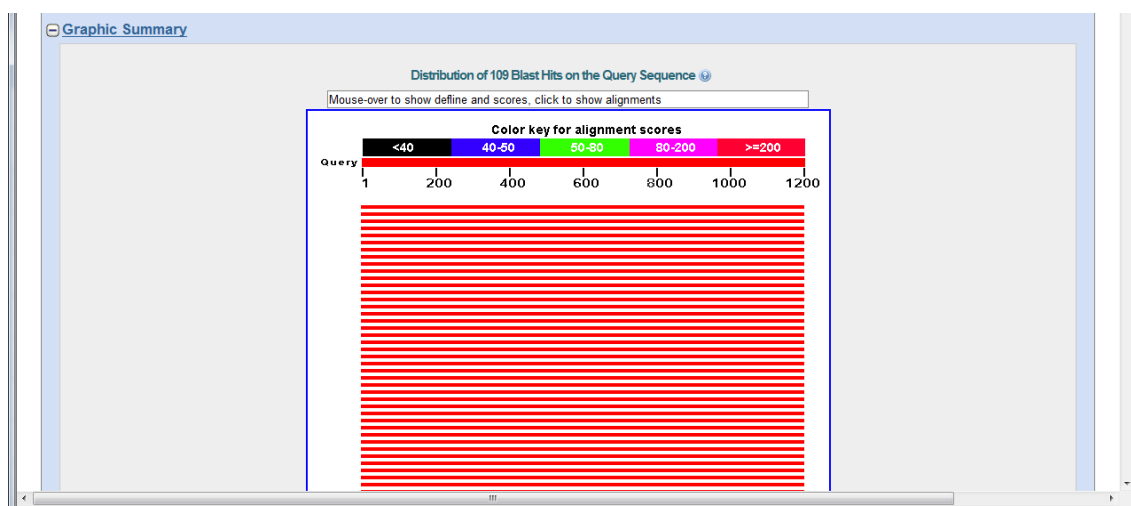
```
GGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAG
ATGGACCCCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGTGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGGCTCGCAGG
GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGT
GCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAA
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAGAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA
AGCACTCCGCCGAGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTT
CGGATCGCAGTCTGCAACTcGAcTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC
```

Fonte: Resultados da pesquisa.

Como pode ser observada a sequência parcial obtida apresentou 1200 pares de bases, contudo, ao ser inserida no banco de dados do NCBI (ZHENG et al., 2000) e *Ribosomal Database Project* (WANG et al., 2007), esta não apresentou uma conclusão objetiva em relação a espécie, sendo apenas identificada em nível de gênero como *Bacillus*.

As figuras 3 e 4 apresentam as imagens obtidas no NCBI (ZHENG et al., 2000) e *Ribosomal Database Project* (WANG et al., 2007) após pesquisa.

Figura 3 - Resultado obtido no NCBI (ZHENG et al., 2000) após inserção da sequência de LM-21.



Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Figura 4 - Resultado obtido no *Ribosomal Database Project* (WANG et al., 2007) após inserção da sequência de LM-21.

Ribosomal	Database	Project:	Release	10	Classifier	::	Assignment	Detail
Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.5, May 2012 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 9 Query File: MegaF_editada.gb Query Submit Date: Tue Jun 12 09:28:05 EDT 2012								
Lineage:								
Root (1); Bacteria (1); Firmicutes (1); Bacilli (1); Bacillales (1); Bacillaceae 1 (1); Bacillus (1)								
Assignment Detail (for Confidence threshold: 80%):								
Root[100%] Bacteria[100%] Firmicutes[100%] Bacilli[100%] Bacillales[100%] Bacillaceae 1[100%] Bacillus[100%]								

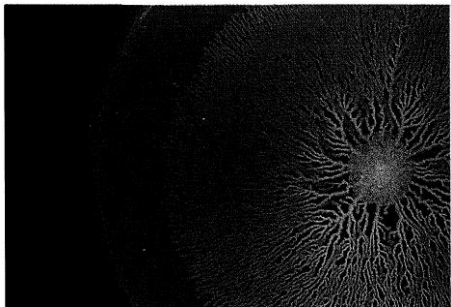
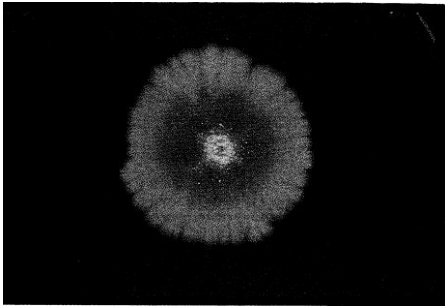
Fonte: *Ribosomal Database Project*.

Ao analisar os resultados obtidos no NCBI (ZHENG et al., 2000), a sequência parcial do gene DNA ribossomal 16S da amostra apresentou 100% de similaridade com sequências do gene DNA ribossomal 16S de várias linhagens de *Bacillus*

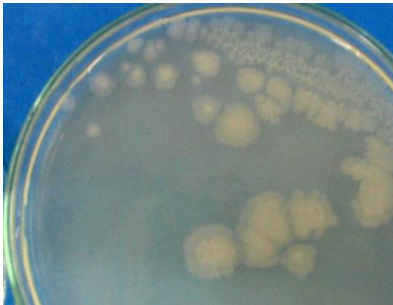
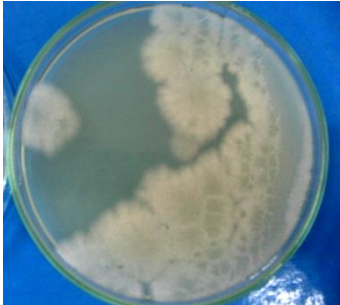
subtilis, sendo o e-value igual a 0.0. Além disso, demonstrou 100% de similaridade com várias linhagens denominadas *Bacillus* sp., também com valor de e-value igual a zero. Outras sequências parciais de cepas distintas foram relacionadas com considerável similaridade, de modo que LM-21 foi, portanto, considerada apenas como *Bacillus* sp. LM-21.

Entretanto, uma análise morfológica da colônia de *Bacillus* sp. LM-21 cultivada em placa de Petri contendo Ágar nutriente durante 24 horas mostrou similaridade morfológica das colônias obtidas com imagens de *Bacillus subtilis* existentes na Literatura. Vide comparação feita na Figura 5 abaixo:

Figura 5 - Comparação entre colônias de *Bacillus subtilis* (Fujikawa e Matsushita, 1989) e *Bacillus* sp. LM-21.

	
Imagem retirada de Fujikawa e Matsushita (1989). Exemplo de colônia de <i>Bacillus subtilis</i> cultivada em Agar nutriente contendo 1 g/L de peptona após 1 dia de incubação. Colônia com 55 mm de diâmetro.	Imagem retirada de Fujikawa e Matsushita (1989). Exemplo de colônia de <i>Bacillus subtilis</i> cultivada em Agar nutriente contendo 15 g/L de peptona após 9 dias de incubação. Colônia com 40 mm de diâmetro.

Fonte: Fujikawa e Matsushita (1989).

	
Imagem de cultura de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 cultivada em Agar nutriente contendo 1g/L de peptona após 1 dia de incubação.	Imagem de cultura de <i>Bacillus</i> sp. LM-21 cultivada em Agar nutriente contendo 15g/L de peptona após 1 dia de incubação.

Fonte: Fotografado pela autora.

4.2 Estudo das condições ótimas de cultivo para a cepa *Bacillus* sp. LM-21

A fim de verificar as melhores condições de cultivo para produção de queratinase por *Bacillus* sp. LM-21, três condições de cultivo foram variadas, sendo, temperatura (30°C, 35°C e 40°C), velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm) e concentração de substrato (1, 2 e 3% de penas inteiras). As faixas de temperatura, velocidade de agitação e concentração de substrato avaliadas, foram previamente determinadas com base na literatura disponível para micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*.

A concentração de inóculo e pH inicial foram mantidos em todas as fermentações, a 2% (v/v) e 7,4, respectivamente. O valor de pH inicial foi determinado baseado em artigos que relatam que micro-organismos do gênero *Bacillus* são produtores de queratinases alcalinas, apresentando maior atividade quando cultivados em condições neutras ou alcalinas (RAI; MUKHERJEE, 2010; MAZZOTO et al., 2010).

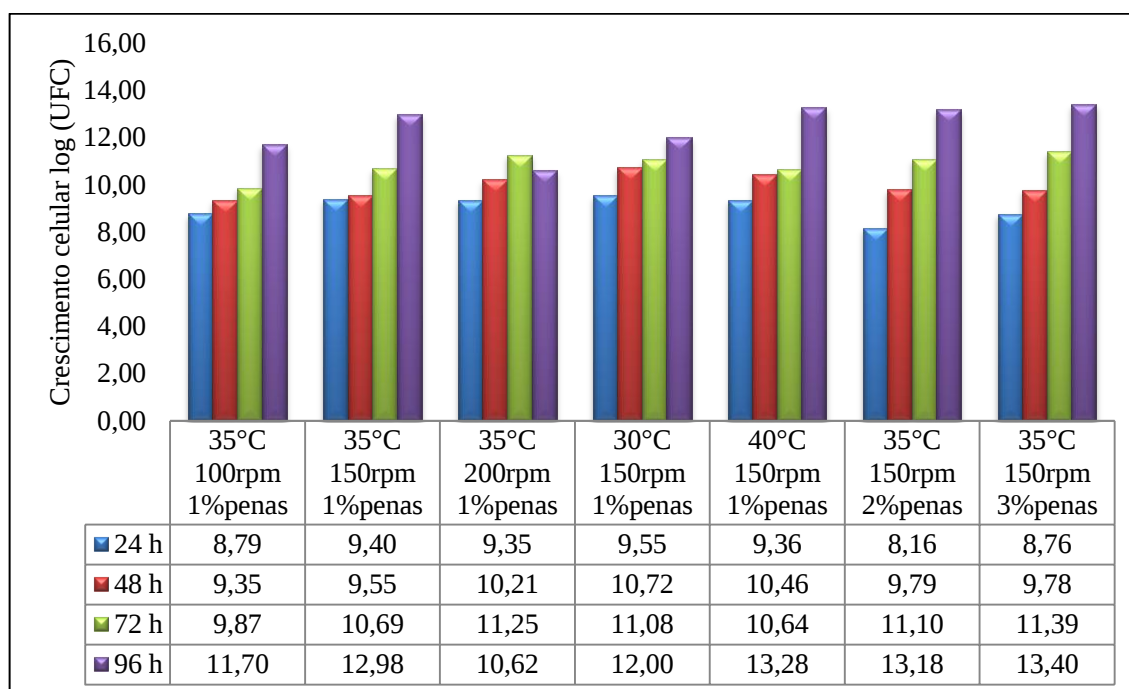
O primeiro parâmetro avaliado foi a influência da velocidade de agitação na produção da enzima por *Bacillus* sp. LM-21. Deste modo, os demais parâmetros (temperatura e concentração de substrato) foram fixados em 35°C e 1% de penas, respectivamente.

Determinada a velocidade de agitação que resultou em maior atividade queratinolítica, esta foi fixada e o segundo parâmetro foi estudado, sendo este, a temperatura (30 e 40°C). Fixada a melhor velocidade de agitação e temperatura, variou-se a concentração de substrato em 2% e 3%.

A princípio será discutida a influência das condições de cultivo no crescimento celular, seguido por porcentagem de degradação de penas e pH final. Posteriormente, serão discutidos os resultados referentes à atividade queratinolítica, atividade proteolítica e concentração de proteínas obtidas a cada 24 horas de cultivo.

A Figura 6, apresenta o gráfico do crescimento celular da cepa *Bacillus* sp. LM-21 obtido para cada uma das sete fermentações realizadas conforme as condições de cultivo estudadas. Cada amostra foi avaliada em triplicata sendo as médias apresentadas.

Figura 6 - Crescimento celular de *Bacillus* sp. LM-21 em função das condições de cultivo estudadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

O maior crescimento microbiano foi obtido quando a fermentação foi realizada sob as condições de 35°C, 150 rpm e 3% de penas, sendo este resultado observado após 96 horas de cultivo (13,40 UFC/mL). No geral, todas as condições estudadas apresentaram um crescimento celular gradual durante as 96 horas de cultivo, a exceção da condição de 35°C, 200 rpm e 1% de penas que apresentou um leve decréscimo no crescimento celular entre 72 e 96 horas (de 11,25 para 10,62 log UFC).

Brandelli e Riffel (2005) estudaram o micro-organismo *Chryseobacterium* sp. kr6 determinando a influência do pH, temperatura inicial e concentração de substrato na produção de queratinase durante o crescimento da estirpe em penas nativas. Os autores constataram que o aumento na concentração de penas resultou em maior crescimento celular.

No presente estudo (fixando 35°C e 150 rpm), maior crescimento celular também foi obtido utilizando as maiores concentrações de penas, 2 e 3%, de modo que foram, respectivamente, iguais a 13,18 e 13,40 log de UFC (após 96 horas de cultivo), enquanto que a 1% de penas o resultado obtido foi de 12,98 log de UFC. Contudo, o crescimento celular a 1% de penas foi maior que as demais

concentrações utilizadas no início dos cultivos (24 horas), sendo este igual a 9,40 log de UFC enquanto que foi de 8,16 e 8,76 log de UFC quando utilizado 2 e 3%, respectivamente.

Park e Son (2009) relataram que altas concentrações de penas podem aumentar a viscosidade do meio de cultivo durante o processo fermentativo e esse fato pode limitar o oxigênio necessário para o crescimento celular. Deste modo, inicialmente, o crescimento celular nas condições de 2 e 3% de penas pode ter sido suprimido pela alta concentração de substrato.

Avaliando-se as três fermentações iniciais onde se variou a velocidade de agitação (100, 150 e 200 rpm), mantendo-se fixa temperatura em 35°C e concentração de substrato em 1%, é possível constatar a influência da velocidade de agitação no crescimento celular. Menor crescimento celular foi inicialmente observado quando menor velocidade de agitação (100 rpm) foi utilizada. Todavia, após 96 horas de cultivo, menor crescimento celular foi observado quando o cultivo foi realizado a 200 rpm. Nesta velocidade de agitação (200 rpm), no entanto, observou-se crescimento celular gradual no intervalo de 24 - 72 horas de cultivo. Maior crescimento celular foi constatado para velocidade de agitação de 150 rpm, sendo este 12,98 log de UFC após 96 horas de cultivo.

Sabe-se que em um processo fermentativo a utilização de uma alta velocidade de agitação pode resultar em efeitos adversos no crescimento microbiano e produção da enzima (Cortezi et al., 2008a), entretanto, Zaghloul et al. (2011) verificaram que quando *Bacillus subtilis* foi cultivado em reator e sob maior velocidade de agitação a estirpe apresentou o mesmo padrão morfológico de quando cultivada em frascos agitados e submetidas a menor velocidade de agitação.

Quando avaliada a influência da temperatura no crescimento celular, nota-se que nenhuma diferença significativa foi observada nas primeiras 48 horas de cultivo para as fermentações que mantiveram fixos os valores de velocidade de agitação (150 rpm) e concentração de substrato (1%). Entretanto, após 96 horas de cultivo, o maior valor de crescimento celular foi observado quando utilizado 40°C, (13,28 log de UFC), enquanto que a 35°C o valor observado foi de 12,98 log de UFC e a 30°C foi de 12 log de UFC. Deste modo, constatou-se neste estudo, que o aumento da temperatura até 40°C favorece o crescimento celular de *Bacillus* sp LM-21.

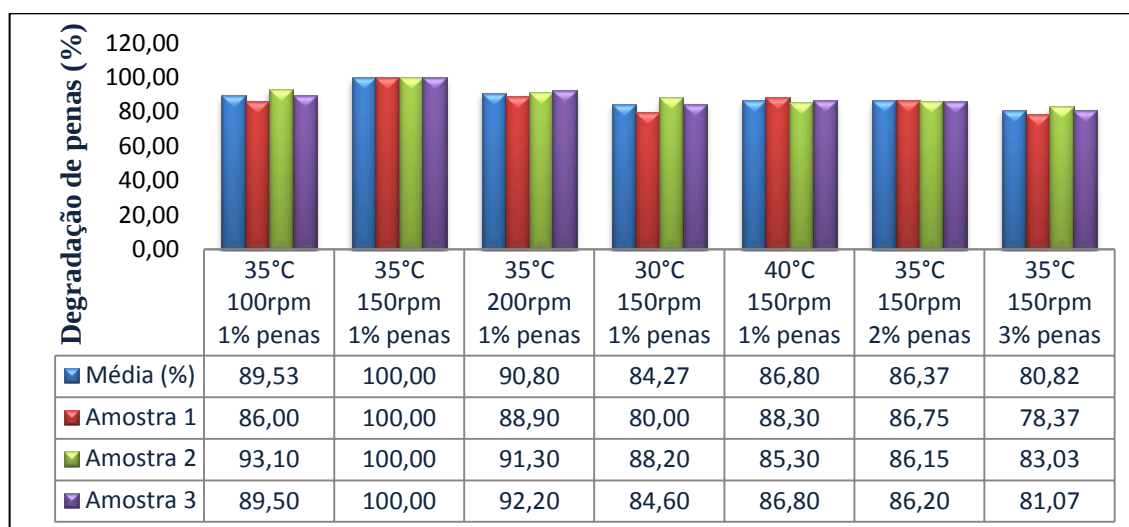
Espécies de *Bacillus* são geralmente mesofílicas e apresentam bom crescimento quando cultivadas em temperaturas entre 30 - 40°C (SUNTORNSUK; SUNTORNSUK, 2003), fato este observado neste estudo.

Segundo Williams et al. (1990), *Bacillus licheniformes* apresentou maior atividade queratinolítica e crescimento celular quando cultivado em temperaturas entre 45 - 50°C, sendo que a 65°C não foi observado crescimento celular. Sagali e Brandelli (2000) estudaram a cepa *Vibrio* sp. isolada de resíduo da indústria avícola. O crescimento microbiano e a capacidade de produzir a queratinase foram investigados pelos autores. O crescimento celular ocorreu em uma faixa de pH 6,0 - 8,0 e temperatura entre 25 - 37°C com um ótimo de pH 6,0 e 30°C. Quando cultivada a 37°, a cepa apresentou menor crescimento microbiano que coincidiu com menor degradação de substrato.

Jeong et al. (2010) isolaram e caracterizaram uma cepa com capacidade queratinolítica e antifúngica identificada como *Bacillus subtilis*. No estudo, os autores avaliaram a influência do pH (4,0 - 10,0) e temperatura (20 - 45°C) no processo fermentativo. Os resultados mostraram que maior crescimento celular foi observado em pH entre 7,0 e 9,5, sendo 7,5 considerado ótimo. Quanto à influência da temperatura, a cepa apresentou capacidade de crescimento em todas as temperaturas avaliadas, exceto a 20°C, sendo 35°C a temperatura considerada ótima. Ressalta-se que as fermentações foram realizadas com velocidade de agitação de 200 rpm e concentração de penas de 0,1% m/v.

A Figura 7 ilustra as porcentagens de degradação de penas obtidas em função das condições de cultivo estudadas. Para fins de discussão, as médias foram calculadas, sendo os valores representados pelas barras azuis.

Figura 7 - Porcentagem final de degradação de penas por *Bacillus* sp. LM-21 em função das condições de cultivo estudadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado na Figura 7 as penas de frango inteiras utilizadas como substrato foram totalmente degradadas quando a cepa foi cultivada a 35°C, 150 rpm e 1% de substrato, sendo que a degradação total ocorreu após 96 horas de cultivo. Nestas condições também foi observada a maior atividade queratinolítica (48,5 U/mL). De forma geral, todas as condições de cultivo estudadas apresentaram degradação de penas maior que 80%, isso mostra que *Bacillus* sp. LM-21 apresenta grande potencial queratinolítico.

Avaliando-se a influência da velocidade de agitação na degradação de penas, 150 rpm foi a velocidade de agitação que apresentou melhor desempenho resultando em uma degradação de penas 1,10 vezes maior que a degradação de penas obtida quando utilizado 200 rpm e 1,17 vezes maior que a degradação de penas obtida quando utilizado 100 rpm. Para 200 e 100 rpm (a 35°C e 1% de penas), obteve-se uma degradação de 90,8 e 89,53% ,respectivamente, enquanto que a 150 rpm a degradação atingida foi de 100%.

A Figura 7 mostra que o cultivo realizado a 35°C resultou em uma porcentagem de degradação de penas 1,15 vezes maior que a obtida a 40°C e 1,18 vezes maior que a obtida a 30°C.

Observou-se uma relação inversamente proporcional entre concentração de substrato utilizado no meio de cultivo e degradação de penas. Deste modo, quando utilizado 1% de penas a degradação das mesmas foi de 100%, já quando utilizado

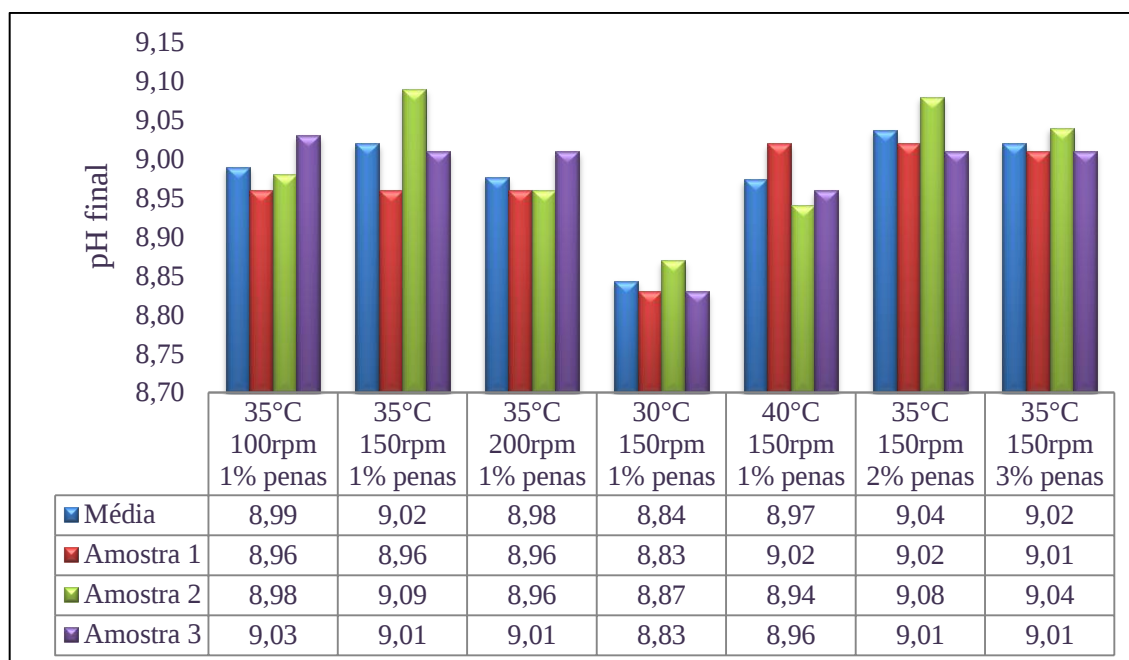
2% de penas a degradação foi de 86,37% e quando utilizado 3% observou-se 80,82% de degradação (para 35°C e 150 rpm).

Jain et al. (2011) avaliaram a degradação de penas por *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 em função da concentração de penas utilizadas no meio de cultivo (0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% - m/v). Neste estudo utilizou-se meio basal acrescido de penas, sendo o cultivo realizado a 150 rpm, 28°C, durante 6 dias. O material resultante da hidrólise foi analisado quanto à presença de aminoácidos e proteínas. O resultado obtido mostrou que a melhor concentração de penas foi 1%, resultando em 2,073 µg/mL proteínas e 2,291 µg/mL de aminoácidos solúveis.

Comparando os resultados obtidos para *Streptomyces exfoliatus* com os resultados obtidos neste estudo com a cepa *Bacillus* sp. LM-21 observa-se que em ambos os estudos a melhor concentração de penas a ser utilizada como substrato foi 1%. A concentração de proteínas obtida a partir do cultivo de LM-21 realizado a 35°C, 150 rpm e 1% de penas foi de 3,032 mg/mL (após 72 horas de cultivo), sendo esta, consideravelmente maior que a apresentada pela cepa estudada por Jain et al. (2011), 2,100±36 µg/mL (após 6 dias de cultivo).

Na Figura abaixo (Figura 8) será apresentado os valores de pH final obtido em função das condições de cultivo estudadas. As médias finais também foram calculadas e estão representadas pelas barras azuis.

Figura 8 - pH final do meio de cultivo em função das condições de cultivo estudadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado, o pH final do meio de cultivo para todas as fermentações realizadas aumentou com o tempo decorrido de fermentação. Esse resultado foi observado por vários autores como Suntornsuk e Suntornsuk (2003), Riffel et al. (2003), Park e Son (2009), Cortezi et al. (2008a), Jeong et al. (2010), Jain et al. (2011), Ghasemi et al. (2012), dentre outros.

A tendência em alcalinizar o meio de cultivo é resultado da produção de amônia por meio da desaminação de peptídeos e aminoácidos originados da degradação da queratina. Além disso, o aumento do pH é típico de micro-organismos que crescem em substratos protéicos (SAGALI; BRANDELLI, 2000; RIFFEL et al., 2003). O potencial de membrana pode desempenhar um importante papel na degradação da queratina pela redução nas ligações dissulfeto nessa proteína (BOCKLE; MULLER, 1997) através da produção de agentes redutores solúveis, tais como sulfato e tiosulfato, que reagem na superfície da queratina e tornam as cadeias da proteína disponíveis para a clivagem por proteases (KUNERT; STRANSKY, 1988).

Maiores valores de pH foram obtidos nas fermentações em que foram utilizadas maiores concentrações de penas (2 e 3%) resultando em pH 9,04 e 9,02, respectivamente, provavelmente devido maior concentração deste substrato. É

observado também maior valor de pH na fermentação realizada a 35°C, 150 rpm e 1% de penas, sendo este igual a pH 9,02. Este fato pode ser explicado pela maior atividade queratinolítica apresentada nesta condição (48,5 U/mL) que deve ter propiciado maior desaminação de substrato.

A seguir serão discutidos os resultados referentes à atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas, obtidos em função das condições de cultivo estudadas.

Como mencionado anteriormente, os experimentos foram realizados em triplicata, sendo calculadas as médias das mesmas e os desvios padrão como ilustram os gráficos a seguir. Observa-se que alguns dos desvios padrão obtidos nos ensaios de atividade queratinolítica foram altos, o que pode ser explicado pelo uso do substrato comercial azoqueratina da empresa Sigma, já que este não apresenta uniformidade em relação à coloração. Ressalta-se que as análises foram realizadas em triplicata, visando-se minimizar erros de análise.

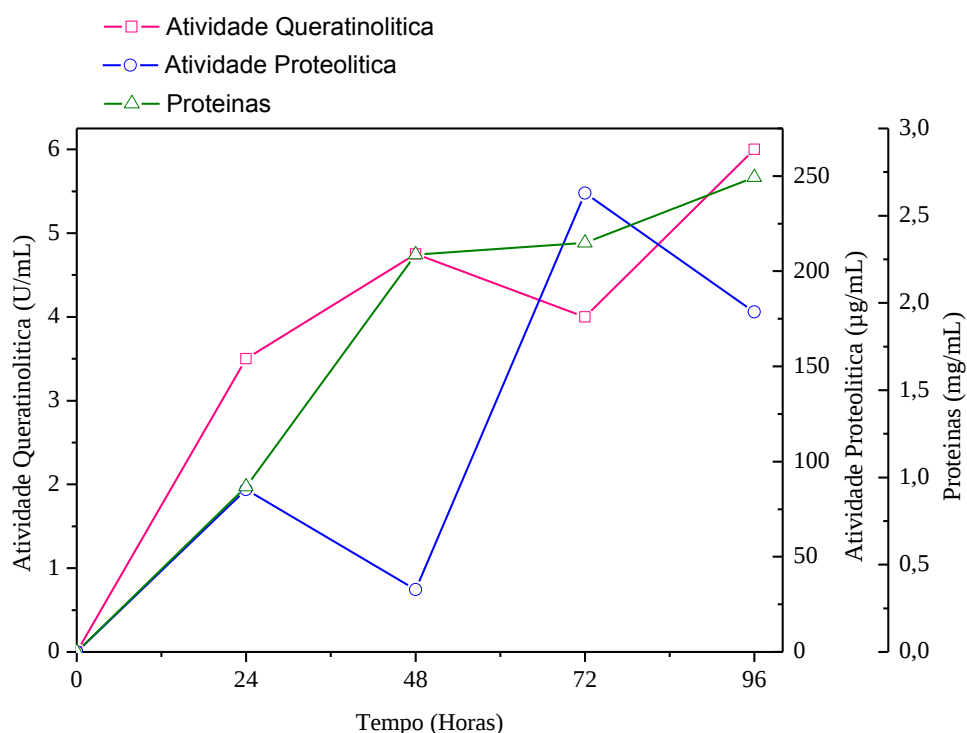
Como observado na Tabela 1 e na Figura 9, quando o cultivo foi realizado sob as condições de 35°C, 100 rpm e 1% penas maior atividade queratinolítica e proteolítica foram obtidas com 96 e 72 horas de cultivo, sendo estas respectivamente, 6,00 U/mL e 241,04 µg/mL. A concentração de proteínas foi crescente durante as 96 horas de cultivo, passando de 0,95 mg/mL com 24 horas para 2,72 mg/mL com 96 horas.

Tabela 1 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 100 rpm e 1% penas).

Fermentação: 35°C 100 rpm 1% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
24	3,50	0,43	85,34	19,58	0,95	0,190
48	4,75	1,73	32,77	2,19	2,28	0,060
72	4,00	0,43	241,04	41,35	2,35	0,150
96	6,00	2,60	178,58	36,04	2,72	0,190

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 100rpm e 1% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 2 e a Figura 10 (abaixo) apresentam os resultados obtidos quando *Bacillus* sp. LM-21 foi cultivado sob as condições de 35°C, 150 rpm e 1% de penas. Nota-se que maior atividade queratinolítica foi obtida após 72 horas de cultivo (48,50 U/mL), resultado superior ao observado quando a cepa LM-21 foi cultivada em menor velocidade de agitação, 6,0 U/mL (100 rpm) mostrado na Figura 9 e tabela 1. A atividade proteolítica mostrou-se crescente durante as 96 horas de cultivo, resultando em 346,24 µg/mL após 96 horas, sendo o resultado superior ao obtido para a fermentação realizada a 35°C, 100 rpm e 1% penas (241,04 µg/mL após 72 horas).

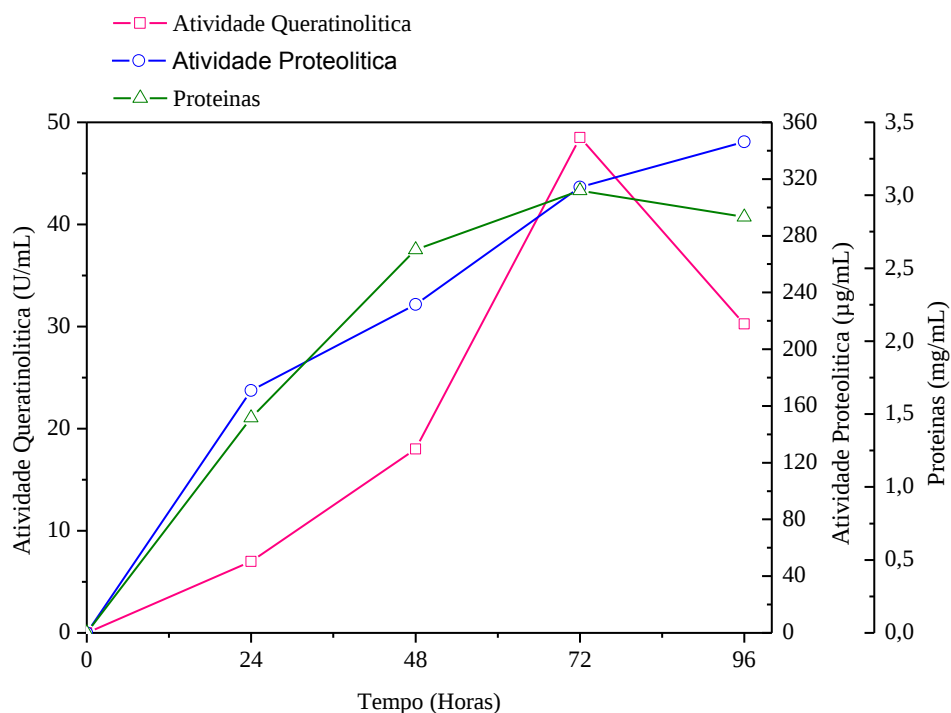
Observa-se que a concentração de proteínas aumentou até 72 horas de cultivo, apresentando um valor de 3,03 mg/mL mas, proporcionou uma pequena queda após 96 horas (2,851 mg/mL).

Tabela 2 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 1% penas).

Fermentação: 35°C 150rpm 1% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
24	7,00	3,00	170,92	44,95	1,48	0,002
48	18,00	3,00	231,67	5,14	2,63	0,170
72	48,50	13,92	314,36	5,50	3,03	0,033
96	30,25	6,38	346,24	11,25	2,85	0,231

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 10 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 1% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

Como visto na Tabela 3 e Figura 11, quando a cepa foi cultivada sob maior velocidade de agitação (200 rpm) obteve-se 20 U/mL em 96 horas de cultivo, já o cultivo realizado a 150 rpm resultou em maior atividade queratinolítica (48,5 U/mL em 72 horas). Quando utilizado 150 rpm a atividade foi também superior a obtida quando utilizado 100 rpm (6,0 U/mL em 96 horas). Portanto pode-se inferir que a

velocidade de agitação de 150 rpm foi considerada a melhor dentre as estudadas para *Bacillus* sp. LM-21.

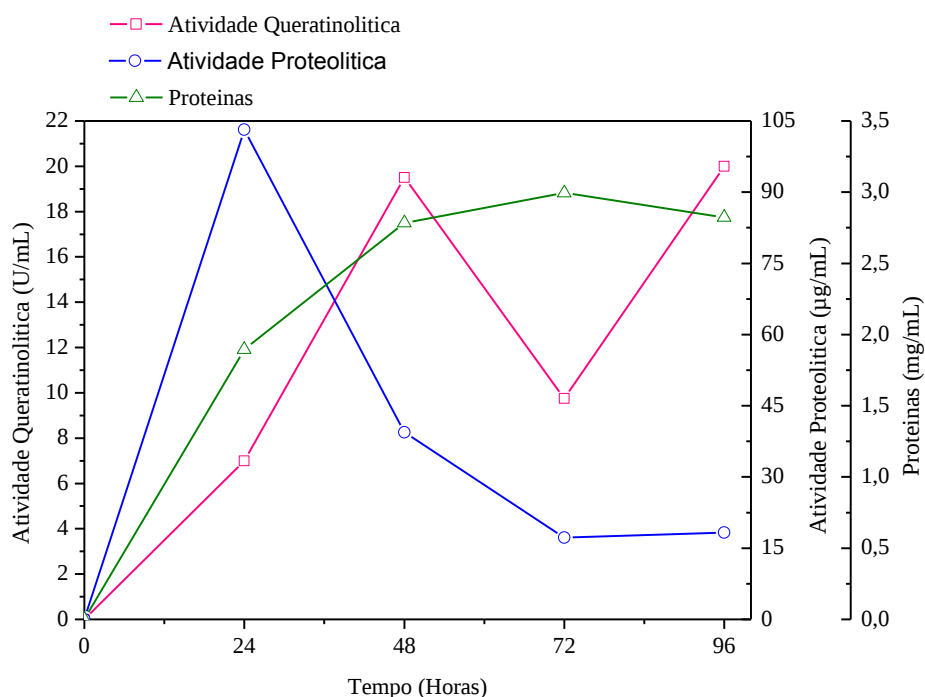
A 200 rpm a atividade proteolítica apresentou queda com o decorrer da fermentação, passando de 103,2 µg/mL (após 24 horas) para 17,22 µg/mL (após 72 horas de cultivo). A maior concentração de proteínas observada foi de 3,00 mg/mL (após 72 horas) ocorrendo uma queda para 2,82 mg/mL após 96 horas de cultivo.

Tabela 3 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 200rpm e 1% penas).

Fermentação: 35°C 200rpm 1% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
24	7,00	0,43	103,20	16,69	1,90	0,064
48	19,50	3,27	39,41	18,72	2,79	0,111
72	9,75	3,27	17,22	4,52	3,00	0,044
96	20,00	2,29	18,26	0,93	2,82	0,031

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 11 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 200 rpm e 1% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos nas três fermentações realizadas e descritas acima, observou-se que o cultivo realizado a 150 rpm resultou em maior atividade queratinolítica, portanto, esta velocidade de agitação foi fixada e variou-se a temperatura. Ressalta-se que o cultivo realizado com esta velocidade de agitação resultou também em maior degradação de penas (100%) como mostra a Figura 7.

A influência da velocidade de agitação na produção da enzima queratinase por diversos micro-organismos tem sido estudada em especial para o gênero *Bacillus* (Cortezi et al., 2008a).

Resultado similar ao obtido neste estudo foi observado por Cortezi et al. (2008a), no qual a autora estudou a influência das condições de cultivo para produção de queratinase pela cepa *Bacillus amyloliquefaciens*. As velocidades de agitação utilizadas foram 100, 150 e 200 rpm. A autora relatou que para *B. amyloliquefaciens*, 150 rpm foi a velocidade de agitação que resultou em maior atividade queratinolítica (210 U/mL). Segundo a autora maior velocidade de agitação pode promover maior oxigenação o que pode inibir a produção da enzima. Note, tanto no presente estudo quanto no estudo realizado por Cortezi et al. (2008a) a melhor velocidade de agitação foi 150 rpm. No estudo realizado por Cortezi et al. (2008a), a velocidade de agitação de 200 rpm obteve menor atividade queratinolítica (41,6 U/mL) que a velocidade de agitação de 100 rpm (67,15 U/mL). Contudo no presente estudo, a 200 rpm a produção de enzima foi maior (20 U/mL) que a 100 rpm (6,00 U/mL), de modo que a oxigenação do meio pode, até um limite, ser favorável para *Bacillus* sp. LM-21, visto que a 150 rpm a atividade queratinolítica obtida foi superior (48,5 U/mL). Por outro lado, Suntornsuk e Suntornsuk (2003) realizaram um estudo com a cepa *Bacillus* sp. FK 46 cultivada em meio de cultivo contendo 1% de penas, pH 9,0; 5% de inóculo, temperatura de 37°C e velocidade de agitação de 250 rpm. Nestas condições a atividade queratinolítica foi de 0,9 U/mL. Segundo estes pesquisadores uma maior velocidade de agitação (200-250 rpm) pode promover maior taxa de transferência de oxigênio e melhor mistura entre as células e o substrato, resultando em maior degradação, o que não ocorre quando utilizado uma velocidade de agitação de 100 rpm.

Sales et al. (2008) estudaram a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM 1546 utilizando planejamento fatorial completo 2³. Neste estudo foram avaliadas as variáveis velocidade de agitação, concentração de penas e tempo de cultivo. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor condição de

cultivo para a produção de queratinase por *A. carbonarius* foi 120 rpm, 0,5% de penas e 7 dias de cultivo resultando em 48,9 U/mL. Ressalta-se que a variável que mais influenciou na produção de queratinase foi a interação entre agitação e concentração de penas, indicando relação diretamente proporcional entre essas duas variáveis.

Os resultados seguintes mostram como a variação de temperatura influenciou a produção de queratinase por *Bacillus* sp. LM-21. Sabe-se que a temperatura de incubação pode afetar profundamente o rendimento e duração da fase de síntese de enzimas (Yamamura, 2002).

Como mostra a Tabela 4 e Figura 12, a temperatura de cultivo influenciou a produção de queratinase por *Bacillus* sp. LM-21, sendo que a 30°C a maior atividade queratinolítica observada foi 7 U/mL com 72 horas. Atividade superior (48,5 U/mL) foi obtida quando o cultivo foi realizado com a mesma velocidade de agitação e porcentagem de penas, porém a 35°C.

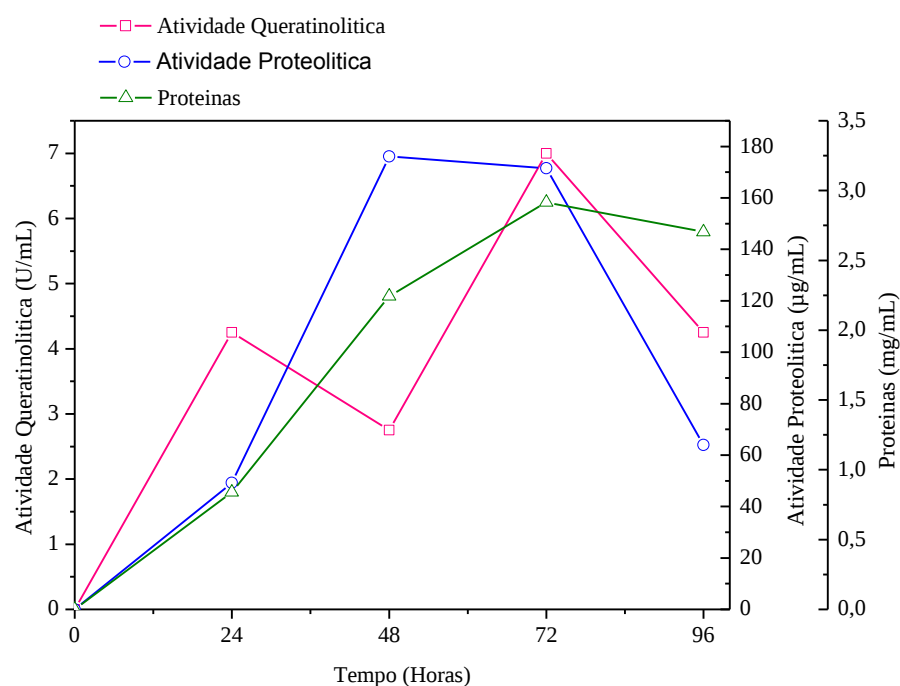
A maior atividade proteolítica, 176,13 µg/mL foi obtida após 48 horas de cultivo que apresentou, posteriormente, decréscimo chegando a 63,92 µg/mL após 96 horas de cultivo. A maior concentração de proteínas (2,92 mg/mL) foi observada com 72 horas de cultivo, apresentando queda (2,7 mg/mL) com 96 horas.

Tabela 4 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (30°C, 150rpm e 1% penas).

Fermentação: 30°C 150rpm 1% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio padrão
24	4,25	0,87	49,21	12,80	0,84	0,021
48	2,75	0,43	176,13	27,94	2,24	0,006
72	7,00	1,15	171,58	13,97	2,92	0,028
96	4,25	0,43	63,92	5,79	2,70	0,387

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 12 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (30°C, 150 rpm e 1% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando utilizada a temperatura de 40°C, como ilustra a tabela 5 e a Figura 13, a maior atividade queratinolítica foi obtida com 48 horas de cultivo, sendo esta de 12,75 U/mL, este resultado permite definir que a melhor temperatura dentre as estudadas para produção de queratinase por *Bacillus* sp. LM-21 é 35°C.

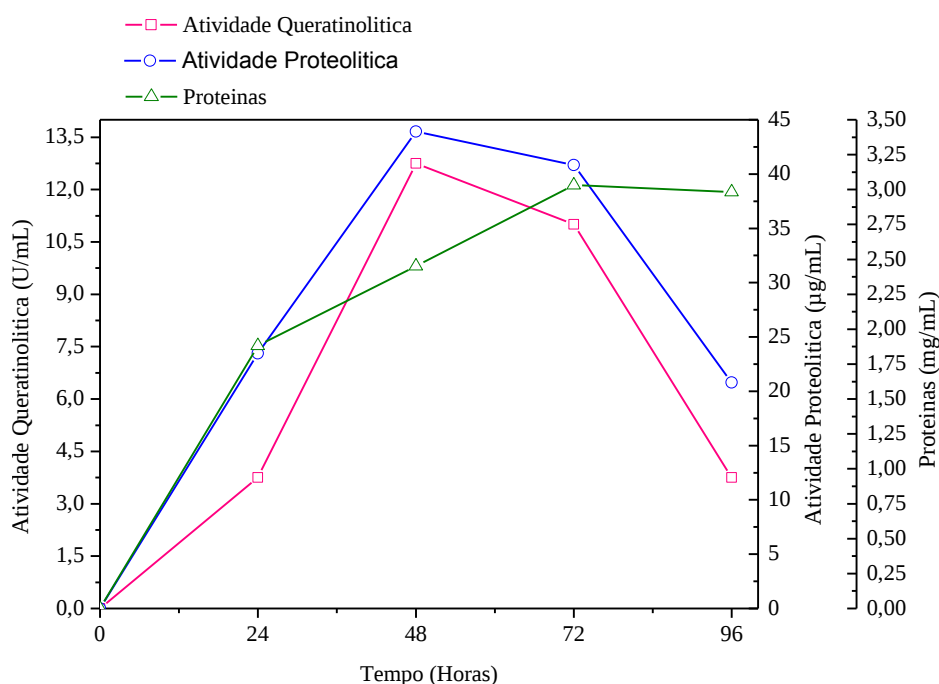
Observa-se que maior atividade proteolítica foi também, obtida após 48 horas de fermentação (43,92 µg/mL), sofrendo decréscimo com 96 horas (20,82 µg/mL). A maior concentração de proteínas foi observada com 72 horas de cultivo, sendo de 3,03 mg/mL, diminuindo com 96 horas (2,98 mg/mL).

Tabela 5 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (40°C, 150rpm e 1% penas).

Fermentação: 40°C 150rpm 1% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio padrão
24	3,75	0,75	23,48	11,51	1,88	0,072
48	12,75	3,75	43,92	9,92	2,45	0,176
72	11,00	2,29	40,82	1,90	3,03	0,011
96	3,75	0,75	20,82	6,50	2,98	0,543

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 13 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (40°C, 150 rpm e 1% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

Deste modo, fixando-se os valores de velocidade de agitação e concentração de substrato, foi possível inferir que para *Bacillus* sp. LM-21 a melhor temperatura dentre as estudadas para produção de queratinase é 35°C, resultando em 48,5 U/mL (72 horas de cultivo), enquanto que os cultivos realizados a 30 e 40°C, apresentaram, respectivamente, 7,00 e 12,75 U/mL em 72 e 48 horas. Segundo Cortezi et al. (2008a), um aumento da temperatura pode provocar a inativação

gradativa da enzima, até sua inativação total, fato este causado pela desnaturação das proteínas devido ao calor. Assim, a ausência de enzimas para promover a hidrólise do substrato acarretará em ausência de degradação.

Vários estudos reportaram o comportamento de micro-organismos queratinolíticos em função da temperatura de cultivo. Lin et al. (1992) relataram que temperaturas entre 40 e 45°C foram consideradas ótimas para produção de queratinase por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus brevis*, respectivamente.

Sagali e Brandelli (2000) em seu estudo com a estirpe *Vibrio* sp. relataram que maior produção de queratinase foi observada a 30°C, resultado contrastante ao obtido neste estudo.

Kim et al. (2001) estudaram a influência da temperatura na produção de queratinase por 3 cepas, sendo elas *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. pumilis*. Os resultados mostraram que as temperaturas consideradas ótimas foram determinadas como 40, 30 e 40°C, respectivamente.

Cai et al. (2008) estudando a produção de queratinase pela cepa mutante KD-N2 de *Bacillus subtilis* obtiveram um resultado contrastante quanto a melhor temperatura para produção de queratinase que o encontrado para maioria dos *Bacillus*. Neste estudo, a faixa de temperatura foi variada de 18 - 42°C e a cepa apresentou um ótimo de produção de queratinase a 23°C. Os autores reportaram que à medida que a temperatura de cultivo aumentou de 18 para 42°C, a produção de queratinase diminuiu rapidamente.

Park e Son (2009) estudaram a influência da temperatura de cultivo (10 - 45°C) na produção de queratinase e degradação de penas por *Bacillus megaterium* F7-1. Os autores relataram que alta atividade queratinolítica foi obtida quando a estirpe foi cultivada entre 25 e 35°C com máxima produção de queratinase a 30°C. Não houve produção de queratinase nos cultivos realizados a 10 e 45°C, segundo os autores, isso ocorreu porque nestas temperaturas a estirpe não foi capaz de crescer.

No estudo de Jeong et al. (2010) com *Bacillus subtilis*, maior produção de queratinase foi observada nos cultivos realizados entre 25 e 35°C, sendo 30°C a temperatura considerada ótima para produção, resultando em uma atividade queratinolítica de 44,5 U/mL. Ressalta-se que as fermentações foram realizadas com velocidade de agitação de 200 rpm e concentração de penas de 0,1% m/v.

O estudo da influência da temperatura na produção de queratinase por *Bacillus* sp. MKR5 foi realizado por Ghasemi et al. (2012). A estirpe foi cultivada em frascos contendo meio basal (pH 8,0) acrescidos de penas e cultivados em diferentes temperaturas 25, 30, 37, 40 e 45°C durante 48 horas. Dentre estas temperaturas a que resultou em maior atividade queratinolítica foi 40°C, sendo observada completa degradação das penas utilizadas como substrato.

Sahoo et al. (2012) realizaram um estudo com a cepa *B. weihenstephanensis* PKD-5 cujo objetivo foi otimizar as condições de cultivo para produção de queratinase. Os resultados obtidos neste estudo diferem dos resultados encontrados neste trabalho com *Bacillus* sp. LM-21. Segundo os autores, a temperatura de incubação ótima que resultou na máxima produção de queratinase por *Bacillus weihenstephanensis* PKD-5 foi 40°C (10,93U/mL), enquanto que no presente estudo para *Bacillus* sp. LM-21 foi 35°C (48,5 U/mL).

Os resultados obtidos quando a cepa foi cultivada a 35°C, 150 rpm e 2% de penas estão apresentados na Tabela 6 e Figura 14. Como pode ser observada, nestas condições, a maior atividade queratinolítica foi obtida após 48 horas de cultivo, sendo de 11,25 U/mL.

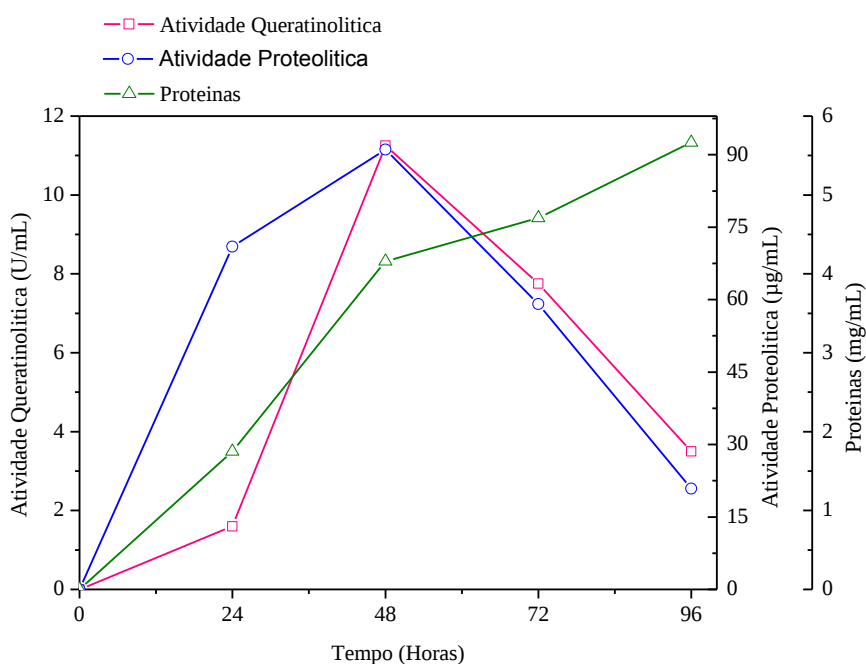
Da mesma forma, a maior atividade proteolítica também foi relatada com 48 horas de cultivo, 91,04 µg/mL. Após as 48 horas de cultivo a atividade proteolítica diminuiu, atingindo 20,88 µg/mL com 96 horas. Quanto a concentração de proteínas, esta foi alta e crescente, atingindo o valor de 5,67 mg/mL após 96 horas de cultivo. Ressalta-se que a concentração de proteínas observada é, consideravelmente, maior que as observadas nas demais fermentações para LM-21 discutidas anteriormente.

Tabela 6 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 2% penas).

Fermentação: 35°C 150rpm 2% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
24	1,60	0,29	70,97	3,14	1,75	0,229
48	11,25	1,50	91,04	4,50	4,16	0,285
72	7,75	1,56	59,06	23,07	4,71	0,339
96	3,50	1,15	20,88	5,96	5,67	0,372

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 14 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 2% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado na Tabela 7 e na Figura 15 a utilização de 3% de penas proporcionou a maior atividade queratinolítica após 72 horas de cultivo, 21 U/mL, apresentando, posteriormente, uma queda (6,75 U/mL após 96 horas de cultivo). Comparado com as fermentações anteriores em que as concentrações de substrato foram variadas em 1 e 2% (mantendo fixa velocidade de agitação e temperatura), a concentração de 3% de penas resultou em atividade queratinolítica superior a obtida

com 2% de penas (11,25 U/mL em 48 horas), porém foi, consideravelmente, menor que aquela observada quando o cultivo foi realizado a concentração de 1% de penas (48,5 U/mL em 72 horas). Este fato evidencia que para o cultivo de *Bacillus* sp. LM-21, a melhor concentração de substrato a ser utilizada para produção de queratinase é 1%.

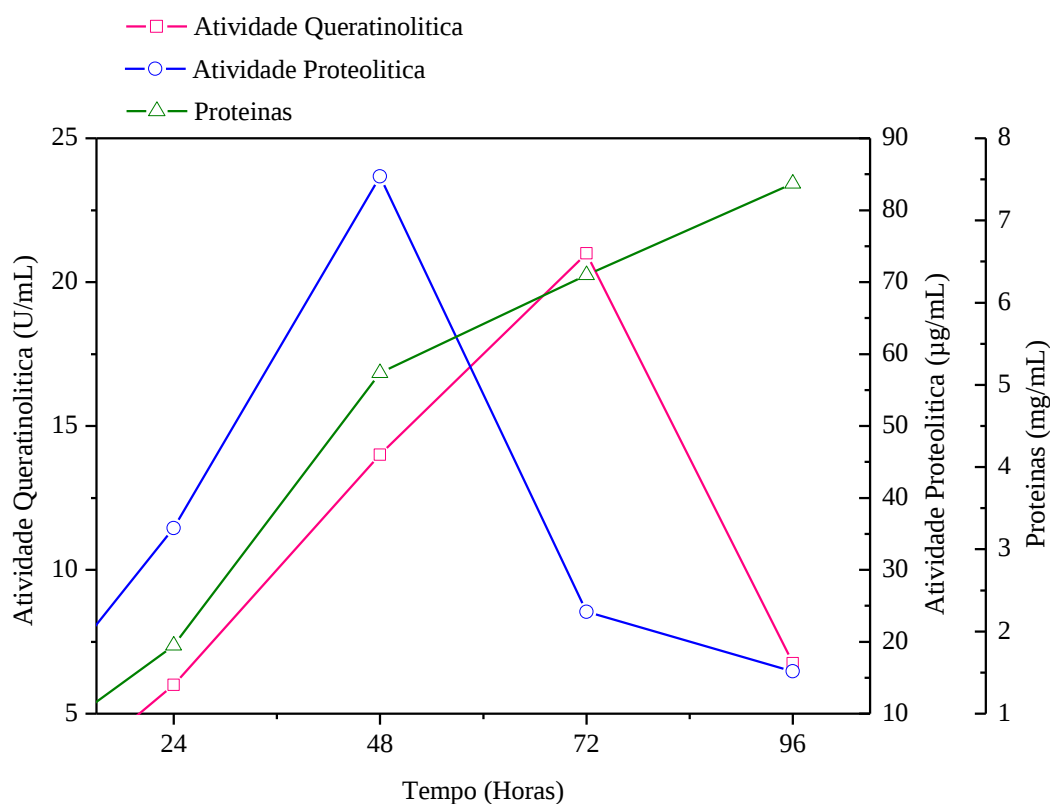
A maior atividade proteolítica obtida foi observada após 48 horas de cultivo, sendo esta 84,69 µg/mL. A adição de maior porcentagem de substrato resultou na maior concentração de proteínas reportada em todo o estudo, 7,45 mg/mL após 96 horas, sendo esta concentração crescente no decorrer de toda a fermentação.

Tabela 7 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150rpm e 3% penas).

Fermentação: 35°C 150rpm 3% penas						
Tempo (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)		Atividade Proteolítica (µg/mL)		Proteínas (mg/mL)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
24	6,00	1,50	35,81	6,91	1,83	0,358
48	14,00	1,89	84,69	8,23	5,14	0,539
72	21,00	1,98	24,17	8,64	6,34	0,149
96	6,75	0,75	15,91	4,43	7,45	0,113

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 15 - Atividade queratinolítica, proteolítica e concentração de proteínas obtidas em função da condição de cultivo (35°C, 150 rpm e 3% penas).



Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a 1% de penas a cepa *Bacillus* sp. LM-21 mostrou-se mais eficaz na produção de enzima queratinase quando comparada com as fermentações realizadas a 2 e 3%, devido a maior atividade queratinolítica observada (48,5 U/mL).

Cai et al. (2008) estudando a produção de queratinase pela cepa mutante KD-N2 de *Bacillus subtilis* verificaram que a melhor concentração de penas a ser utilizada no meio de cultivo, neste caso, foi também de 1%. As concentrações estudadas incluíram 0,1; 0,5; 1; 1,5 e 2% (m/v) de penas, de modo que na concentração de 1% ocorreu a maior atividade queratinolítica (70,4 U/mL), sendo esta atividade diminuída para valores de concentração superiores ou inferiores à 1%.

Outros estudos foram realizados com uma grande gama de micro-organismos avaliando a influência da concentração de substrato na produção de enzima queratinase. Cheng et al. (1995) relataram que a concentração de 1% (m/v) de penas resultou em maior atividade queratinolítica no cultivo de *Bacillus licheniformis*.

PWD-1. Segundo os autores o aumento da concentração de substrato pode causar um aumento na viscosidade do meio gerando falta de oxigênio para o crescimento celular e conseqüentemente, queda na produção de queratinase. Suntornsuk e Suntornsuk (2003) também relataram resultados semelhantes para *Bacillus* sp. FK46, demonstrando que concentrações mais elevadas (3% e 5%) causaram inibição e repressão da produção de queratinase.

Anbu et al. (2007) estudaram a produção de queratinase em meio de cultura contendo diferentes concentrações de penas (0,2 - 3,8% m/v), sendo que maior produção foi obtida quando utilizado 1,5% de penas. Sahoo et al. (2012) estudando *Bacillus weihenstephanensis* PKD-5 relataram que com o aumento da concentração de substrato (1,5% para 2%) ocorreu queda na produção de queratinase.

Park e Son (2009) estudaram a cepa *Bacillus megaterium* F7-1 e reportaram que a concentração de penas exerceu influência na produção de queratinase. No estudo, os autores variaram as concentrações entre 0 a 2,0% (m/v), sendo o cultivo realizado a 30°C, 200 rpm e pH inicial 7,5. Segundo os autores, a produção de queratinase aumentou com o aumento da concentração de penas de 0,1 a 1,6% (m/v), entretanto, a utilização de 1,8% (m/v) de penas resultou em diminuição da produção de queratinase. Sendo assim, a maior produção de queratinase foi observada a 1,6% (m/v), alcançando 690 U/mL. Observou-se que a porcentagem de degradação de penas foi inversamente proporcional à concentração de penas utilizada no meio de cultivo.

Jain et al. (2011) avaliaram a degradação de penas por *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 em função da concentração de penas utilizadas no meio de cultivo (0,5; 1,0; 1,5; e 2,0% - m/v). Neste estudo utilizou-se meio basal acrescido de penas nas concentrações estudadas, o cultivo foi realizado a 150 rpm durante 6 dias. O material resultante da hidrólise foi analisado quanto à presença de aminoácidos e proteínas. O resultado obtido mostrou que a melhor concentração de penas foi também 1%, resultando em 2,073 µg/mL proteínas e 2,291 µg/mL de aminoácidos solúveis.

Ni et al. (2011) estudando a produção de queratinase por *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 constataram que a produção de queratinase foi dependente da concentração inicial de penas, de modo que 2% foi a concentração considerada ideal para produção de queratinase (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5% - m/v), sendo esse resultado contrastante com obtido no presente estudo. A produção de

queratinase quando utilizado 0,5% de penas foi cerca de 7 vezes menor que a queratinase produzida a 2% de penas. Contudo, a 2,5% de penas os autores reportaram repressão da queratinase pelo substrato.

Considerando as condições de cultivo estudadas, a maior atividade queratinolítica foi reportada quando a cepa foi cultivada a 35°C, 150 rpm e 1% de penas, (48,5 U/mL após 72 horas de cultivo), esses parâmetros portanto, foram considerados ótimos para produção de queratinase por *Bacillus* sp. LM-21.

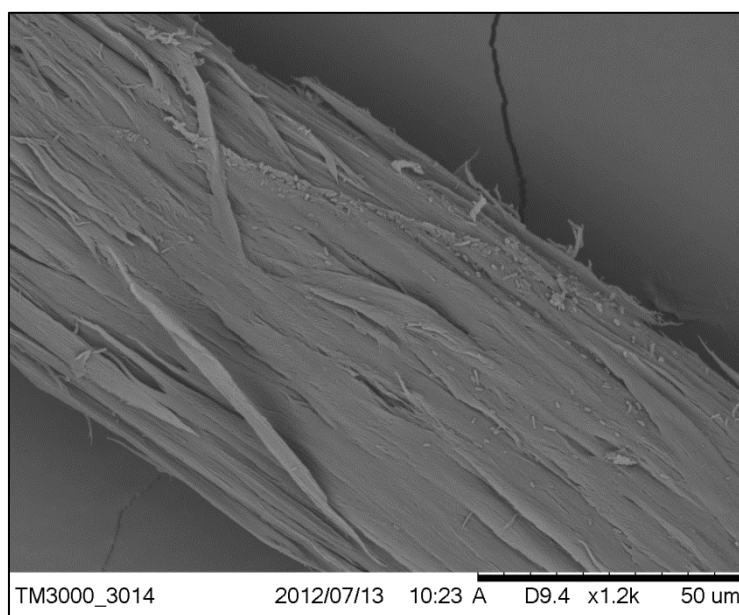
No estudo realizado por Chitte et al. (1999) maior atividade queratinolítica foi observada após 22 horas no cultivo realizado com a cepa *Streptomyces thermoviolaceus* SD8, já *Bacillus cereus* apresentou a maior atividade queratinolítica após 60 horas de incubação (KIM et al., 2001). *Bacillus pumilus* e *Bacillus* sp. SCB-3 apresentaram maior atividade queratinolítica após 72 horas (KIM et al., 2001; LEE et al., 2002), *Bacillus* sp. Fk46 e *Dermatophilus congolensis* apresentaram maior atividade após 12 e 14 dias, respectivamente (NITISINPRASERT et al., 1999; SUNTORNSUK; SUNTORNSUK, 2003).

A determinação de atividade queratinolítica a partir do cultivo de diferentes micro-organismos é de difícil comparação por apresentar diferentes métodos de ensaio com diferentes substratos (GUPTA; RAMNANI, 2006; SON et al., 2008). Contudo, considerando o gênero *Bacillus* é possível observar variação nos resultados. No presente estudo, a maior atividade queratinolítica observada foi de 48,5 U/mL, já para *B. subtilis*, *B. pumilis* e *B. cereus* as maiores atividades queratinolíticas foram de, respectivamente, 161, 149, 117 U/mL (KIM et al., 2001). *Bacillus megaterium* F7-1 apresentou atividade queratinolítica de 58 U/mL (PARK; SON, 2009), enquanto que *Bacillus cereus* LAU 08 apresentou maior atividade queratinolítica de 51,7 U/mL (LATEEF et al., 2010) e *Bacillus subtilis* apresentou uma atividade queratinolítica de 53,3 U/mL (JEONG et al., 2010). Já *Bacillus* sp. MKR5 exibiu alta atividade queratinolítica, 225 U/mL (GHASEMI et al., 2012).

Alta atividade queratinolítica resulta em boa degradação de penas. A adesão bacteriana pode desempenhar papel chave durante o processo de degradação, provavelmente porque fornece condições de redução adequadas para promoção da quebra das pontes dissulfeto no substrato queratinoso (RIFFEL et al., 2011). Deste modo, realizou-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra de *Bacillus* sp. LM-21 cultivado a 35°C, 150 rpm, 1% de penas durante 72 horas, a fim de avaliar o potencial do micro-organismo em aderir ao substrato. As Figuras de 16

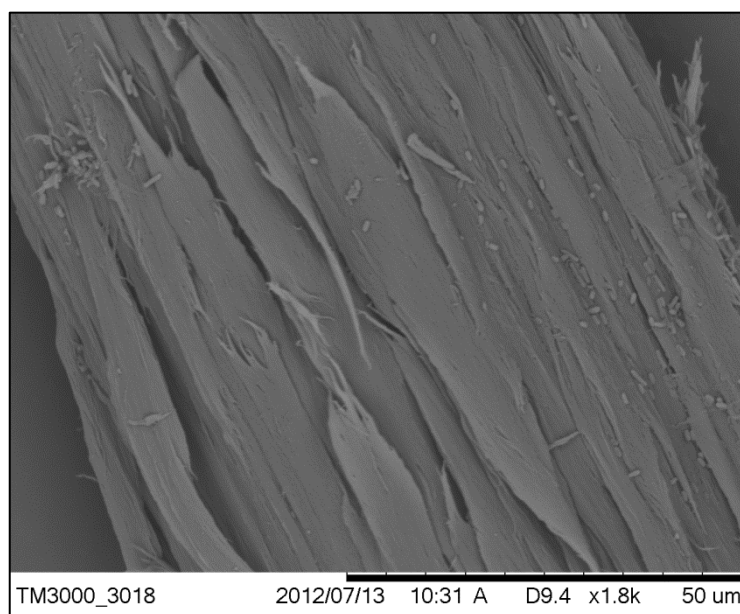
a 20 ilustram a adesão de *Bacillus* sp. LM-21 as penas, mostrando alta colonização da cepa após 72 horas.

Figura 16 - MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus* sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 1200 x.



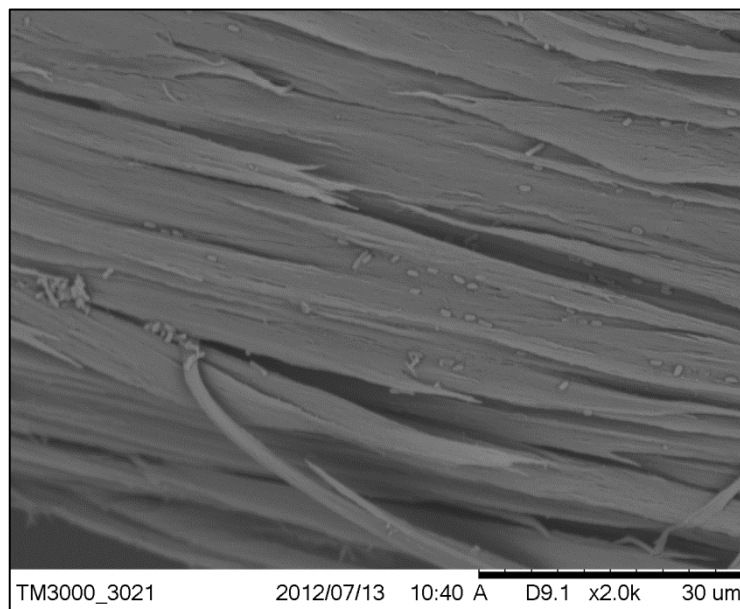
Fonte: Fotografado por Antonio Teruyoski Yabuki.

Figura 17 - MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus* sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 1800 x.



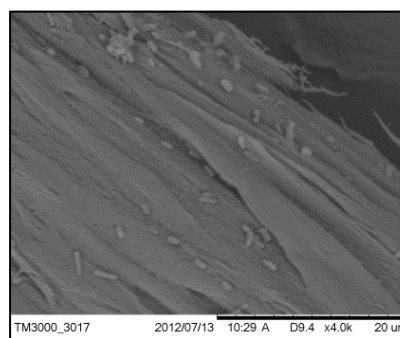
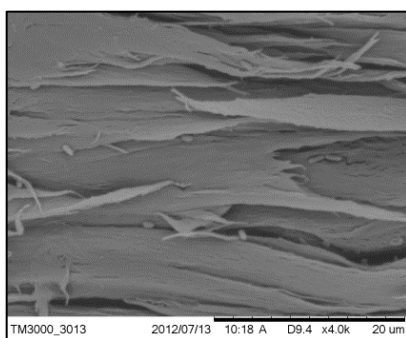
Fonte: Fotografado por Antonio Teruyoski Yabuki.

Figura 18 - MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus* sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 2000 x.



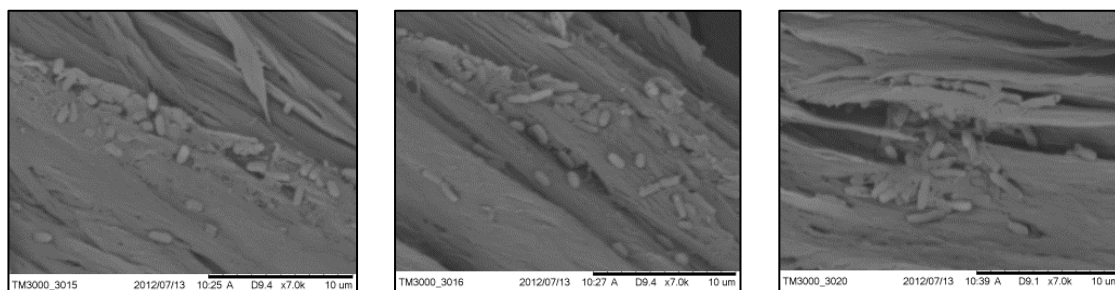
Fonte: Fotografado por Antonio Teruyoski Yabuki.

Figura 19 - MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus* sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 4000 x.



Fonte: Fotografado por Antonio Teruyoski Yabuki.

Figura 20 - MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus* sp. LM-21 em meio de cultura descrito por Williams et al. (1990). Amostra com 72 horas de cultivo. Aumento 7000 x.



Fonte: Fotografado por Antonio Teruyoski Yabuki.

4.3 Caracterização físico-química do caldo enzimático de *Bacillus* sp. LM-21

Como mencionado anteriormente, realizou-se a caracterização físico-química do caldo bruto enzimático obtido a 35°C, 150 rpm e 1% de penas. Todas as variáveis estudadas foram realizadas em triplicata, sendo calculadas as médias e desvios padrão. A tabela 8 apresenta todas as variáveis estudadas.

Tabela 8 - Média das atividades queratinolíticas obtidas para cada variável estudada na caracterização físico-química da enzima produzida por *Bacillus* sp. LM-21.

pH	Média para pH Atividade Queratinolítica (U/mL)	Temperatura	Média para Temperatura Atividade Queratinolítica (U/mL)
4,0	0	30°C	5,25
5,0	0	40°C	28,75
6,0	0	50°C	43,4
7,0	14	60°C	35,75
8,5	44,5	70°C	22,75
9,0	48,75		
10,00	10,75		
Substâncias	Média para substâncias Atividade Queratinolítica (U/mL)	Íons (5 mM)	Média para Íons Atividade Queratinolítica (U/mL)
DMSO 1%	14,25	BaCl ₂ ·2H ₂ O	41,25
EDTA 5mM	14,75	CaCl ₂	22,00
Isopropanol 1%	19,75	CuSO ₄ ·5H ₂ O	37,50
Mercaptoetanol 0,1%	192,50	FeCl ₃ ·6H ₂ O	22,75
Triton 0,1%	25,25	HgCl	91,50
Tween 0,1%	24,5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	29,50
		MnSO ₄ ·H ₂ O	0,00

Fonte: Dados da pesquisa.

Primeiramente será discutido o comportamento da enzima quando incubada em diferentes pH e temperaturas e posteriormente os resultados obtidos quando o caldo enzimático bruto foi incubado em diferentes substâncias: BaCl₂·2H₂O, CaCl₂, CuSO₄·5H₂O, FeCl₃·6H₂O, HgCl, MgCl₂·6H₂O, MnSO₄·H₂O – (m/v); DMSO 1% (v/v); EDTA 5 mM (m/v); Isopropanol 1% (v/v); Mercaptoetanol 0,1% (v/v); Triton 0,1% (v/v) e Tween 0,1% (v/v).

Como observado na tabela 9 e Figura 21 a atividade queratinolítica foi nula para valores de pH inferiores 6. Valores extremos de pH geralmente inativam as enzimas pela protonação ou desprotonação de aminoácidos que estão presentes no sítio catalítico da enzima (BOBBIO; BOBBIO, 1995). A queratinase apresentou atividade na faixa de pH 7,0 - 10,0. A atividade queratinolítica ótima foi obtida em pH 9,0 (48,75 U/mL), sendo que para valores inferiores e superiores a esse pH ocorreu diminuição da atividade queratinolítica.

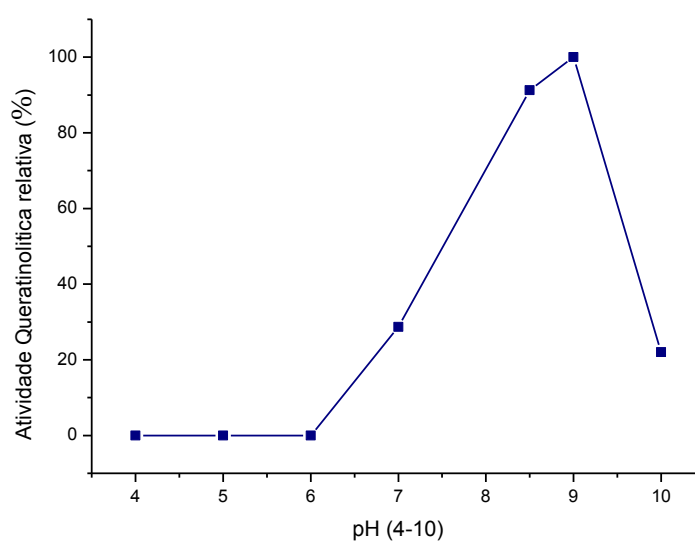
Resultado contrastante ao obtido neste estudo foi observado por Ali et al. (2011) ao realizarem um estudo com o fungo *Aspergillus oryzae* NRRL-447, no qual a caracterização da queratinase produzida pelo fungo foi também realizada. Ao analisar o efeito do pH na ação da enzima, os autores constataram que quando incubada a pH 9,0, a atividade queratinolítica decaiu 9%, sendo pH 7,0 o ótimo encontrado para ação da queratinase.

Tabela 9 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes valores de pH, médias e desvios padrões.

Valores pH	Média Atividade Queratinolítica (U/mL)	Desvio Padrão (U/mL)
4,00	0	0
5,00	0	0
6,00	0	0
7,00	14	0,87
8,50	44,5	2,17
9,00	48,75	5,25
10,00	10,75	4,99

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 21 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes valores de pH.



Fonte: Elaborado pela autora.

Letourneau et al. (1998) constataram que a atividade da enzima queratinase produzida por *Streptomyces* sp. foi inativa em pH 5,0, como ocorrido no presente estudo com *Bacillus* sp. LM-21, contudo a atividade máxima para *Streptomyces* sp. ocorreu em pH 10,0. No estudo realizado por Bernal et al. (2003), máxima atividade da enzima também ocorreu em pH 10,0 quando avaliada a queratinase produzida por *Kokurea rosea* LPB 3.

Anbu et al. (2005) realizaram um estudo com *Scopulariopsis brevicaulis* no qual determinaram a influência das variáveis pH, temperatura e concentração de sais na atividade enzimática. No que se refere ao pH, a faixa variada foi de 4,0 - 11,0 sob 37°C. A queratinase foi ativa em condição alcalina, com atividade ótima em pH 8,0. O aumento de pH a partir do valor ótimo fez a atividade da queratinase declinar. A atividade da queratinase foi mais estável na faixa de pH 6,0 - 8,5.

A influência do pH na atividade da enzima queratinase também foi relatada por Riffel et al. (2007). O autor realizou o estudo com a enzima purificada constatando que em pH mais baixo a atividade foi inferior, atingindo em pH 6,0 uma atividade 80% inferior à atividade determinada em pH 8,0. Quando determinada em valores de pH superior a 8,5 (9,0; 9,5; 10,0) atividades inferiores foram verificadas: 40, 45 e 65%, respectivamente.

Wang et al. (2008) isolaram e identificaram a bactéria *Chryseobacterium taeanense* TKU001. Duas proteases extracelulares foram purificadas e caracterizadas. A estabilidade enzimática foi avaliada em diferentes valores de pH e temperatura, assim como na adição de diferentes íons metálicos (5 mM) – Mg^{2+} ; Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Ba^{2+} -, inibidores de proteases - PMSF e EDTA - e solventes orgânicos. As atividades das enzimas FI e FII foram máximas em pH 8,0 e 7,0, enquanto que as mesmas mantiveram-se estáveis em faixas de pH 6,0- 9,0 e pH 7,0 - 9,0, respectivamente. 60°C foi a temperatura considerada ótima para ação de ambas as enzimas FI e FII.

Lin e Yin (2010) realizaram estudo com a cepa *Bacillus licheniformis* YJ4 no qual avaliaram a influência do pH na estabilidade de duas queratinases (Queratinase I e II). As enzimas foram incubadas em uma faixa de pH 3,0 - 11,0 e os resultados obtidos foram semelhantes aos avaliados no presente estudo com LM-21. Ambas as queratinases obtiveram um ótimo de pH 9,0. *Bacillus licheniformis* YJ4 apresentou atividade queratinolítica relativa baixa quando em pH menor que 6,0, sendo que se manteve estável em pH 6,0 - 10,0. Como observado no presente estudo, a enzima

produzida por *Bacillus* sp. LM-21 não apresentou atividade queratinolítica quando incubada em pH menor que 6,0.

Fakhfakh-Zouari et al. (2010) analisando as proteases produzidas por *Bacillus pumilus* A1 verificaram a influência de diferentes pHs, temperaturas e íons metálicos na ação das mesmas. A influência do pH sobre a atividade da protease foi avaliado na faixa de pH 6,0 - 10,0 a 60°C, sendo inferidas atividades queratinolíticas e atividades proteolíticas. O pH ótimo para atividade queratinolítica foi 9,0 e para atividade proteolítica foi 8,5. Para valores de pH abaixo de 8,5 a atividade queratinolítica foi reduzida.

Sapna e Yamini (2011) estudaram a influência do pH na atividade de queratinase de diferentes cepas de *Streptococcus* sp. As cepas foram isoladas a partir de amostras de solo. Neste estudo, sete valores de pH foram testados quanto a influência na atividade da queratinase, variando de pH 6,0 - 9,0. A cepa BS-1 apresentou ótimo de atividade queratinolítica em pH 8,5, a cepa BS-2 em pH 9,0, a BS-3 em pH 8,0 e a BS-4 em pH 8,5, mostrando que a queratinase atua melhor na faixa de pH 8,0 a 9,0.

Geralmente as determinações de atividade enzimática são realizadas em pH 8,0 ou 8,5, sendo mais ativas nesta faixa (Cortezi et al. 2008b).

Jellouli et al. (2011) avaliaram em seu estudo com *Bacillus licheniformis* MP1 uma serino protease alcalina e verificaram que a enzima purificada foi altamente ativa em pH 8,0 - 12,0, com um ótimo de pH 10,0.

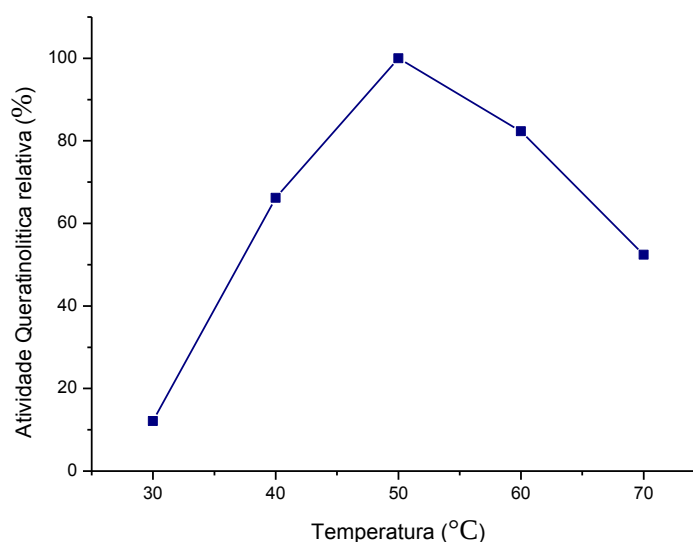
Quando verificada a influência da temperatura na atividade da enzima queratinase, como mostra a tabela 10 e Figura 22, esta se apresentou mais ativa em uma variação de 40 a 60°C, alcançando um valor máximo quando incubada a 50°C (43,4 U/mL). Menor atividade enzimática foi obtida quando a temperatura de 30°C foi utilizada, resultando em uma atividade relativa de 12,09%. Este resultado está de acordo com o observado por Scopes (1994), o qual relatou que com o aumento da temperatura, ocorreu uma elevação da atividade da enzima, aumentando assim, a formação do complexo enzimático.

Tabela 10 - Médias e desvios padrão das atividades queratinolíticas residuais obtidas quando a queratinase foi incubada em diferentes temperaturas.

Temperatura	Média Atividade Queratinolítica (U/mL)	Desvio Padrão (U/mL)
30°C	5,25	2,25
40°C	28,75	4,26
50°C	43,42	5,65
60°C	35,75	3,12
70°C	22,75	3,12

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 22 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao ser incubada a 60°C a enzima apresentou atividade queratinolítica relativa igual a 82,34% e a 70°C igual a 52,4%. Portanto, fica claro que para valores de temperatura superiores a 50°C, a atividade da enzima produzida por LM-21 cai gradativamente conforme se aumenta a temperatura. De modo geral, as enzimas reagem lentamente em temperaturas de subcongelamento e sua atividade aumenta com o aumento da temperatura até atingir uma atividade ótima, geralmente na faixa de 45°C (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Um aumento na temperatura pode gerar

inativação gradativa da enzima, até a sua inativação total, fato esse causado pela desnaturação da proteína pelo calor (CORTEZI et al., 2008b), como ocorre no presente estudo. Contudo, Ali et al. (2011) constataram que para o fungo *Aspergillus oryzae* NRRL-447 a temperatura ótima para atividade da queratinase foi de 70°C.

Anbu et al. (2005) realizaram Box-Behnken design onde estudaram a influência da temperatura na ação da enzima queratinase. Neste experimento, os autores constataram que a temperatura ótima para a atividade da enzima foi 40°C. Acima de 50°C, a atividade enzimática foi quase inativa.

Lin e Yin (2010) em seu estudo com *Bacillus licheniformis* YJ4 também avaliaram a influência da temperatura na estabilidade das duas queratinases (I e II) produzidas pela cepa. Os autores concluíram que ambas as queratinases apresentaram um ótimo de 60°C (faixa estudada 10 - 90°C), sendo estáveis de 10 a 50°C. A partir de 70°C as atividades queratinolíticas foram diminuídas. No presente estudo com *Bacillus* sp. LM-21, a atividade queratinolítica foi reduzida em temperatura superior a 50°C.

Fakhfakh-Zouari et al. (2010) estudando *Bacillus pumilus* A1 analisaram a influência da temperatura na atividade queratinolítica da enzima bruta produzida pela cepa. A queratinase foi ativa entre 50 - 70°C com uma atividade ótima a 55°C. As atividades queratinolíticas relativas a 40°C e 70°C foram de 51,5% e 55%, respectivamente.

Sapna e Yamini (2011) em seu estudo com *Streptococcus* sp. avaliaram a influência da temperatura na atividade da queratinase. As temperaturas estudadas foram 26°C, 30°C, 34°C, 38°C. Os resultados obtidos revelaram que a cepa BS-1 apresentou ação ótima da queratinase a 30°C, BS-2 a 38°C, BS-3 também a 38°C, enquanto que BS-3 demonstrou ação ótima a 34°C.

Jellouli et al. (2011) avaliaram a influência da temperatura na ação da protease alcalina de *Bacillus licheniformis* MP1. A enzima foi ativa em uma larga faixa de temperatura, com um ótimo de temperatura em 70°C. As atividades relativas a 65 e 75°C foram por volta de 81 e 90% , respectivamente.

Sahoo et al. (2012) em seu estudo com *Bacillus weihenstephanensis* PKD-5 também avaliaram a influência da temperatura sob a queratinase extracelular sintetizada pela cepa. A faixa de temperatura estudada variou de 30 - 60°C, de modo que a temperatura ótima foi de 40°C, para além da qual a atividade foi reduzida. A enzima manteve-se estável entre 40 e 50°C.

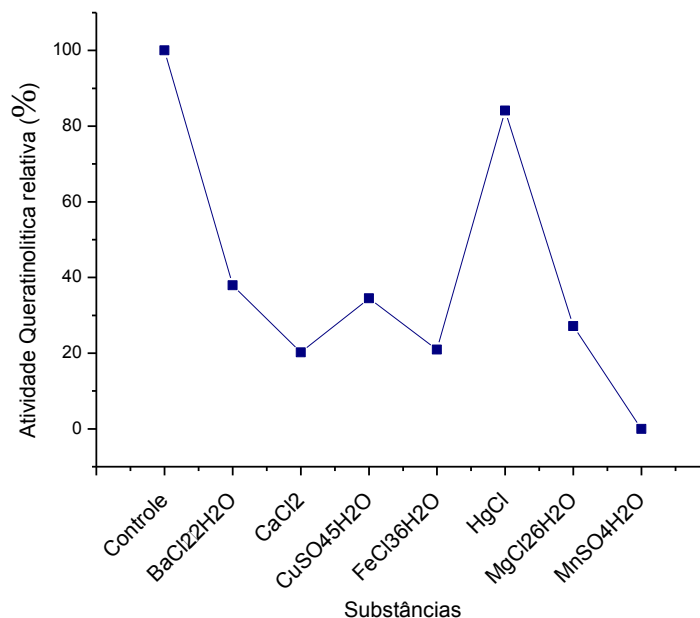
A Figura 23 apresenta as atividades queratinolíticas relativas quando o caldo de cultura isento de células foi incubado em diferentes substâncias contendo íons na concentração de 5 mM. Todos os íons utilizados inibiram a queratinase. As atividades queratinolíticas relativas foram as seguintes: $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 37,93%; CaCl_2 - 20,23%; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 34,48%; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 20,92%; HgCl - 84,14%; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 27,13%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0%. A partir dos resultados obtidos, evidencia-se HgCl inibiu fracamente a queratinase, enquanto que $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi capaz de inibir totalmente a ação da enzima.

Tabela 11 - Médias e desvios padrão das atividades queratinolíticas obtidas quando a enzima foi incubada com diferentes íons.

Substâncias	Média Atividade Queratinolítica (U/mL)	Desvio Padrão (U/mL)
Controle	108,75	16,9
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	41,25	4,9
CaCl_2	22	6,1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	37,5	12,4
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	22,75	7,5
HgCl	91,5	25,3
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	29,5	6,9
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 23 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas com diferentes íons.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como observado, $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 e MgCl_2 inibiram fortemente a queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21, resultando em uma atividade queratinolítica relativa de 0% para utilização de Manganês, 20,23% para a utilização de Cálcio e 27,13% para a utilização de Magnésio. Resultado contrastante a este foi observado por Riffel et al. (2007) no qual o autor constatou que quando incubada em Cálcio e Magnésio a enzima produzida por *Streptomyces* sp. foi ativada apresentando atividades queratinolíticas relativas iguais a 355 e 114%, respectivamente.

Já Oliveira (2006) verificou em seu trabalho que a enzima queratinase produzida por *Streptomyces* sp. foi estimulada por BaCl_2 (2 mM), sendo que o mesmo apresentou efeito inverso quando na concentração de 10 mM. A enzima foi fortemente inibida por CaCl_2 e MnCl_2 , como no presente estudo com *Bacillus* sp. LM-21, além de ter sido fortemente inibida por HgCl_2 e ZnCl_2 .

Quando a queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 foi incubada com HgCl , esta foi fracamente inibida (84,14%). Este resultado é contrastante com os resultados obtidos por Thys et al. (2004). Os autores relatou que na concentração de 5 mM, HgCl_2 levou a enzima a uma inativação total. Os autores sugerem que a

cisteína esteja presente no sítio ativo da enzima ou próximo dessa região. Ali et al. (2011) relataram essa mesma observação ao estudar a queratinase produzida por *Aspergillus oryzae* e constatar que Hg^{2+} inibiu fortemente a queratinase (58%). Contudo, os autores também atribuíram a inibição por Hg não apenas a ligação dos grupos tiol, mas como resultado da interação com resíduos de triptofano ou com os grupos carbonila de aminoácidos da enzima.

Anbu et al. (2005) realizaram um estudo de caracterização da enzima queratinolítica produzida por *Scopulariopsis brevicaulis*. A enzima teve sua ação parcialmente inibida pela adição dos metais Mg, Co, Ag e Pb, enquanto que a adição de Zn e Mn não provocou perda na atividade queratinolítica. Vale ressaltar, contudo, que no presente estudo com *Bacillus* sp. LM-21, Mn foi capaz de inibir totalmente a ação da queratinase.

No estudo de Wang et al. (2008) com a cepa *Chryseobacterium taeanense* TKU001 a adição de íons metálicos as queratinases FI e FII foi investigada. Foi constatada a total inibição das proteases FI e FII pelos íons metálicos Cu^{2+} e Fe^{2+} . No presente estudo, ambos os íons também exerceram ação de inativação na queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21, sendo que a substância $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ apresentou atividade queratinolítica relativa de 34,48% e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ apresentou uma atividade queratinolítica relativa de 20,92%. Contudo, apenas a substância $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi capaz de inibir totalmente a ação da queratinase.

Fakhfakh-Zouari et al. (2010) estudando a cepa *Bacillus pumilus* A1 também analisaram a influência de diferentes íons metálicos na atividade da queratinase. Os autores constataram que a adição de Ca^{2+} e Na^+ no caldo enzimático aumentou a atividade queratinolítica em 50 e 22%, respectivamente. No entanto, a adição de Cu^{2+} inibiu a atividade da queratinase em 28%, Mn^{2+} provocou inibição em 47% e Hg^{2+} inibiu a enzima em 92%. Mg^{2+} , Ba^{2+} e K^+ não demonstraram influência na atividade da enzima.

Lin e Yin (2010) no estudo da produção de queratinase pela cepa *Bacillus licheniformis* YJ4 purificaram duas enzimas com ação queratinolítica. Um estudo de caracterização foi realizado para essas enzimas de modo que os efeitos de íons metálicos, agentes redutores e inibidores foram descritos, sendo os íons metálicos utilizados - Li^+ ; Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ; os agentes redutores - DTT (Ditiotreitol), GSH (Glutathiona), β -M (β -Mercaptoetanol); e agentes inibidores - EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), NEM (N-etilmaleimida), p CMB

(p – cloromercuribenzoato) PMSF (fluoreto-de-sulfonilo-fenilmetil) e TLCK (N-toyl-L-lisina-clorometilcetona), incubados a 25°C durante 30 minutos. Os resultados mostraram que a queratinase I foi moderadamente inibida por Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , TLCK e EDTA; altamente inibida por Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , NEM e p CMB, enquanto que foi ativada por Li^{+} , DTT, GSH e β -M. Já a queratinase II foi moderadamente inibida por Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , EDTA, NEM, p CMB e TLCK; altamente inibida por Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e PMSF, sendo ativada por DTT, GSH e β -Mercaptoetanol.

Comparando os resultados obtidos por Lin e Yin (2010) com os do presente estudo com *Bacillus* sp. LM-21, verifica-se que o íon Hg^{2+} inibiu fortemente as queratinases I e II de *Bacillus licheniformis* YJ4, enquanto que em *Bacillus* sp. LM-21, a inibição foi parcial. Da mesma forma, o íon Ca^{2+} inibiu moderadamente as queratinases I e II de *Bacillus licheniformis* YJ4, enquanto que no presente estudo, este apresentou forte inibição da queratinase de *Bacillus* sp. LM-21. Já o íon Cu^{2+} foi um inibidor ativo tanto para queratinase de *Bacillus* sp. LM-21 (neste estudo), quanto para as queratinases I e II de *Bacillus licheniformis* YJ4.

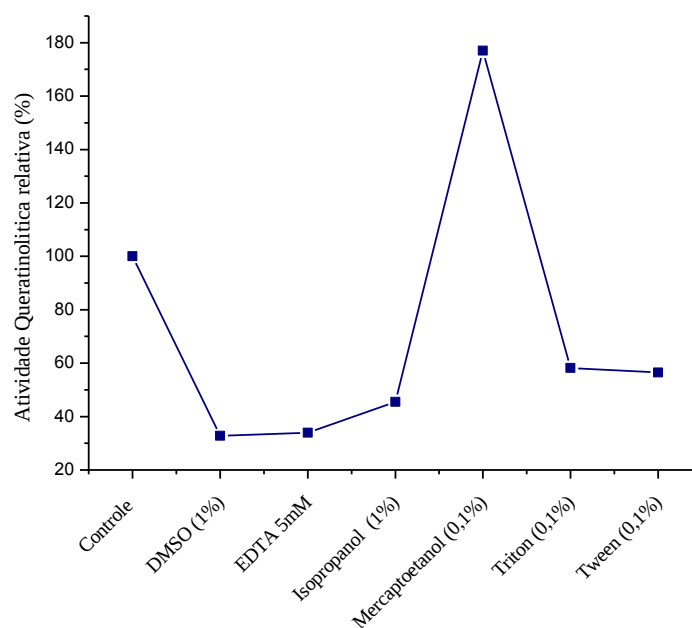
A Figura 24 apresenta as atividades queratinolíticas relativas quando o caldo enzimático foi incubado em diferentes substâncias. Nota-se que apenas mercaptoetanol 0,1% (v/v) foi capaz de promover ativação da enzima, sendo bem efetiva, com uma atividade queratinolítica relativa de 177,01%. Todas as demais substâncias utilizadas na incubação da queratinase provocaram inibição da enzima, de modo que as atividades queratinolíticas relativas foram de: 32,83% para DMSO 1% (v/v), 33,99% para EDTA 5 mM (m/v), 45,51% para Isopropanol 1% (v/v), 58,18% para Triton 0,1% (v/v) e 56,45% para Tween 0,1% (v/v).

Tabela 12 - Atividades queratinolíticas quando incubadas com diferentes substâncias, suas médias e desvios padrão.

Substâncias	Média Atividade Queratinolítica (U/mL)	Desvio Padrão (U/mL)
Controle	43,3	2,3
DMSO 1%	14,25	3,0
EDTA 5mM	14,75	1,1
Isopropanol 1%	19,75	39,5
Mercaptoetanol 0,1%	192,5	3,0
Triton 0,1%	25,25	3,1
Tween 0,1%	24,5	5,6

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 24 - Atividades queratinolíticas residuais quando incubadas com diferentes substâncias.



Fonte: Elaborado pela autora.

A incubação com EDTA (5 mM) provocou na queratinase inibição resultando em uma atividade queratinolítica relativa de 33,99%. Riffel et al. (2007) demonstrou em seu estudo que a enzima produzida por *Streptomyces* sp. também apresentou inibição de 35% quando incubada em EDTA (10 mM) e um aumento da inibição ocorreu quando esta foi incubada em uma concentração maior (50 mM), resultando em uma inibição de 79%. O autor relatou que a queratinase pertence à família das

metalo proteases já que houve a inibição por EDTA. O mesmo autor verificou que a enzima produzida por *Chryseobacterium* sp. apresentou uma inibição de 57% quando incubada em EDTA (5 mM).

Inibição por EDTA também foi observada nos estudos realizados por Oliveira (2006) em que o autor verificou que a concentração de 10 mM desta substância resultou em uma inibição de 47,1%, porém, a enzima não foi inibida quando 2 mM foi adicionado a enzima.

A inibição da queratinase por agentes quelantes pode fornecer um método para inativação temporária das mesmas durante o armazenamento destas proteínas, reduzindo a autólise associada com enzimas proteolíticas. Neste caso, a natureza metaloenzimática de algumas queratinases representa um método para imobilização, a qual tem sido apontada como sendo capaz de aumentar a estabilidade devido à redução da autólise enzimática (ALPRESS et al., 2002).

Wang et al. (2008) estudaram a influência de diferentes substâncias na ação de duas proteases sintetizadas por *Chryseobacterium taeanense* TKU001, denominadas FI e FII. Os autores utilizaram dois inibidores de enzima, PMSF e EDTA, e reportaram que PMSF não apresentou efeito significativo na ação das proteases purificadas, enquanto que EDTA foi um forte inibidor, indicando que as proteases TKU001 FI e FII são metaloenzimas.

Wang et al. (2008) também estudaram a ação de alguns surfactantes sob as atividades exercidas por FI e FII. Foi descrito que na presença de 2% de Tween 20, Tween 40 e Triton X-100, a atividade da TKU001 FI manteve 79%, 80% e 110% da atividade original, enquanto que FII, entretanto, manteve 100%, 100% e 121% da atividade original, respectivamente. Isto mostra que as enzimas foram pouco ou nada inibidas por ação de Tween, enquanto que, a adição de Triton provocou ativação das mesmas.

Na presente investigação com *Bacillus* sp. LM-21, a ação de Tween 0,1% e Triton 0,1% provocaram inibição da queratinase. Ambas as substâncias inibiram a enzima em aproximadamente metade do seu potencial de ação, sendo que a primeira apresentou uma atividade queratinolítica relativa de 56,45% e a segunda de 58,18%.

Lin e Yin (2010) caracterizando duas enzimas queratinolíticas produzidas por *Bacillus licheniformis* YJ4 evidenciaram que a incubação com EDTA provocou inibição moderada para as queratinases de *Bacillus licheniformis* YJ4. Já a

incubação com β -mercaptoetanol foi capaz de ativar a ação das enzimas queratinolíticas produzidas por *Bacillus licheniformis* YJ4, resultado este, semelhante ao obtido para cepa *Bacillus* sp. LM-21 no qual a adição de β -mercaptoetanol resultou em atividade queratinolítica relativa de 177,01%.

Ali et al. (2011) também relataram em seu estudo com o fungo *Aspergillus oryzae* NRRL-447 que a adição de β -mercaptoetanol causou uma atividade queratinolítica relativa de 119%. Os autores explicaram esse aumento pelo fato de a reação ter disponíveis grupos sufridrílicos. Muitos estudos tem usado agentes redutores como β -Mercaptoetanol para aumentar a atividade da queratinase, como Bockle et al. (1995), Bressollier et al. (1999) e Riffel et al. (2003). Estes estudos observaram que agentes redutores podem diminuir as pontes dissulfeto da queratina por sulfitólise e também tornar o substrato mais acessível para que a queratinase atue.

Diante dos resultados apresentados, a queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 parece pertencer à família das metaloproteases, já que foi inibida quando incubada em EDTA.

Com intuito de verificar a presença de aminoácidos no caldo de cultura de *Bacillus* sp. LM-21 quando cultivado a 150 rpm, 35°C e 1% de penas, realizou-se cromatografia em camada delgada de amostra com 72 horas de cultivo.

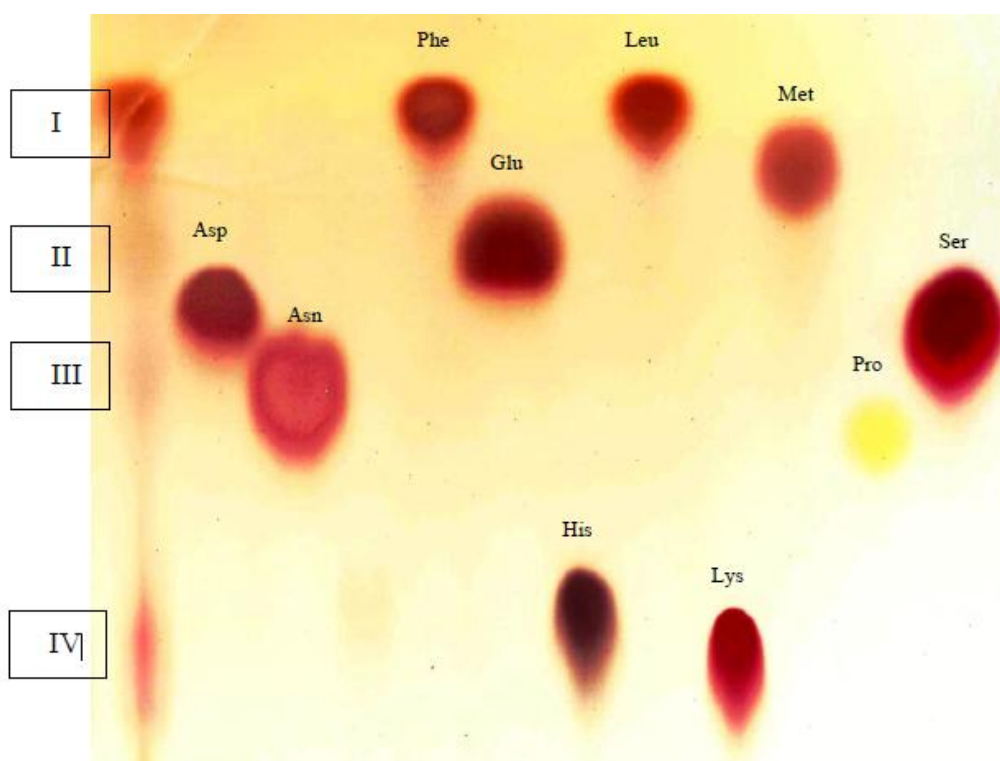
Como observado na Figura 25 à amostra foi aplicada na placa de sílica-gel seguida pelo aminoácido ácido aspártico (Rf 0,64), asparagina (Rf 0,57), fenilalanina (Rf 0,84), ácido glutâmico (Rf 0,71), histidina (Rf 0,31), leucina (Rf 0,85), lisina (Rf 0,27), metionina (Rf 0,79), prolina (Rf 0,50) e serina (Rf 0,63), utilizados como padrão.

A amostra apresentou quatro spots visíveis (I; II; III; e IV), sendo os RFs, respectivamente, 0,85; 0,72; 0,58 e 0,27. Estes resultados constataram a liberação de aminoácidos no meio de cultivo de *Bacillus* sp. LM-21. Ao avaliar o spot I não se podem afirmar com certeza quais aminoácidos foram liberados, se fenilalanina ou leucina, devido ao fato destes se sobreporem, portanto fica de difícil análise se o spot apresentado foi da liberação de fenilalanina, leucina ou de ambos. O spot II com Rf igual a 0,72 indica a liberação de ácido glutâmico, visto que esse apresenta Rf 0,71. Já o spot III por apresentar Rf 0,58 indica a liberação do aminoácido asparagina (Rf 0,57), enquanto que o spot IV indica a liberação de lisina (Rf 0,27) no meio de cultivo, visto que esse padrão apresentou o mesmo valor de Rf (0,27).

Outros estudos avaliaram a presença de aminoácidos solúveis no caldo de cultivo de diferentes micro-organismos. Ghosh et al. (2008) objetivaram em seu estudo a degradação de penas por *Bacillus cereus* DCUW. Após degradação das penas, a composição de aminoácidos do hidrolisado foi avaliada por análise em sistema HPLC (LC-10A, Shimadzu), sendo estes encontrados nas seguintes concentrações: ácido aspártico 2,7 µg/mL; treonina 4,9 µg/mL; serina 2,59 µg/mL, ácido glutâmico 4,6 µg/mL; prolina 1,44 µg/mL; glicina 2,36 µg/mL; alanina 2,27 µg/mL; valina 2,23 µg/L; metionina 0,63 µg/mL; isoleucina 2,0 µg/mL; leucina 3,35 µg/mL; tirosina 3,59 µg/mL; fenilalanina 1,67 µg/mL; histidina 3,4 µg/mL; lisina 9,5 µg/mL; triptofano 1,33 µg/mL e argenina 2,5 µg/mL.

O conteúdo de aminoácidos presentes no caldo fermentado livre de células também foi determinado por Zaghloul, et al. (2011), os quais relataram que fenilalanina foi obtido em maior concentração, seguido por valina e tirosina, já metionina foi obtido em menor concentração.

Figura 25 - Cromatografia em camada delgada (da esquerda para direita: amostra do material fermentado com bandas I, II, III e IV (150 rpm, 35°C, 1% após 72 horas de cultivo), ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, ácido glutâmico, histidina, leucina, lisina, metionina; prolina e serina.



Fonte: Fotografada pela autora.

5 CONCLUSÃO

O isolado LM-21 foi identificado por análise de sequenciamento do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S, como *Bacillus* sp. LM-21. Pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura foi observada forte aderência do micro-organismo as penas após 96 horas de cultivo, sendo possível observar a degradação das mesmas.

Quando estudada as condições ótimas de cultivo em shaker para *Bacillus* sp. LM-21 observou-se que essas condições foram: 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo, pH inicial 7,4 e meio de cultivo proposto por Williams et al. (1990).

No estudo da caracterização da queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 observou-se que em valores de pH inferiores a 6,0 a enzima não apresentou atividade queratinolítica, o pH ótimo para ação da queratinase foi 9,0 (48,75 U/mL). Quanto à temperatura, a enzima mostrou-se mais ativa quando incubada entre 40 e 60°C, alcançando um valor máximo de atividade queratinolítica quando incubada a 50°C (43,4 U/mL).

Na determinação da influência de substâncias químicas sobre ação da enzima, observou-se que o β -mercaptoetanol (0,1%) promoveu ativação da enzima (177,01%) - enquanto que DMSO (1%), EDTA (5 mM), Isopropanol (1%), Triton (0,1%) e Tween (0,1%) exerceram inibição da mesma, com atividades queratinolíticas relativas 32,83%, 33,99%, 45,51%, 58,18%, 56,45%, respectivamente. Observou-se ainda que a enzima foi inibida por todos os íons estudados, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (37,93%), CaCl_2 (20,23%); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (34,48%); $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20,92%); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (27,13%), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0%) e HgCl (84,14%). Diante dos resultados obtidos, a queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 pertence à família das metaloproteases, já que foi inibida quando incubada em EDTA.

O bioprocessamento de materiais ricos em queratina é uma das principais aplicações para as queratinases. Além deste, estas enzimas também são consideradas como bons biocatalisadores para diversos propósitos, incluindo a utilização em indústrias de fertilizantes, rações, couros e têxteis, bem como aplicação nas áreas biomédica e farmacêutica. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a queratinase produzida por *Bacillus* sp. LM-21 apresentou potencial de mercado promissor de modo que mais estudos serão realizados no futuro.

REFERÊNCIAS

- ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA EXPORTADORES DE FRANGO. **Relatório anual abef 2012/2013**. Presidente executivo Francisco Turra. São Paulo, SP. 2013. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>> Acesso em 03/08/2013.
- ALI, T. H.; ALI, N. H.; MOHAMED, L. A. Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447. **Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation**, Jakarta, v. 6, n.2, p.123-136, 2011.
- ALLPRESS, J. D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P. C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIBM 9497. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 337-342, 2002.
- ANBU, A.; GOPINATH, A.; HILDA, A.; LAKSHMI, T.; ANNADURAI, G. Purification of keratinase from poultry farm isolate – *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme and Microbiology Technology**, [S. L.], v. 36, p.639-647, 2005.
- ANBU, A.; GOPINATH, A.; HILDA, A.; LAKSHMI, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 6, p.1298-1303, 2007.
- AZEVEDO, M. O. ; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 211p.
- BACH, E.; DAIROT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, n. 6, p.1199-1201, 2011.
- BALAJI, S.; KUMAR, M. S.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, p. 2741-2745, 2008.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 255-261, 2003.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à química dos alimentos**. 2. Ed. São Paulo: Varela, 1995. 222p.

BOCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MULLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, 1995.

BOCKLE B.; MULLER R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n.2, p. 790-792, 1997.

BRANDELLI, A.; RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. L.], v.8, n.1, 2005. Não paginado.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) **Aves**. 2013a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em 07 ago. 2013.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). **Indústria**. 2013b. Disponível em: <www.mdic.gov.br>. Acesso em 31 ago. 2013.

BRESSOLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2570-2576, 1999.

BUREAU, D. P.; HARRIS, A. M.; CHO, C. Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Oxford, v.180, p.345-358, 1999.

CAI, C.; LOU, B.; ZHENG, X. Keratinase production and Keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, Hangzhou, v.9, n.1, p.60-67, 2008.

CAI, C. G.; ZHENG, X. D. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, p. 875-833, 2009.

CASARIN, F.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, [S. L.], v. 1, p. 301-305, 2008.

CEDROLA, S. M. L.; MELO, A. C. N.; MAZOTTO, A. M.; LINS, U.; ZINGALI, R. B.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B. Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather wast. **World Jornal Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 28, p.1259-1269, 2012.

CHAO, Y. P.; XIE, F.; YANG, J.; LU, J. H.; QIAN, S. J. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 19, p. 1125 -1128, 2007.

CHENG, S. W.; HU, H. M.; SHEN, S. W.; TAKAGI, H.; TSAI, Y. C. Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformes* PWD -1 **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n.12, p. 2239-2243, 1995.

CHITTE, R. R.; NALAWADE, V. K.; DEY, S. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p.131-136, 1999.

COELLO, N.; BERNAL, C.; BERTSCH, A.; ESTRADA, O.; MOCOO, Y.; HASEGAWA, M. Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interesse industrial. **Revista de la facultad de Ingeniería de la UCV**, [S. L.], v.18, n.3, p.119-126, 2003.

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**, Barking, v. 64, p. 1-6, 2010.

CORTEZI, M.; CONTIERO, J.; CHILI, E. M. *Bacillus amyloliquefaciens*: A new keratinolytic feather-degrading bacteria. **Current Trends Biotechnology and Pharmacy**, [S. L.], v. 2, p. 171-179, 2008a.

CORTEZI, M.; CONTIERO, J.; MONTI, R. Characterization of a feather degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* protease: a new strain. **World Journal of Agricultural Sciences**, [S. L.], v. 4, p. 648-656, 2008b.

DAROIT, D. J. **Potencial queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus* sp.** P45. 2011.167 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências básicas em saúde, Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola e do ambiente, Porto alegre, RS, 2011.

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

EL-RAFAI, H. A.; ABDELNABY, M. A.; GABALLA, A.; EL-ARABY, M. H.; ABDEL FATTAB, A. F. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2325-2332, 2005.

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

- FAKHFAKH-ZOUARI, N.; 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**, London, v. 45, p. 617-626, 2010.
- FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.3, p.85-93, 2004.
- FUJIKAWA, H.; MATSUSHITA, M. Fractal growth of *Bacillus subtilis* on agar plates. **Journal of the Physical Society of Japan**, Tokyo, v. 58, p. 3875-3878, 1989.
- GARRET, S.; GRISHAN C. M. Protein Folding and Tertiary Structure. **Biochemistry**. London: Saunders College Publ.Chap, v.5, p.159-168, 1995.
- GESSESSE, A.; HATTI-KAUL, R.; GASHE, B. A.; MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, p. 519-524, 2003.
- GHASEMI, Y.; SHAHBAZI, M.; RASOUL-AMINI, S.; KARGAR, M.; SAFARI, A.; KAZEMI, A.; MONTAZERI-NAJAFABADY, N. Identification and characterization of feather-degrading bacteria from keratin-rich wastes. **Annals of Microbiology**, [S. L.], v. 62, p. 737-744, 2012.
- GHOSH, A.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. **Microbial Biotechnology**, [S. L.], v. 35, n.8, p. 825-834, 2008.
- GIONGO, J. L.; LUCAS, F. S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World journal microbial biotechnology**, [S. L.], v. 23, p. 375-382, 2007.
- GRADISAR, H.; FRIEDRICH, J.; KRIZAJ, I.; JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3420-3426, 2005.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Washington, v. 70, p. 21-33. 2006
- HAN, M.; LUO, W.; GU, Q.; YU, X. Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11. **African Journal of Microbiology Research**, [S. L.], v.6, n.9, p.2211 -2221, 2012.
- ICHIDA, J. M.; KRIZOVA, L.; LeFEVRE, C. A.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT Jr, E. H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.47, p.199-208, 2001.

JAIN, R.; JAIN, P. C.; AGRAWAL, S. C. Feather degradation by *Streptomyces exfoliates* CFS 1068. **Annals of Microbiology**, [S. L.], 2011. Não paginado.

JAYALAKSHMI, T.; KRISHNAMOORTHY, P.; RAMESH KUMAR, G.; SIVAMANI, P. Optimization of culture conditions for Keratinase production in *Streptomyces* sp. JRS19 for Chick feather wastes degradation. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, [S. L.], v.3, n.4, p.498-50, 2011.

JELLOULI, K.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; AYED, H. B.; MANNI, L.; AGREBI, R.; NASRI, M. Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. **Process Biochemistry**, London, v. 46, p. 1248-1256, 2011.

JEONG, J.; JEON, Y.; LEE, O.; KIM, J.; LEE, N.; PARK, G.; SON, H. Characterization of a multifunctional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.21, p. 1029-1040, 2010.

KANSOH, A. L.; HOSSINY, E. N.; EL-HAMEED, E. K. Keratinase production from feathers wastes using local *Streptomyces* isolates. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, [S. L.], v. 3, n. 2, p.561-571, 2009.

KIM, J. M.; LIM, W. J.; SUH, H. J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**, London, 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**, Oxford, v. 15, p. 472-476, 2005.

KOJIMA, M.; KANAI, M.; TOMINAGA, M.; KITAZUME, S.; INOUE, A.; HORIKOSHI, K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, Tokyo, v.10, p. 229-235, 2006.

KUBLANOV, I. V.; PEREVALOVA, A. A.; SLOBODKINA, G. B.; LEBEDINSKY, A. V.; BIDZHIEVA, S. K.; KOLGANOVA, T. V.; KALIBERDA, E. N.; RUMSH, L. D.; HAERTLE, T.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 286-291, 2009.

KUNERT, J.; STRANSKY, Z. Thiosulphate production from cysteine by the keratinophilic prokaryote *Streptomyces fradiae*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 150, p. 600–601, 1988.

LATEEF, A.; OLOKE, J. K.; GUEGUIM KANA, E. B.; SOBOWALE, B. O.; AJAO, S. O.; BELLO, B. Y. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v 64, p.162-165, 2010.

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

LETOURNOU, F.; SOUSSOTTE, P.; BRESSOLLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNOEUIL. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 77-80, 1998.

LIN, X.; LEE, C.; CASALE, E. S.; SHIH, J. C. H. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformes* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n.10, p. 3271-3275, 1992.

LIN, H.; YIN, L. Feather meal and rice husk enhanced keratinases production by *Bacillus licheniformis* YJ4 and characters of produced keratinases. **Journal of Marine Science and Technology**, [S. L.], v. 18, n. 3, p. 458-465, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBRAUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 75, p.193-265, 1951.

MACEDO, A. J.; SILVA, W. O. B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J. A. P.; TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 594-596, 2005.

MANCZINGER, I.; ROZS, M.; VAGVOLGYI, C.; KEVEI, F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.19, p.35-39, 2003.

MAZOTTO, A. M.; CEDROLA, S. M. L.; LINS, U.; ROSADO, A. S.; SILVA, K. T.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ZINGALI, R. B.; VERMELHO, A. B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 89-96, 2010.

MAZOTTO, A. M.; COELHO, R. R. R.; CEDROLA, S. M. L.; LIMA, M. F.; COURI, S.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. Keratinase Production by Three *Bacillus* spp. Using feather meal and whole feather as substrate in a submerged Fermentation. **Enzyme Research**, [S.L.], Article ID 523780, 2011. Não paginado.

McDONALD, C. E.; CHEN, L. L. The Modification of the Folin Reagent for Determination of Proteinase Activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 10 p. 175-177, 1965.

MITSUIKI, S.; SAKAI, M.; MORIYAMA, Y.; GOTO, M.; FURUKAWA, K. Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, p. 164-167, 2002.

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

NAM, G. W.; LEE, D. W.; LEE, H. S.; LEE, N. J.; KIM, B. C.; CHOE, E. A.; HWANG, J. K.; SUHARTNOTO, N. M. T.; PYUN, Y. R. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobic. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.178, n.6, p. 538-547, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1296p.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Ed). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. IRL Press, Oxford, 1989. p. 1-14.

NI, H.; CHEN, Q.; CHEN, F.; FU, M.; DONG, Y.; CAI, H. Improved keratinase production for feather degradation by *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410 in submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 10, n.37, p. 7236-7244, 2011.

NITISINPRASERT, S.; PORNWIRUN, W.; KEAWSOMPONG, S. Characterization of two bacterial strains and their synergism in feather degradation. **Natural Science**, Bangkok, v. 33, p. 191-199, 1999.

OLIVEIRA, G. M. **Atividade queratinolítica de uma cepa de *Streptomyces* sp. Isolada de um abatedouro de aves**. 2006. 53 f. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Programa de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada, Rio Claro, SP, 2006.

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

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Evolution of peptidase diversity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.283, p.30010-30014, 2008.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PARK, G. T.; SON, H. J. Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-, 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* isolated. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 78, p. 643-650, 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, v. 160, p. 1909-1920, 2010.

QUEIROGA, A. C.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Potencial use of woll-associated *Bacillus* species for biodegradation of keratinous materials. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 70, p. 60-65, 2012.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of laundry detergent and organic solvent-stable subtilisinlike serine protease from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 48, p. 173-180, 2010.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG I using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.40, p. 191-196, 2004.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Merops: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.27, p. 325-331, 1999.

RIESSEN, S.; ANATRAKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**, Tokyo, v. 5, n. 6, p. 399-408, 2001.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.128, p. 693-703, 2007.

RIFFEL, A.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Nutricional regulation of protease production by the feather-degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 153-157, 2011.

SAHOO, D. K.; DAS, A.; THATOI, H.; MONDAL, K. C.; MOHAPATRA, P. K. D. Keratinase Production and Biodegradation of Whole Chicken Feather Keratin by a Newly Isolated Bacterium Under Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 167, n. 5, p. 1040-1051, 2012.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R (Ed.). **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. In: cap. 16 Queratinases. BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 416 p.

SALES, M. R.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA, F. J. L.; MOTTA, C. M. S.; PORTO, A. L. F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 43, n.2, p. 285-288, 2008.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Strain Kr2 **Journal Applied Microbiology**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 735-743, 2000.

SAPNA, R.; YAMINI, V. Study of keratin degradation by some potencial bacterial isolates from soil. **The Journal of Soil Science**, Oxford, v. 1, p. 01-03, 2011.

SCOPES, R. S. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3. ed. Springer-Verlag, 1994. 380p.

SHRINIVAS, D.; NAIK, G. R. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.65, p. 29-35, 2011.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C., SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 2. ed. São Paulo: Varela, 2001.

SINGH, C. J. Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. **Mycopathologia**, India, v. 143, p. 147-150, 1999.

SIVAKUMAR, T.; BALAMURUGAN, P.; RAMASUBRAMANIAN, V. Characterization and applications of keratinase enzyme by *Bacillus thuringiensis* TS2. **International Journal of Future Biotechnology**, [S.L.], v. 2, n.1, p.1-8, 2013.

SON, H. J.; PARK, H. C.; KIM, H. S.; LEE, C. Y. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, p. 461-465, 2008.

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, n. 2, p. 165-169, 2001.

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

SZABO, I.; BENEDEK, A.; SZABO, I. M.; BARABAS, G. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 253-255, 2000.

TAKAMI, H.; NOGI, Y.; HORIKOSHI, K. Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. **Extremophiles**, Tokyo, v. 3, p. 293-296, 1999.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, p.181-188, 2004.

THYS, R. C. S.; LUCAS, F. S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. 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.; BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. **Journal Applied Microbiology**, [S. L.], v. 101, p. 1259-1268, 2006.

TIWARY, E.; GUPTA, R. Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.58, p. 8380-8385, 2010.

TORK, S. E.; SHAHEIN, Y. E.; EL-HAKIM, A. E.; ABDEL-ATY, A. M.; ALY, M. M. Production and characterization of thermostable metallo keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford , v. 55, p.169-175, 2013.

WANG, Q, G. M.; GARRITY, J. M.; TIEDJE; J. R. COLE. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n.16, p. 5261-5267, 2008.

WANG, S. L.; HSU, W. T.; LIANG, T. W.; YEN, Y. H.; WANG, C. L. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKUO14 in a shrimp shell powder medium. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 5679-5686, 2008.

WILLIAMS, C. M., RIECHTER, C. S., McKENZI, J. M., SHIH J. C. J. – Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington ,v. 56, p.1509-1515, 1990.

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

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

ZAGHLOUL, T. I., EMBABY, A. M., ELMAHDY, A. R. Key determinations affecting sheep wool biodegradation directed by a keratinase-producing *Bacillus subtilis* recombinant strain. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 22, p. 111-128, 2011.

ZERDANI, I.; FAID, M.; MALKI, A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. In Morocco. **African Journal of Biotechnology**, [S.L.], v.3, n.1, p.67-70, 2004.

ZHENG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, **Journal of Computational Biology**, New York, v.7, n.1-2, p.203-214, 2000.