UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MICROBIOLOGIA APLICADA)

Isolamento de Microrganismos Produtores de Queratinase: Estudo da Biodegradação da Queratina Oriunda de Penas de Abatedouro de Frangos

Mariana Cortezi

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Fevereiro-2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MICROBIOLOGIA APLICADA)

Isolamento de Microrganismos Produtores de Queratinase: Estudo da Biodegradação da Queratina Oriunda de Penas de Abatedouro de Frangos

Mariana Cortezi

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Fevereiro-2009

547.75 Cortezi, Mariana
C828i Isolamento de microrganismos produtores de queratinase : estudo da biodegradação da queratina oriunda de penas de abatedouros de frangos / Mariana Cortezi. – Rio Claro : [s.n.], 2009
127 f. : il., gráfs., tabs., figs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero

1. Enzimas. 2. Fermentação. 3. Purificação. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico às pessoas que fazem minha vida ter um sentido todo especial.....Minha família, em especial a minha mãe e ao Ricardo!!! Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus.... “**Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano, o que Deus tem preparado para aqueles que o amam**."

Um agradecimento muito especial ao Prof. Dr. Jonas Contiero, pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

Aos meus eternos amigos, agora baianos, Márcia e Guilherme, sinto muita saudades das nossas conversas e da convivência sempre muito gostosa e divertida.

A todos os amigos do LMI, Rô, Luciana, Keity, Siddhartha, Cristian, Fabrício, Paulo, Gervásio, Túlio, Joice, Natália e Irina, Natália. Saudades também das nossas conversas na salinha de estudos e do almoço no RU pontualmente as 11:30 !!!!! Agradecimento especial a Rô pela paciência e carinho que sempre teve comigo, pelas vezes que desabafei!!!!

A amiga Adriana de Campos (Dri), sempre tão delicada e atenciosa comigo, agradeço por sua amizade sincera!

Agradecimento especial a Adriana Knob e César! Muito obrigada pela grande ajuda e amizade.

Agradeço a Lucilene, Keity e Anderson pela imensa ajuda. Muito obrigada pela disposição em me ajudar quando necessitei!

Agradeço a todos os professores, alunos da pós-graduação e funcionários do Departamento e Bioquímica e Microbiologia, da Biblioteca e da Pós-Graduação.

"Amizade é um dom divino. É um dom que poucos têm. É algo sublime, perfeito, delicado. É um sentimento bom, gostoso de sentir. Quando ganhamos um amigo, tudo parece ser mais fácil, a vida se torna mais bela e a semente do amor é frutificada."

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS..... i

LISTA DE FIGURAS..... ii

1. RESUMO..... 1

2. ABSTRACT..... 2

3. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... 3

4. OBJETIVO..... 6

5. REVISÃO DE LITERATURA..... 7

5.1 Queratina..... 7

5.2 Penas de frango: características e aproveitamento..... 8

5.3 Classificação das proteases e mecanismos de ação das queratinases..... 11

5.4 Microrganismos produtores de queratinase e produção da enzima..... 14

5.5 Produção da enzima queratinase em reator..... 22

5.6 Purificação de produtos biotecnológicos..... 24

5.7 Purificação e caracterização da enzima queratinase..... 29

6. MATERIAL e MÉTODOS..... 33

.

6.1 Microrganismo..... 33

6.2 Locais de coleta para isolamento dos microrganismos..... 33

6.3 Isolamento e seleção dos microrganismos 36

6.4 Obtenção do inóculo e Determinação do crescimento bacteriano..... 38

6.5 Produção da enzima em shaker 39

6.6 Fermentações realizadas em reator..... 39

6.7 Avaliação da porcentagem de degradação das penas..... 40

6.8 Atividade enzimática da queratinase..... 40

6.9 Determinação da Atividade Proteolítica..... 41

6.10 Determinação da concentração de proteína..... 41

6.11 Síntese de Azoqueratina..... 41

6.12 Cromatografia em camada delgada..... 42

6.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 42

6.14 Caracterização do caldo enzimático..... 43

6.15 Verificação da eficiência na precipitação das proteínas com Sulfato de amônio, etanol e acetona. 44

6.16 Purificação da enzima queratinase e técnicas cromatográficas 45

6.17 Caracterização da enzima parcialmente purificada..... 47

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49

8. CONCLUSÃO..... 116

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 119

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Características das queratinases secretadas por alguns microrganismos..... 16

Tabela 2: Operações unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos..... 26

Tabela 3: Meio de cultura proposto por Willians et al. (1991)..... 37

Tabela 4: Análise da farinha de penas (fornecido pela empresa Agroceres - Rio Claro)..... 37

Resultados e Discussão-Capítulo 7.1

Tabela 1: Amostras coletadas e microrganismos isolados..... 49

Tabela 2: Microrganismos e respectivos índices de similaridade.. 54

Resultados e Discussão - Capítulo 7.2

Tabela 1: Influência do pH do meio de cultura no Crescimento Celular e pH final de *Bacillus amyloliquefaciens*..... 68

Tabela 2: Atividade queratinolítica, proteolítica e crescimento celular de *Bacillus amyloliquefaciens*..... 76

Resultados e Discussão - Capítulo 7.3

Tabela 1: Etapas para purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*..... 108

Tabela 2: Etapas para purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*..... 112

Tabela 3: Influência de inibidores na atividade enzimática..... 112

1. Resumo

Penas consistem principalmente de queratina, estas são produzidas em grande quantidade como subproduto das indústrias de processamento de frangos, são ricas em aminoácidos os quais podem ser utilizados como suplemento protéico para ração animal, entretanto o processo de produção de farinha de penas é caro, já que requer uma grande quantidade de energia. Geralmente, as penas são cozidas em vapor sob pressão e quimicamente tratadas antes do uso. Portanto, a degradação microbiana de penas representa uma alternativa biotecnológica para aumentar o valor nutricional das mesmas. Porém as penas não podem ser degradadas por proteases comuns, sendo degradadas por enzimas denominadas queratinases. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção da enzima queratinase pela cepa *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de uma indústria de processamento de frangos, sendo que esta cepa apresentou eficiência para ser utilizada em processos biotecnológicos. A produção da enzima e o crescimento da cepa foram influenciados pelas condições de cultivo, sendo que as condições ótimas para a produção da enzima foram 40ºC, 150 rpm, 1% de penas, pH 7.5. Os resultados mostraram que a liberação de aminoácidos no caldo de cultura, evidenciada pela cromatografia em camada delgada, permite seu uso em ração animal. A enzima foi parcialmente purificada, sendo inibida por EDTA podendo pertencer assim as metaloproteases.

Palavras Chave: Queratinase, queratina, biodegradação, isolamento de microrganismos, purificação.

2. ABSTRACT

Feathers consisting primarily of keratin, this are generated in huge quantities as a waste by-product in commercial poultry- processing plants, these are rich in aminoacids wich they can be utilizated as a dietary protein supplement for animal feed, however the meal production is an expensive process, requiring significant amounts of energy. Generally, the feathers are steam pressure cooked and chemically treated before use. Therefore, the microbial degradation of feathers represents an alternative technology to improve the nutritional value of feathers as wastes. Therefore in native state, keratin is not degradable by common proteolytic enzymes, its degradation by microorganisms is performed by specific proteases (keratinases). The objective this work was study the production of the enzyme keratinase produced for strain *Bacillus amyloliquefaciens* isolated of poultry processing plant, this strain showed efficient for application in biotechnological processes. The keratinase production and cell growth were affected by cultivation conditions. The results obtained under optimal conditions were 40ºC, 150 rpm, 1% of feather, pH 7.5. The results showed that the release of amino acids evidenced for the chromatography in thin layer, in the broth of the culture of *Bacillus amyloliquefaciens* can allow its use in the industries of animal ration (meal feather). The enzyme was partially purified, this was inhibited by EDTA belong the metaloproteases.

Abstract: Keratinase, Keratin, biodegradation, isolation, purification.

3. Introdução e Justificativa

A carne de frango é um dos produtos mais destacados nas exportações do complexo de proteína animal do Brasil. Nos últimos 25 anos, a avicultura brasileira consolidou seu crescimento e hoje é o terceiro maior produtor mundial de frangos, precedido pelos Estados Unidos e pela China.

Segundo o USDA (Departamento de Agricultura dos EUA), o Brasil manteve a primeira posição de país exportador em 2007 suplantando os Estados Unidos em 18% e com crescimento de 10% em relação ao ano anterior.

Os maiores mercados, ou seja, os maiores importadores são: Rússia, Japão, União Européia, Arábia Saudita, África do Sul, Emirados Árabes e Hong Kong.

A produção nacional de carne de frango tem sido crescente. No ano de 2007, cresceu 10,2%, com produção correspondente a 951 mil toneladas. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a produção de 2008, apresentará um aumento de mais de 7,5%.

O aumento das exportações não prejudicou o consumo nacional que também é crescente (de 2002 a 2007 o consumo per cápita cresceu de 33,4 kg/ano para 37,2 kg/ano). O aumento de produção de 38,3% no período permitiu aumentar as exportações, absorver o aumento populacional e sustentar o aumento do consumo individual.

Em relação à produção, o estado do Paraná é o maior produtor de frango, seguido de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. Porém, estes quatro estados, que são os produtores tradicionais do Brasil, têm participação decrescente, devido à expansão da avicultura pelo Centro-Oeste e outras regiões do Brasil. (www.cepa.epagri.sc.gov.br).

Como observado, esta grande demanda no consumo de carnes de frangos gera resíduos, tais como as penas. Estas no ambiente sofrem lenta deteriorização, originando compostos sulfurosos de odor desagradável, acarretando em um problema ambiental.

Uma alternativa para diminuir o impacto ambiental é o desenvolvimento de processos para a utilização deste resíduo como ração animal. O processamento biotecnológico de penas para a produção de ração animal, em contraposição ao seu

processamento químico, oferece vantagens relacionadas ao enriquecimento protéico das penas pela própria biomassa microbiana, a não destruição de aminoácidos essenciais tais como metionina, lisina, histidina, encontrados em níveis sub-ótimos (ONIFADE, et al. 1998). Deve-se ressaltar que a utilização de restos de penas constitui uma solução ecológica, evitando seu acúmulo no meio ambiente e o desenvolvimento de vários tipos de patógenos (SINGH, 1999).

Não só a indústria de processamento de aves, mas também a do processamento do couro é uma atividade industrial importante no Brasil, totalizando 373 estabelecimentos curtidores, sendo que, 44% localizam-se na região sul, 34% na região sudeste e os restantes 22% distribuem-se nas demais regiões. O Brasil exporta 45% do couro, sendo 20% sob a forma de calçado (IGNATOVA, et al. 1999). Esta atividade também gera resíduos, porém este segmento vem fazendo uso das queratinases, as quais são empregadas para depilar a pele durante o processamento do couro. Esta tecnologia vem se estabelecendo como uma opção viável pela sua efetividade e pela preocupação em relação ao meio ambiente, produzindo efluentes com menor impacto ambiental. Neste contexto, a depilação que emprega queratinases tem sido usada em curtumes, substituindo parcial ou totalmente o uso de sulfetos.

Além destas aplicações, a farinha de penas pode ser utilizada na agricultura como um fertilizante nitrogenado, com dois propósitos, melhorar o crescimento da planta e intensificar a atividade microbiana do solo (HADAS e KAUTSKY, 1994).

Enzimas proteolíticas são largamente utilizadas em detergentes, sendo aproximadamente 89% destas constituídas de proteases alcalinas, sendo assim, a enzima queratinase pode ajudar a remover partículas de queratina que podem causar entupimento de ralos e filtros. Além destas aplicações, pode-se incluir a digestão anaeróbia de resíduos de granja (penas) para geração de gás natural como combustível. Queratinases também tem aplicação na medicina e indústria farmacêutica, podendo ser empregada para eliminar acne, calos humanos (GUPTA e RAMNANI, 2006).

Como pode ser observado, a crescente preocupação com o meio ambiente, aliado ao surgimento de novas tecnologias na conversão desses resíduos em

matéria prima, têm motivado o estudo de microrganismos degradadores de queratina, agregando a esses resíduos grande valor econômico e beneficiando o meio ambiente.

4. Objetivo

O presente projeto teve como objetivo o isolamento e estudo das condições de crescimento e produção da enzima queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens*, assim como a purificação parcial da enzima e sua caracterização.

5. Revisão de Literatura

5.1 Queratina

A queratina é uma macromolécula que tem funções estruturais e protetoras, sendo a principal constituinte de unhas, chifres, cascos, cabelo, lã e pele de mamíferos, bico e penas de aves e outras estruturas epidérmicas. Estas foram vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica (BUSSON et al. 1999).

Esta proteína é composta por uma longa cadeia de polipeptídeo, a qual é resistente à atividade de proteases não específicas para esse substrato. As cadeias adjacentes estão ligadas por pontes dissulfeto, as quais são responsáveis pela estabilidade e resistência à degradação da queratina (SAFRANECK e GOOS, 1982).

As queratinas são diversificadas em estrutura molecular. As α e β queratinas têm sido amplamente estudadas e historicamente consideradas convergentes em termos de estrutura e função. No entanto há pouca similaridade em seqüência e muitas diferenças moleculares entre elas. As α queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores enquanto as β são encontradas exclusivamente em répteis e aves (BRUSH, 1996).

Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina e papaína (FARAG e HASSAN, 2004; WILLIAMS et at. 1990). Esta resistência ocorre não só pelo fato da composição e configuração molecular dos aminoácidos constituintes responsáveis pela sua rigidez, como também pelo fato da cadeia da queratina ser firmemente enovelada em α-hélice, caso da α queratina ou β-folha, caso da β queratina (RIFFEL et al. 2003). Além dos motivos citados, essa proteína apresenta um alto grau de ligações cruzadas [ligações dissulfeto (cistina)], pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas também contribuem para sua resistência à degradação (LIN et al. 1992).

A estrutura primária da molécula da β queratina consiste em uma longa seqüência de polipeptídios que alternam resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Como resultado, as

glicinas situam-se na porção superior do plano da folha β pregueada enquanto outros resíduos ficam abaixo do plano. Pares de folhas pregueadas então empacotam-se perfeitamente. Não há formação de pontes dissulfeto neste estágio sendo a estabilização permitida por pontes de hidrogênio. A associação linear de monômeros forma então os microfilamentos e a associação destes, estabilizada por pontes dissulfeto, formará as fibras de β queratina (GARRET e GRISHAM, 1995).

A estabilidade mecânica e a baixa degradabilidade apresentada pela queratina resultam da organização de suas cadeias polipeptídicas, com estrutura secundária em α-hélice (α-queratina) ou em folha pregueada (β-queratina), em estruturas compactas estabilizadas por um grande número de pontes dissulfeto intercadeias. A formação destas ligações cruzadas é favorecida pela abundância de resíduos de cisteína, as interações químicas como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, também contribuem para esta alta estabilidade (SAID e PIETRO, 2004).

5.2 Penas de frango: características e aproveitamento

Penas, o material queratinoso mais abundante na natureza, são importantes para o isolamento térmico, locomoção (vôo) e conformação estrutural para os pássaros. Todavia, possíveis aplicações biotecnológicas das mesmas são sub-aproveitadas devido a sua resistência a degradação (ONIFADE et al., 1998).

O maior componente das penas é a β - queratina (SUH e LEE, 2001; ZERDANI et al. 2004; THYS et al. 2004; LIN et al. 1999; RAMNANI e GUPTA, 2004; ICHIDA et al. 2001).

ZERDANI et al. (2004) caracterizando a composição química dos resíduos de penas verificaram que o conteúdo de proteínas é alto comparado com outros resíduos animais (valor médio de 81%), sendo o conteúdo de gordura e cinzas respectivamente de 1,2% e 1,3%. Com base nessa composição química, eles concluíram que as penas residuais constituem um meio balanceado, que pode não precisar de outros nutrientes para o cultivo de microrganismos decompositores.

A biodegradação de penas representa um método para melhorar a utilização destas como proteína alimentar (LIN et al. 1992), já que penas de aves domésticas

armazenam uma grande quantidade de aminoácidos potencialmente úteis, que poderiam ser utilizados em rações animais econômicas, já que elas são uma fonte de aminoácidos raros como serina, cisteína e prolina. NAM et al. (2002) estudando a degradação das penas pela bactéria anaeróbia termofílica *Fervidobacterium islandicum* AW-1, 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. SZABO et al. (2000) pesquisando a cepa termotolerante de *Streptomyces graminofaciens* encontraram uma porcentagem maior de aminoácidos como arginina e treonina.

A degradação das penas também poderia ser utilizada no desenvolvimento de fertilizantes com liberação lenta de nitrogênio (THYS et. al 2004).

As penas constituem até 10% do peso total de frangos, alcançando valores superiores altos como subproduto da indústria de aves domésticas. Esse material excessivo é na maioria das vezes descartado, sendo um material de difícil degradação que pode se tornar um problema ambiental (GRAZZIOTIN et al. 2005).

Sabe-se que na produção de enzimas industriais, até 30 - 40% do custo de produção são devido ao substrato de crescimento do microrganismo produtor. Por isso, o uso das penas, um substrato facilmente disponível e barato, poderia resultar em uma redução substancial no custo da produção enzimática (GESSESSE et al. 2003). Logo, a utilização das penas de aves domésticas como um substrato para a fermentação de microrganismos que degradam queratina oferece uma possível tecnologia microbiana para a obtenção de enzimas proteolíticas (BERNAL et al. 2003).

Sabe-se que a composição de aminoácidos da queratina de diferentes espécies de aves é muito similar aquela observada em diversas penas de galinhas (SANGALI e BRANDELLI, 2000).

Dados obtidos por Suntornsuk e Suntornsuk (2003) mostram que a digestibilidade de penas por pepsina foi significativamente maior quando da adição da enzima do que aquelas sem a adição da mesma, mostrando que a estrutura das

penas de galinhas foi alterada pela atividade enzimática, permitindo assim uma fonte de proteínas digerível para animais.

NAM et al. (2002) verificaram que a bactéria *Fervidobacterium islandicum* AW-1 não apenas degradou as penas como também modificou a estrutura da queratina das mesmas. Isso poderia alterar a resistência da queratina às enzimas digestivas de animais consumidores, aumentando assim a digestibilidade das penas.

Goldstein et al. (2004) concluíram em seu trabalho que a bactéria *Bacillus licheniformis* degrada as penas brancas mais rapidamente do que as penas pretas, o que seria explicado pelo fato da presença da melanina nas penas pretas dificultar a ação enzimática da queratinase secretada por essa bactéria.

A utilização de restos de penas constitui uma solução ecológica na medida em que seu acúmulo pode ser a causa de poluição, além de favorecer o desenvolvimento de vários tipos de patógenos (SINGH, 1999; SHAWKEY et al. 2003).

Por tudo que foi exposto, observa-se que o reaproveitamento das penas é um assunto de interesse devido ao seu potencial como uma fonte alimentar protéica alternativa e de valor baixo (ONIFADE et al. 1998).

O processo atual para obter farinha de penas, que utiliza vapor pressurizado resultante do cozimento, é caro, já que requer uma quantidade significativa de energia, e, além disso, destrói certos aminoácidos essenciais nutricionalmente importantes como metionina, lisina e triptofano, resultando em um produto de baixa digestibilidade e nutrientes de qualidade variável (WILLIAMS et al. 1990; SANGALI e BRANDELLI, 2000; NITISINPRASERT et al. 1999; NAM et al. 2002).

FARAG e HASSAN (2004) sugeriram a utilização de um biorreator com queratinase imobilizada capaz de converter penas moídas em peptídeos e aminoácidos, os quais poderiam ser separados por cromatografia de troca iônica ou filtração em gel. Geralmente a imobilização provoca uma estabilidade da queratinase ao calor, aumenta sua tolerância a variações de pH, além de melhorar a sua estabilidade (LIN et al. 1996; WANG et al. 2003). Entretanto, WANG et al. (2003) constataram velocidade de reação mais baixas do que aquelas realizadas utilizando a enzima livre.

5.3 Classificação das proteases e mecanismos de ação das queratinases

A clivagem proteolítica de seqüências de peptídeos é uma das mais freqüentes e importantes modificações de proteínas. As enzimas proteolíticas ou proteases promovem clivagens das ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, pertencente à classe das hidrolases (NEURATH 1989).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases pertencem a classe 3 (hidrolases) e sub classe 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As enzimas da sub classe EC 3.4 podem ser subseqüentemente classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-99), por clivarem as ligações peptídicas das extremidades ou do interior da cadeia polipeptídica, respectivamente. (ELBA e VERMELHO, 2004).

As exopeptidases podem ainda ser classificadas como aminopeptidases e carboxipeptidases de acordo com a sua atuação na região N- ou C- terminal da proteína, respectivamente. Aquelas que atuam na região N- terminal podem liberar um único aminoácido (aminopeptidase EC 3.4.11), um dipeptídeo ou um tripeptídeo (EC 3.4.14). As carboxipeptidase podem liberar um único aminoácido ou um dipeptídeo). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica. As proteases com atividade queratinolítica descritas na literatura são, em sua maioria, endopeptidases, embora também já tenham sido descritas exopeptidases do tipo aminopeptidases (RUFFIN, et al. 1979).

Inicialmente, as proteases eram classificadas quanto a sua massa molar, carga e especificidade de seus substratos. Porém, Barret (1940) propôs outro sistema de classificação baseado na composição do sítio ativo e em seu mecanismo enzimático. Neste sistema, as exopeptidases, como já dito proteases que promovem a clivagem de peptídeos terminais e as endopeptidases, aquelas que clivam os peptídeos em locais distantes das extremidades da cadeia, são divididas em subclasses, de acordo com seu mecanismo catalítico.

Quatro classes de proteases são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as quais compreendem seis famílias. Cada família

possui um grupo característico de resíduos de aminoácidos funcionais, agrupados em uma configuração particular para formar o sítio ativo (NEURATH, 1986).

As aspartil proteases ou aspártico proteases são definidas como proteases que dependem diretamente de aspartato no sítio ativo para catálise, estas incluem a pepsina de mamíferos, a renina, a quimosina e certas proteases fúngicas.

As cisteíno proteases são enzimas nas quais o grupo tiol de um resíduo de cistéina age como nucleófilo na catálise. As papaínas são os grupos mais estudados desta família.

As metaloproteases são as enzimas dependentes de íons metálicos para a catálise, estas enzimas formam o grupo mais diversificado dentre as proteases.

A família melhor caracterizada e fisiologicamente mais versátil é das serino proteases, estas dependem da presença de um resíduo de serina no sítio ativo para a atividade catalítica (RAWLINGS e BARRETT, 1995).

As queratinases (E.C. 3.4.99.11) constituem um grupo de proteinases cujo mecanismo de ação catalítica não está elucida, estas são importantes por hidrolisarem cabelo, penas, colágeno e desobstruírem sistemas de esgoto durante o tratamento de águas residuárias (CHITTE et al. 1999). Essas enzimas também são aplicadas nas indústrias de alimentos, têxteis, de couro, na medicina, em cosméticos e no processamento industrial de aves domésticas (FARAG e HASSAN, 2004). Na medicina, a enzima é utilizada na eliminação da queratina nos casos de acne ou psoríase e na eliminação de calos humanos (VIGNARDET et al. 2001).

A maioria das queratinases requer a presença de queratina como indutor. Várias atividades queratinolíticas microbianas e especificidades enzimáticas por substratos são descritas na literatura (SANGALI e BRANDELLI, 2000; ALLPRESS et al. 2002; BERNAL et al. 2003; CHENG et al. 1995; CHITTE et al. 1999; YU et al. 1968). Tal fato pode ser devido às diferenças entre as espécies e a metodologia utilizada. Existem queratinases que atuam sobre vários substratos, como aquela de *Bacillus licheniformis* (que age sobre soroalbumina bovina, colágeno, elastina e queratina de penas) até aquelas que hidrolizam apenas queratina (LIN et al., 1992; CHITTE et al. 1999).

As queratinases descritas na literatura são, em sua maioria, serina-proteases, moderadamente termofílicas (45-90^{o}C) e alcalinas (pH 7,5-10) e existem poucas informações sobre as condições físico-químicas que melhoram a secreção dessas enzimas queratinolíticas (BERNAL et al. 2003).

Muitas queratinases são ativas extracelularmente, sendo exportadas do local de síntese dentro da célula para agirem no meio externo. Entretanto, a literatura tem citado evidências de atividade associada à célula, como no caso das proteases de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (ONIFADE et al. 1998).

Apesar da falta de um completo entendimento sobre a ação das queratinases, evidências apontam para a provável existência dos seguintes processos em fungos e actinomicetos: queratinólise mecânica, sulfitólise e proteólise. Nesses microrganismos, a queratinólise se inicia com o crescimento do micélio, gerando pressão e penetração, o que expõe outros locais à ação das enzimas. Em seguida, ocorre liberação de sulfito devido à quebra das pontes dissulfeto e finalmente proteólise (ONIFADE et al. 1998). O mecanismo de ação das proteases queratinolíticas bacterianas permanece desconhecido ou pouco compreendido (KIM et al. 2001; NAM et al. 2002).

Yamamura et al. (2002) propuseram o seguinte mecanismo de ação para a degradação da queratina pela bactéria *Stenotrophomonas sp*: as ligações dissulfeto da queratina são atacadas primeiro pela proteína semelhante a uma dissulfeto redutase, produzindo uma proteína parcialmente fragmentada, que é um bom substrato para a protease.

Bockle e Muller (1997) fizeram uma distinção entre a desintegração inicial do complexo queratinoso dos órgãos, tais como penas de galinhas, até pequenas sub-estrutura e a dissolução completa da queratina. Segundo o autor, a desintegração inicial pode ser causada por proteases agindo na matriz queratina, ao passo que o ataque à estrutura quase cristalina dessa proteína necessita de um mecanismo degradativo adicional. Em seus estudos, os autores verificaram que a redução das ligações dissulfeto é dependente da presença de células metabolicamente ativas. Células com baixo potencial de membrana podem exercer um papel importante na degradação da queratina pela redução nas ligações dissulfeto na queratina ou pela

produção de agentes redutores solúveis que reagem na superfície da mesma, tornando a cadeia protéica disponível para a clivagem por proteases. Apesar de não terem observado nenhum contato permanente entre o micélio e as partículas de queratina, o que tornaria a redução direta na superfície do substrato improvável, os autores não excluem a possibilidade da redução ocorrer por um contato ligeiro entre o micélio e o substrato.

A clivagem enzimática das ligações peptídicas da queratina é difícil devido à interação restrita entre enzima e substrato na superfície das partículas de queratina. A habilidade das proteases queratinolíticas pode ser devida à especificidade por substratos compactos e um sítio ativo mais exposto. Estudos moleculares com quitinases, celulases e xilanases, as quais agem em substratos compactos, têm mostrado a existência de domínios hidrofóbicos que podem facilitar a interação com diferentes substratos de alta massa molar (BOCKLE et al. 1995). Esses mesmos autores concluíram que as pontes de cistina, presentes na estrutura da queratina, previnem a degradação proteolítica da maioria das áreas compactas dos tecidos queratinosos, portanto, uma clivagem adicional dessas ligações dissulfeto parece ser indispensável para tornar essas proteínas disponíveis para as enzimas hidrolíticas.

5.4 Microrganismos produtores de queratinase e produção da enzima

O uso de penas como substrato fermentecível implica na secreção por parte dos microrganismos, de queratinases capazes de degradá-las. Este fenômeno está associado à necessidade do microrganismo em hidrolisar substratos protéicos de grande tamanho em moléculas pequenas para aproveitamento como fonte de nutrientes. Entre os microrganismos com atividade queratinolítica encontra-se fungos (BOCKLE et al. 1995, SANTOS et al. 1996) e bactérias (WILLIANS et al. 1990, COELLO e VIDAL, 2001).

Vários estudos têm sido realizados com a intenção de isolar microrganismos queratinolíticos e estudar as condições ótimas para produção da enzima queratinase, e isto se deve ao fato desta enzima poder ser empregada na indústria de processamento do couro, para depilação do couro, além de poder ser utilizada

para degradar as penas descartadas pela indústria de frangos, sendo esta convertida em aminoácidos e utilizadas na nutrição animal.

Devido a este fato, queratinases de vários microrganismos têm sido purificadas e caracterizadas até o momento, como pode ser visto na Tabela 1. Dependendo da espécie do microrganismo produtor, as propriedades físico-químicas das enzimas têm se mostrado bastante diversa. Já foram encontradas enzimas de massas molares de 18 KDa (BRESSOLIER et. al. 1999) e também maiores de 200 KDa (NAM et al. 2002) sendo a maioria delas pertencentes á classe das serinas proteases, porém metalopeptidases também têm sido caracterizadas. Os pHs e temperaturas de maior atividade também variam bastante, de 5,5 (QIN et al. 1992) a 10,0 (BERNAL et al. 1995) e 30°C (MUKHOPADHYAH e CHANDRA, 1990) até 100°C (NAM et al. 2002) respectivamente.

Tabela 1: Características das queratinases secretadas por alguns microrganismos

Microrganismo	**Classe**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**Referência**
Baccilus licheniformes	Serina-protease	7,5	50	Lin, et al. (1992)
Baccilus sp SCP-3	Metalopro-teinase	7,0	40	Lee, et al. (2002)
Baccilus licheniformes	Tiol	8,5	52	Rozs et al. (2001)
Baccilus subtilis KS-1	Serina	-	-	Suh e Lee (2001)
Baccilus sp. SCB3	Metalo	7,0	40	Lee et al. (2002)
Lysobacter NCIMB 949	Metaloprotei-nase	-	50	Alpress, et al.(2002)
Vibrio sp	-	6,0	30	Sangali, et. al. (2000)
Streptomyces sp.	-	7,5	30	Mukhopadhyah e Chandra (1990)
Streptomyces albidoflavus	Serina	6,0-9,5	40-70	Bressolier et al., (1999)
Streptomyces pactum	Serina-proteinase	7,0-10,0	40-75	Bockle, et al. (1995)
Kocurea Rósea	Serina	10,0	40	Bernal et al. (1995)
Microsporum canis	Metalo	8,0	50	Brouta et al. (2001)
Fervidobacterium islandicum AW-1	Serina	9,0	100	Nan et al. (2002)
Stenotrophomonas sp	Serina	8,0-9,0	-	Yamamura et al. (2002)
Streptomyces sp	-	8,5	50	Oliveira et al. (2006)

Diversos microrganismos podem sintetizar a enzima queratinase, portanto, o isolamento de microrganismos que produzam enzimas queratinolíticas mais resistentes, específicas e termoestáveis a fim de serem aplicadas na indústria tem sido realizado com o interesse de diminuir possíveis impactos ambientais (RIESSEN e ANTRANIKIAN, 2001).

Embora essa proteína possa ser produzida a partir de fungos e bactérias, a procura por queratinase bacteriana tem sido intensa, podendo citar como exemplo, serina proteases produzidas por *Bacillus licheniformes* PWD-1 (LIN et al. 1997), *Streptomyces fraidae* (ELMAYERGI e SMITH 1971), e recentemente uma espécie de *Flavobacteria* (RIFFEL e BRANDELLI, 2002).

Em anos recentes, bactérias anaeróbicas termofílicas demonstraram atividade queratinolítica (NAM et. al. 2002; RIESSEN e ANTRANIKIAN, 2001). Ambos os trabalhos estudaram bactérias isoladas de fontes de água geotermais, sendo que a apresentada no artigo de RIESSEN e ANTRANIKIAN (2001) foi à primeira do gênero *Thermoanaerobacter* a ser descrita como capaz de degradar queratina.

Friedrich et al. (1999), estudaram várias espécies de fungos produtores de queratinases, utilizando em seus experimentos placas de ágar contendo queratina insolúvel. Os produtores mais ativos da enzima foram fungos dos gêneros *Fusarium, Acremonium e Geotrichum*. Quando em cultura submersa*, Aspergillus flavus* foi o melhor produtor de queratinase extracelular, seguido por *Altenaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotrys atra.* Além destes, outros fungos causadores de infecções na pele foram estudados, como os do gênero *Microsporum* e leveduras do gênero *Candida*.

Lucas et al. (2003) observaram a diversidade de bactérias queratinolíticas ativas encontradas em solos de regiões temperadas. Os autores isolaram 33 microrganismos capazes de crescer em penas como única fonte de nutriente, os quais foram agrupados filogeneticamente em 13 grupos: quatro apresentaram-se gram positivos, dois pertencentes ao grupo *Cytophaga flavobacterium* e o restante ao grupo Proteobactérias. Com isso, demonstrou-se que a diversidade de microrganismos queratinolíticos é grande, já que nenhum dos isolados ativos havia sido associados à queratinólise.

Outros fungos isolados, produtores de queratinase são: *Trichophyton mentagrophytes* (YU et al. 1968, MUHSIN e AUBAID, 2000), *Trichophyton simii* (SINGH, 1997), *Malbranchea gypsea* (SINGH, 1999) e mais recentemente, *Aspergillus oryzae* (FARAG e HASSAN, 2004).

Bactérias dos gêneros *Lysobacter e Kocuria* também foram alvo de pesquisa (ALLPRESS et al. 2002, BERNAL et al. 2003), além destas Sangalli e Brandelli, (2000) isolaram bactérias dos gêneros *Vibrio* e *Chryseobacterium* a partir de resíduos do processamento de aves.

Kim et al. (2001), isolaram bactérias de resíduos de processamento de aves domésticas sendo que *Bacillus subtilis, Bacillus pumilis e Bacillus cereus* foram as que degradaram penas de forma mais eficaz.

Riffel e Brandelli (2002) isolaram e caracterizaram a partir de resíduos de um abatedouro de frango uma *Flavobacteria* sp, esta apresentou alta atividade queratinolitica, após crescimento em meio seletivo de farinha de penas. Segundo os autores a atividade proteolítica foi máxima na faixa de temperatura de 30^{o}C a 37^{o}C, sendo que, o aumento do pH durante seu cultivo foi indicativo do potencial enzimático do microrganismo.

Mais de 300 espécies de fungos foram estudadas por Friedrich et al. (1999), sendo os fungos isolados principalmente do ar (França) ou solo (Ásia, Europa e África), mostrando os representantes do gênero *Fusarium, Acremonium*, e *Geotrichum* serem potenciais produtores. Quando cultivados em meios de cultura utilizando unha de porco como única fonte de carbono e nitrogênio, outros fungos provaram ter maior potencial, dentre eles *Aspergilllus flavus* foi o maior produtor de queratinase extracelular, seguido de *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotrys atra*.

Letourneau et al. (1998) isolaram a partir de penas naturalmente degradadas, uma cepa de *Streptomyces* sp. com elevada atividade queratinolitica quando cultivada em meio de farinha de penas. A máxima degradação da queratina foi observada a 70^{o}C e pH 10.0. Os autores observaram que a atividade queratinolitica foi parcialmente inibida por EDTA e PSMF. Ao fazerem um estudo comparativo entre as atividades proteolíticas derivadas desta nova cepa (SK1-02) com proteases

comerciais, os autores indicaram que esta cepa poderia ser uma ferramenta útil para o tratamento tanto de resíduos contendo queratina como no processo de depilação na indústria de couros.

Quanto à produção da enzima, nos meios de cultura, as penas funcionam como fonte de carbono e energia para o crescimento do microrganismo. As penas adicionadas ao meio de cultivo podem ser tanto inteiras (RIFFEL et al. 2003, SANGALI e BRANDELLI, 2000; RIFFEL e BRANDELLI, 2002; THYS et al. 2004; BOCKLE et al. 1995; RAMNANI e GUPTA, 2004) como moídas até um pó fino (WILLIAMS et al. 1990; KIM et al. 2001; LIN et al. 1992; CHENG et al. 1995; SUH e LEE, 2001; SZABO et al. 2000; NITISINPRASERT et al. 1999) sendo que, neste caso, o ato de moê-las resulta na clivagem das ligações dissulfeto, o que torna a proteína mais susceptível à digestão proteolítica por proteases tais como tripsina (LONGSHAW et al. 2002). SZABO et al. (2000), entretanto, comparando a cepa de *Streptomyces graminofaciens* com outras utilizadas anteriormente foi observado que a queratinase dessa bactéria parece ser mais eficiente na digestão de penas não-moídas.

Cheng et al. (1995), utilizaram pó de penas como indutor para produção da enzima queratinase por *Bacillus licheniformes* PWD-1, após 30 horas de fermentação sob aeração 0,5 vvm, a enzima foi obtida por centrifugação, e sua atividade queratinolítica determinada por incubação da enzima juntamente com pó de penas por 1 hora a 45^{o}C. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético, e o substrato foi removido por centrifugação, sendo a absorbância do sobrenadante medida a 275 nm. A unidade de atividade queratinolitica foi expressa como µmol de tirosina por minuto. A máxima indução da enzima foi obtida a 45^{o}C, a massa molar da enzima foi determinada como sendo 31,4 KDa, e a temperatura ótima de catálise foi observada entre 50 e 55^{o}C.

Nitisinprasert et al. (1999) estudando duas cepas isoladas de resíduos de aves domésticas e solo, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus* observaram que ambas exercem uma ação sinergística na degradação das penas.

As condições que afetam a degradação de penas pela cepa *Bacillus* sp foram estudadas por Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Os resultados mostraram que as

penas foram quase que totalmente degradadas quando utlizadas inteiras a 1%, 5% de inóculo, temperatura de 37°C e agitação de 250 rpm. O efeito da glicose, metanol, tween 80 e triton X-100, também foram estudadas no processo de fermentação, comprovando-se que os mesmos não exerceram efeito na degradação. Quando avaliado o efeito do pH na porcentagem de degradação, observou-se que o pH 9.0 foi o que favoreceu um maior crescimento celular (100 UFC/mL), resultando em uma atividade enzimática 2 U/mL. Quanto ao valor nutricional das penas degradadas, constatou-se que esta apresentou um conteúdo fraco de aminoácidos quando comparado à pena não tratada, possivelmente porque a biomassa somou-se ao resíduo.

Szabo et al. (2000) isolaram uma cepa de *Streptomyces graminofaciens* termotolerante, os autores ressaltam que a cepa utilizou penas trituradas como única fonte de carbono e nitrogênio, porém 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 pena a degradação foi mais rápida (24-48 h), quando utilizada concentração de 10% a degradação ocorreu mais lentamente e apresentou seu ápice com uma semana de cultivo.

A cepa de *Microbacterium* foi isolada de uma indústria de processamento de frangos nos estudos realizados por Thys et al. (2004), esta apresentou alta atividade queratinolítica quando cultivada em meio de cultura contendo penas inteiras. A bactéria apresentou crescimento ótimo e produção da enzima em pH 7.0 e 30°C. Os autores observaram que a atividade da enzima aumentou com o tempo de fermentação, sendo que com 36 h ocorreu maior atividade (40 U/mL), quando glicose ou lactose foi adicionada ao meio de cultura, não foi constatado atividade enzimática.

Anbu et al. (2006) trabalharam com a cepa de *Scopulariopsis brevicaulis*, os autores observaram que a maior atividade foi obtida a pH 7.2, 30°C. A produção da enzima foi aumentada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%), nitrato de sódio (2%), penas (1,5%) e $CaCl_2$ (1mM), obtendo assim, uma atividade de 6,2 U/mL.

Gessesse et al. (2003) isolaram duas bactérias alcalofílicas produtoras de queratinase. As bactérias cresceram e produziram a enzima utilizando penas como única fonte de carbono e nitrogênio. A adição de 0,5% de glicose no meio de cultura aumentou a produção da enzima produzida por *Bacillus pseudofirmus* e suprimiu a produção da enzima sintetizada por *Nesternkoria* sp.

Dois substratos são comumente usados na determinação da atividade da enzima queratinase, sendo o adquirido comercialmente (Sigma) e o sintetizado em laboratório.

Bressolier et al. (1999), utilizaram Keratin azure ou azoqueratina (azoqueratina comercial) na determinação da atividade queratinolítica de *Streptomyces albidoflavus.* Uma amostra da protease foi incubada com 4mg do substrato (Sigma - Aldrich) em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 nM (pH 8.5) a 50ºC por 1hora em agitação constante de 900 rpm, sendo que a absorbância foi realizada à 595 nm.

Suntornsuk e Suntornsuk (2003) utilizaram em seus estudos substrato comercial (Sigma), os autores trabalharam com a cepa *Bacillus* sp FK 46. Nos ensaios de atividade queratinolítica, o substrato foi adicionado em 0,01 M de tampão Tris-HCl, pH 7.5 com uma concentração de 4mg/mL. A reação foi realizada a 50 ºC, 300 rpm por 1 hora.

Riffel e Brandelli (2002) sintetizaram a azoqueratina utilizada como substrato, sendo que a metodologia utilizada foi a de Tomarelli et al. (1949). A solução para determinação da atividade queratinolítica foi composta por 100 µl de solução enzimática e 500 µl de uma solução de azoqueratina 20g/L em tampão Tris HCl 50 mM pH 8.0. A mistura foi incubada a 50ºC por 15 minutos, em seguida a reação foi interrompida com adição de ácido tricloroacético 100 g/L. A absorbância foi realizada a 440nm. Outros autores optaram por utilizar azoqueratina sintetizada em laboratório sendo eles: El-Refai et al. (2005), Lin et al. (1999), Brandelli e Riffel (2005), Yamamaura et al. (2002), Suh e Lee (2001), Ramnani et al. (2005), Wang e Shih (1999).

5.5 Produção da enzima queratinase em reator

As fermentações realizadas em reator podem ser classificadas pela maneira como o substrato é adicionado ao reator e o produto de interesse retirado do mesmo. Assim sendo, existem três grupos de processos fermentativos. Abaixo será discutido o processo utilizado neste estudo.

Fermentação em batelada:

Uma fermentação em batelada pode ser considerada um sistema fechado. No tempo t=0 a solução de nutrientes estéril é adicionada ao fermentador/reator, este é inoculado com o microrganismo de interesse e a fermentação é conduzida sob condições ideais. Em todo o processo descrito, nenhum nutriente é adicionado até o final da fermentação, exceto oxigênio, um agente antiespumante e uma base ou ácido para controle do pH. Geralmente a concentração da biomassa e metabólitos, mudam constantemente como resultado do metabolismo das células. Após a inoculação de um microrganismo no meio de cultura a ser fermentado observam-se quatro fases típicas:

Fase 1 (Lag): Caracterizada pelo equilíbrio físico-químico entre o microrganismo e o ambiente. Nesta fase, o microrganismo adapta seu sistema metabólico para as condições oferecidas, apresentando, portanto, um crescimento reduzido.

Fase 2 (Fase exponencial): O crescimento pode ser descrito quantitativamente como uma duplicação do número de células por unidade de tempo. Embora haja alteração do meio através da absorção de substrato e liberação de metabólitos pelas células, a taxa de crescimento permanece constante. Esta taxa de crescimento é independente da concentração de substrato.

Fase 3 (Estacionária): Assim que o substrato for consumido e/ou produtos tóxicos forem liberados, o crescimento diminui ou cessa completamente. A biomassa aumenta apenas gradualmente ou permanece constante. Devido á lise, novos substratos são liberados e podem servir como fonte de energia para este reduzido crescimento das células sobreviventes. Os metabólitos formados nesta fase são geralmente, de interesse biotecnológico.

Fase 4 (Declínio): Nesta fase as reservas de energia das células estão exauridas, s células morrem a uma taxa exponencial. Geralmente a fermentação é interrompida ao final da fase log ou quando a fase de lise celular se inicia (PUMPHREY e JULIEN, 1996).

O processo descrito acima, geralmente ocorre em uma fermentação, seja ela realizada em frascos ou em um reator sob condições controladas.

São poucos os estudos sobre produção de queratinase utilizando-se reator, as fermentações geralmente são conduzidas em frascos, porém quando realizada em fermentador há a possibilidade de controle de certos parâmetros, como por exemplo, controle de pH, aeração, agitação e suplementação de nutrientes durante o processo fermentativo, o que pode resultar em maior produção da enzima.

Coello et al. (2002) trabalharam com a cepa de *Kocurea rosea* isolada de solo. A cepa foi cultivada em fermentador Bioflow (New Brunswick Scientific) com capacidade de 5 litros de meio de cultura. O meio de cultura foi descrito por Willians et al, (1990) o qual foi constituído de: (g/L) NH_4Cl 0,5, NaCl 0,5, K_2HPO_4 0,3, KH_2HPO_4 0,4, MgCl 0,1, extrato de levedura 0,1 (pH 7.5), este foi suplementado com 20g/l de penas inteiras. O volume de meio de cultura utilizado foi de 4 litros, sendo que as condições de cultivo foram: 40°C, 1,8 vvm, 400 rpm e porcentagem de inóculo 10%, durante 24 h. Os autores utilizaram como substrato azoqueratina (Sigma) para determinação da atividade enzimática. Nestas condições a enzima apresentou uma atividade de 51 U/mg, além de ter sido constatada atividades colagenolítica e elastinolítica.

Letourneau et al. (1997) utilizaram em seus estudos um reator com capacidade de 2 litros de meio de cultura. Os autores trabalharam com a cepa de S*treptomyces* sp SK, sendo que o meio de cultivo utilizado continha (g/L) NH_4Cl 0,5, $CaCl_2$ 0,22, $MgSO_4.7H_2O$ 0,2, K_2HPO_4 0,3, KH_2PO_4 0,4, extrato de levedura 0,2. O microrganismo foi cultivado a 30°C, 500 rpm e uma aeração de 60 L/h e pH inicial 7.5. O volume de meio utilizado foi 1 litro. A atividade enzimática foi determinada utilizando azoqueratina (Sigma). Os autores não reportaram qual a atividade alcançada nestas condições, utilizando estes dados como atividade relativa, já que

realizaram a caracterização da enzima em diferentes pHs, temperatura e presença de substâncias químicas.

A cepa de *Kocurea rósea* foi utilizada no trabalho conduzido por Bernal et al. (2003), sendo cultivada em fermentador New Brunswick com capacidade de 5 litros de meio de cultura sob as condições de 40°C, 400 rpm, 1,8 vvm durante 24 h. O meio de cultura utilizado foi o descrito por Willians et al., (1990) acrescido de 2% (p/v) de penas moídas. Os autores não apresentaram os resultados de atividade da enzima obtidos na fermentação realizado em reator, somente os realizados em shaker.

Wang et al. (1999) estudaram a produção da enzima queratinase por *Bacillus licheniformes*. A fermentação foi realizada em reator com capacidade para 15 litros de meio de cultura. O meio de cultura consistiu de (g/L) NaCl 0.5, KH_2PO_4 0.7, K_2HPO_4 1.4, $MgSO_4$. $7H_20$ 0.1, acrescido de 0.5 g de penas inteiras. As condições de cultivo foram: 300 rpm, com uma taxa de aeração de 3 L/min, o pH foi controlado na faixa de 6,5 a 8,5 pela adição de um ácido ou base. A temperatura também foi controlada na faixa de 37°C a 50°C durante a fermentação. Observou-se que houve maior produção da enzima quando o pH não foi controlado e a temperatura da fermentação foi de 50°C, sendo a atividade de 220 U/mL, a menor atividade enzimática foi observada quando a fermentação foi controlada em pH 8.5, sendo a atividade de 20 U/mL.

5.6 Purificação de produtos biotecnológicos

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais constitui etapa complexa do processo de purificação, dadas às variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas. Entre as características dos meios, pode-se citar a elevada proporção de moléculas orgânicas e inorgânica constituintes do meio de cultura, metabólitos intracelulares provenientes de células mortas e fragmentos celulares.

Em resultado à variedade de características descritas, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processo de purificação de aplicação geral.

Em geral, a purificação pode ser dividida em quatro etapas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo, concentração e/ou purificação de baixa resolução, purificação de alta resolução, e, finalmente, operações para o acondicionamento final do produto. A Tabela 2 abaixo apresenta as operações envolvidas em um processo de purificação.

Tabela 2: Operações unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos.

Clarificação	Filtração convencional	Tamanho das partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade das partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas.
Rompimento das células	Homogeneização	Cisalhamento
	Ultra-som	Cisalhamento
	Moagem em moinhos de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou a membrana celular.
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistemas de duas fases líquidas	Solubilidade, massa molar.
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo ou densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molar	Massa molar
Tratamentos finais	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Liofilização	Características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

Geralmente, a primeira etapa em um processo de purificação é a separação de células suspensas de um meio de cultivo, este então isento de células, é denominado clarificado ou filtrado.

A cromatografia é uma etapa importante e que requer grande atenção, este é um método físico-químico de separação diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes intererações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

Nos processos cromatográficos, os solutos de um meio líquido (proteínas, peptídeos, anticorpos) são adsorvidas ou retidas em um leito de material poroso. A posterior remoção gradual dos solutos por ação de uma fase líquida móvel (eluente), resulta na separação das diferentes moléculas. A configuração física geral é a de uma fase estacionária (matriz) empacotada em uma coluna através da qual a fase móvel é bombeada.

Segunda Kilikian e Pessoa Jr. (2005) os processos cromatográficos industrialmente mais utilizados são:

- Filtração em gel: Baseada na separação de moléculas em função da massa molar das moléculas;

-Troca iônica: Baseada na adsorção das moléculas sobre o leito cromatográfico, levando em consideração o fato de que a fase estacionária, eletricamente carregada, tem a capacidade de reter solutos que estão na fase móvel e apresentam cargas de sinais opostos;

-Interação Hidrofóbica: Baseada na adsorção de zonas hidrófobas de proteínas sobre hidrocarbonetos covalentemente ligados ao leito cromatográfico;

- Afinidade: Baseada em interações genéricas entre determinados resíduos de aminoácidos e ligantes associados à matriz, ou interações bioquímicas específicas.

Vale ressaltar que o grau de pureza necessário de um produto biotecnológico depende de sua aplicação final.

Em cada etapa do processo de purificação, deve-se monitorar a porcentagem de recuperação e o grau de purificação da molécula alvo. Rotinas que levam à

quantificação de certa proteína, associadas a volumes, viabilizam a determinação de balanços de massa e, portanto, das porcentagens recuperadas em cada etapa. Uma quantificação indireta é obtida com relativa facilidade, quando a molécula considerada apresenta atividade biológica específica, como, por exemplo, atividade enzimática ou antigênica.

Segundo Kilikian e Pessoa Jr (2005) a atividade enzimática é a velocidade inicial da reação específica catalisada pela enzima, determinada em condições padronizadas de pH, temperatura, força iônica e concentração do substrato, portanto, condições reprodutíveis. Define-se uma unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de produto liberado ou substrato consumido (µmol) em um minuto nas condições de ensaio. Dessa forma, em cada etapa do processo de purificação, determina-se a capacidade biológica da molécula considerada (unidades de atividade enzimática) a qual, associada aos volumes envolvidos, permite determinar a porcentagem recuperada.

Para determinação de concentrações totais de proteína, disponibiliza-se de vários métodos, tais como Lowry-Folin-Ciocalteau, absorção de raios UV 280 m (aminoácidos) ou 205-220 nm (peptídeos). Cada um desses métodos baseia-se em princípios diferentes, razão pela qual os resultados obtidos não são iguais, e, portanto, não devem ser comparados.

Outra rotina comum no acompanhamento de processos de purificação é a eletroforese, que consiste na separação das proteínas por ação de um campo elétrico que força o movimento das moléculas eletricamente carregadas através de um gel de poliacrilamida ou agarose. As proteínas apresentam mobilidade em conformidade com sua carga total, massa molar e intensidade do campo elétrico. A detecção, que compreende a coloração das proteínas distribuídas sobre o gel, geralmente é feita com o corante Coomassie Brilliant Blue, embora outro corantes possam ser utilizados. Por fim, visualiza-se uma seqüência de traços (bandas) azuis e supõe-se que cada banda corresponda a uma proteína. A introdução de padrões permite estimar a massa molar das proteínas da amostra, bem como identificar a banda correspondente à proteína alvo. O número de bandas obtidas está

diretamente relacionada à pureza da amostra e, portanto, uma única banda, relativa à molécula alvo, corresponde a uma completa purificação do produto.

Além dessas rotinas de monitoramento do processo de purificação, deve-se adotar também rotinas destinadas a determinar as principais características das moléculas presentes no meio a ser purificado. Essa caracterização do meio deverá nortear a seleção adequada de operações do processo de purificação.

5.7 Purificação e caracterização da enzima queratinase

Muhsin e Aubaid (2000) isolaram um dermatófito (*Trichophyton* var. *erinacei*) de pacientes infectados com *Tinea cruris,* o microrganismo foi cultivado em meio dextrose sabouraud e produziu uma keratinase exocelular. A enzima foi parcialmente purificada utilizando para isso uma coluna de gel de filtração (sephadex G 100), a enzima apresentou uma massa molar de 38 KDa. Quanto à caracterização da enzima, esta foi mais ativa em pH 5.5, permanecendo estável por 30 minutos quando incubada a 50°C.

O fungo *Scopulariopsis brevicalis* produziu uma queratinase extracelar, esta foi inicialmente precipitada com sulfato de amônio e purificada usando colunas de DEAE-Celulose e Sephadex G-100. A enzima apresentou massa molar de 39 KDa. O pH ótimo da enzima foi 8.0 e a temperatura 40°C. Os autores verificaram que a enzima foi fortemente inibida por PMSF, o que sugere que resíduo de serina encontra-se próximo ou no sítio ativo da enzima (ANBU et al. 2006).

Nos estudos realizados Gessesse et. al. (2002), duas enzimas foram purificadas e caracterizadas. As enzimas produzidas por *Bacillus* (AL-89) e *Nesternkonia* (AL-20) foram inicialmente precipitadas com sulfato de amônia e após esta etapa purificadas utilizando técnicas de troca iônica e gel de filtração. A massa molar determinada por SDS-PAGE foi de 23 KDa para AL-20 e 24 KDa para AL-89. A protease AL-20 foi ativa em pH 7.5 a 11.5, com pico de atividade em pH 10.0 a 70°C.

Thys et al. (2004) purificaram parcialmente a enzima produzida por *Microbacterium,* utilizando coluna de gel em filtração. Esta apresentou pH ótimo de

7.0 e temperatura de 55°C. A enzima foi inibida por 1,10-phenanthroline, EDTA, 2-mercaptoethanol e íons metálicos Hg^{2+}, Cu^{2+} e Zn^{2+}.

A enzima queratinase produzida por *Aspergillus oryzae* foi purificada e caracterizada nos estudos realizados por Farag e Hassan (2003). A enzima apresentou massa molar de 60 KDa, pH ótimo de 8.0 e temperatura de 50°C, esta manteve sua atividade após 60 minutos quando incubada a 70°C.

Riessen e Antranikian (2001) isolaram vários microorganismos produtores de queratinase. A cepa escolhida para estudo foi identificada como *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. A cepa apresentou crescimento ótimo a 70°C, pH 7.0, sendo que com 10 dias de cultivo ocorreu 70% de degradação. Após etapas de purificação, a massa molar foi determinada por SDS-PAGE, apresentando assim 135 KDa.

Queratinase produzida por uma bactéria termotolerante foi purificada nos estudos realizados por Suntornsuk e Suntornsuk (2005). A enzima foi purificada utilizando coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G 75, e esta apresentou uma massa molar de 35 KDa. Quanto à caracterização esta foi significamente inibida por PMSF e parcialmente inibida por EDTA, porém foi estimulado por íons metálicos, sendo que quando incubada com Mn^{2+} foi ativada em 76%.

Nos estudos realizados por Kumar et al., (1998), *Bacillus* sp produziu duas queratinases denominadas AP-1 e AP-2. Após precipitação com acetona e usando técnicas de filtração em gel e troca iônica, estas apresentaram massas molares de 28 e 29 KDa respectivamente. Para a enzima AP-1 as condições ótimas foram: 50°C e pH 11, já a enzima AP-2 foi mais ativa a 55°C e pH 12.

Suh e Lee (2001) isolaram uma espécie de *Bacillus* produtora de queratinase. A enzima foi purificada usando coluna de DEAE-Sephadex e Sephadex G-100. A massa molar determinada foi de 25,4 KDa. A enzima foi totalmente inibida quando incubada com PMSF, indicando ser uma serina protease.

A enzima produzida por *Chryseobacterium sp* Kr6 foi purificada nos estudos realizados por Riffel et. al. (2007). O filtrado foi inicialmente aplicado em uma coluna de Phenyl Sepharose CL4B, amostras contendo atividade foram liofilizadas,

ressuspendidas e passadas por coluna de gel de filtração Superose 12 HR. A enzima purificada apresentou massa molar de 64 KDa. Esta mostrou-se ativa em pH e temperatura de 8.5 e 50°C respectivamente. Inibição ocorreu quando a enzima foi incubada em EDTA, EGTA mostrando ser uma metaloprotease.

Bockle et al. (1995) purificaram e caracterizaram a enzima produzida por *Streptomyces pactum* DSM 40530. A enzima apresentou uma massa molar de 30 KDa. A proteína mostrou-se ativa em pH de 7 a 10 e temperatura de 40 a 75°C.

Bacillus licheniformes PWD produziu uma queratinase com massa molar de 31.4 KDa, esta apresentou-se estável em pH de 5 a 12, a temperatura ótima de reação entre 50 e 55°C (Cheng et al, 1995).

Lin et al. (1992) purificaram uma queratinase produzida por *Bacillus licheniformes* PWD-1. A enzima foi purificada utilizando membrana de ultrafiltração e resina carboximetil celulose de troca iônica e gel SEPHADEX G-75. A atividade específica da queratinase purificada relativa a aquela no meio de cultura foi aproximadamente 70 vezes maior. Os ensaios de eletroforese e cromatografia indicaram que a queratinase é monomérica e tem uma massa molar de 33 kDa, sendo o pH ótimo de 7.5 e temperatura ótima de 50°C. A enzima mostrou-se estável quando armazenada a –20°C. A queratinase purificada foi capaz de hidrolisar uma ampla gama de substratos.

Rozs et al. (2001) purificaram a enzima produzida por *Bacillus licheniformes* K-508, esta apresentou massa molar de 42 KDa, pH ótimo de 8.5 e temperatura de 52°C. A enzima foi descrita como pertencente à classe das serina proteinase.

Enzimas com alta massa molar foram purificadas nos estudos realizados por Lee et al. (2002) e Alpress et al. (2002), sendo que a produzida por *Bacillus* sp SCP-3 apresentou massa molar de 134 KDa e a produzida por *Lysobacter* NCIMB 949 148 KDa respectivamente.

Kumar et al. (2008), purificaram e caracterizaram a enzima produzida por *Bacillus pumilis.* O microrganismo foi cultivado utilizando como substrato pêlo bovino, a enzima produzida foi precipitada com sulfato de amônio e dissolvida em tampão Tris HCl 25 mM pH 7.8. Após ser dialisada, esta foi aplicada em uma coluna DEAE Sepharose fast flow previamente equilibrada com o mesmo tampão citado

acima. Após análise por SDS page, a massa molar da enzima foi definida como sendo de 65 kDa e pertencente as serinaproteases.

6. MATERIAL e MÉTODOS

6.1 Microrganismo

Foram isolados vários microrganismos, sendo que a cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* (LM16), isolado da água de lavagem de vísceras (Kori), produziu maior atividade enzimática e degradação das penas, sendo, portanto utilizada neste trabalho de pesquisa.

6.2 Locais de coleta para isolamento dos microrganismos

Os locais de coleta foram:

1.0) Abatedouro de aves Fricock, localizada na cidade de Rio Claro/SP. Neste local foram realizados 3 pontos de coleta:

1.1) Água do decantador

1.2) Flotador

1.3) Lavagem de vísceras

2.0) Efluente de curtume

3.0) Sítio localizado na região de Ajapi, distrito de Rio Claro/SP. Neste local foram realizados 3 pontos de coleta:

3.1) Cama de Frango (Subprodutos da agroindústria), contendo uma mistura de fezes, penas de frango e restos de ração - **Figura 1**

3.2) Compostagem (Mistura contendo camadas de restos de frango e cama de frango)- **Figura 2**

3.3) Chorume (Líquido com altas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos).

4.0) Abatedouro de aves da “Kori” (Fundação Mokito Okada), localizada na cidade de Rio Claro/SP. Neste local foi realizado 2 ponto de coleta:

4.1) Água de lavagem de vísceras - **Figura 3**

4.2) Água de escaldamento- **Figura 4**

Figura 1: Cama de frango (Subproduto da agroindústria)

Figura 2: Compostagem (Mistura contendo camadas de restos de frango e cama de frango)

Chorume: (Líquido com altas concentrações de compostos orgânicos e inorgânicos)

Figura 3: Água de lavagem de vísceras- Abatedouro de aves “Kori”

Figura 4: Água de escaldamento- Abatedouro de aves “Kori”

6.3 Isolamento e seleção dos microrganismos

6.31- Isolamento de microrganismos de água residuária de abatedouro de frango e efluente de curtume

Para isolar os microrganismos das águas residuárias de abatedouros de frangos e efluente de curtume, foi preparado 9 mL de caldo nutriente estéril (peptona 3% e extrato de carne 5%), este volume foi adicionado a 1 mL da amostra e incubados a 35°C, 150 rpm por 48 horas.

Após este período de incubação, realizou-se diluições sucessivas e destas diluições foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e transferidas para placas de petri contendo ágar nutriente, estas foram incubadas em estufa a 35°C. A partir destas placas foram realizados repiques para a obtenção de culturas puras.

As culturas puras foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura proposto por Willians et. al. (1990) - Tabela 3, porém como fonte de carbono foi utilizada farinha de penas, cuja composição está descrita na Tabela 4.

Das placas onde se observou crescimento do microrganismo, foi realizada uma fermentação, retirando-se uma alçada da cultura e inoculando-a em meio líquido descrito por Willians et al. (1991). A fermentação foi realizada á 35°C, 150 rpm, 1% de penas, pH inicial 7.5, por 96 horas.

Dos frascos onde observou-se degradação das penas, foram retiradas amostras do caldo fermentado, e adicionadas em tubos criogênicos contendo glicerol (1:1) e estocados em freezer á –20°C. Amostras das culturas foram submetidas a teste de coloração de gram.

6.3.2 isolamento de microrganismos de amostras sólidas (compostagem e cama de frango)

A técnica para isolamento de microrganismos de amostras sólidas foi realizada como descrito acima (6.3.1), porém iniciou-se pesando 5g da amostra e esta foi adicionada à 45 mL de caldo nutriente estéril. As condições de cultivo e a metodologia usada foram as mesmas citadas acima.

Tabela 3: Meio de cultura proposto por Willians et. al. (1990).

Composição	**g/L**
NH_4Cl	0,50
$NaCl_2$	0,50
MgCl	0,10
K_2HPO_4	0,30
KH_2PO_4	0,40
Extrato de levedura	0,01
Penas de frango ou farinha de penas	10,0
Agar	15,0

Tabela 4: Análise da farinha de penas (fornecido pela empresa Agroceres - Rio Claro).

Características	**%**
Umidade	6,50
Extrato etéreo	4,14
Matéria mineral	2,13
Cálcio	0,28
Fósforo	0,30
Proteína bruta	87,47
Proteína digestível	37,23

6.3.3 Seleção dos microrganismos

Os microrganismos potencias produtores de queratinase, foram submetidos a uma fermentação a fim de determinar a porcentagem de degradação das penas e a produção da enzima queratinase.

As fermentações foram realizadas com um volume de meio de 50 mL, descrito na Tabela 3 e inoculados com 2% da cultura de pré-inóculo. O cultivo foi realizado a

35°C, 150 rpm, 1% de penas inteiras, pH inicial 7.4, durante 72 horas em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990).

6.3.4 Identificação do microrganismo selecionado

A identificação do microrganismo selecionado foi realizada levando-se em consideração as características morfológicas, fisiológicas e de metabolismo bioquímico utilizando taxonomia convencional, associada a sistema de testes rápidos de identificação e análise comparativa com dados citados em literatura.

Esta identificação foi baseada na análise comparativa das características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referências descritas em literatura.

Além da identificação citada acima, realizou-se a identificação pela análise de ácidos graxos. Para realização da técnica, o microrganismos foi cultivado a 28°C em placas de agar tripticase de soja (TSBA) por 24 h. Os ácidos graxos foram saponificados, metilados, extraídos e analisados por cromatografia gasosa, utilizando o sistema Sherlock (Microbial Identification System –MIDI). A identificação foi realizada pela comparação do perfil de ácidos graxos com a biblioteca de referência armazenada em banco de dados para microrganismos aeróbios de amostras ambientais do sistema (TSBA, versão 5.0).

6.4 Obtenção do inóculo e Determinação do crescimento bacteriano.

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

Para a obtenção do inóculo, utilizou-se 50 mL de caldo nutriente no qual foram colocadas duas alçadas a partir de uma cultura pura (24 h) presente em placa de petri contendo meio descrito por Willians et. al., (1999) acrescido de farinha de penas. O caldo nutriente foi incubado a 35^{o}C, 150 rpm por 17h. Nessas condições, o caldo apresentou uma turbidez adequada para comparação com a escala de McFarland (entre 12 a 15 x 10 $^{-8}$). Em seguida, 2% do caldo nutriente foi transferido para um frasco contendo 100 mL do meio proposto por Willians et al., (1990) contendo penas inteiras e incubado de acordo com as condições estudadas.

Alíquotas de 1mL do meio foram retiradas para diluição em solução salina 0,85%, onde foram realizadas as diluições até 10^{-8}, sendo que a contagem das UFC foi realizada nesta diluição, com o plaqueamento sendo realizado em ágar nutriente. As placas foram incubadas por 24h a 35°C e a contagem foi realizada entre 25 a 250 colônias. Os valores foram expressos em UFC/mL (Unidades formadoras de colônia).

6.5 Produção da enzima em shaker

A cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura descrito por Willians et al., (1991). As fermentações foram realizadas em triplicata e as condições de cultivo foram variadas, a fim de se determinar as melhores condições de fermentação para esta cepa.

As condições de cultivo estudadas foram:

1) Influência da temperatura (28, 35, 40 e 45 °C).
2) Influência da agitação (100, 150 e 200 rpm).
4) Influência do pH inicial do meio de cultivo (6.5, 7.0, 7.5 e 8.0).
5) Influência da porcentagem substrato (1, 2 e 3%).
6) Influência da adição de glicose (50mM).

6.6 Fermentações realizadas em reator

A metodologia para preparo do meio de cultura foi o mesmo descrito nos itens anteriores. O reator utilizado (Bio T mini – ZETA) possui volume útil de 4 litros, sendo que o volume de meio utilizado foi 2 L e a porcentagem de inóculo utilizada 2%. O reator é equipado com sistema de aeração, agitação, temperatura, controle de pH e sistema de oxigênio dissolvido.

O meio utilizado nas fermentações foi o proposto por Willians et al., (1990), sendo que foi utilizado penas inteiras como substrato (1%).

Estudou-se as seguintes condições de cultivo:

Fermentação 1: 40°C, 300 rpm, sem controle de pH e aeração de 60 L/h.

Fermentação 2: 40°C, sem agitação, sem controle de pH e aeração de180 L/h.

Fermentação 3: 40°C, 300 rpm, sem controle de pH e aeração de 180 L/h.

Fermentação 4: 40°C, 300 rpm, sem controle de pH e aeração de 300 L/h.

Após 72 h de cultivo, o caldo fermentado foi retirado do reator e passado em papel de filtro para remoção das penas. Estas foram levadas à estufa por 24 h e pesadas para determinação da concentração de penas degradadas.

O filtrado foi centrifugado a 20°C, 5000 *g* por 15 minutos, o caldo livre de células foi utilizado para determinação da atividade enzimática, proteolítica e concentração de proteínas.

6.7 Avaliação da porcentagem de degradação das penas

Para determinação da porcentagem de degradação, seguiu-se a metodologia descrita por Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Ao final da fermentação, o caldo foi filtrado em papel de filtro, seco em estufa a 105°C overnight e pesado. A porcentagem de degradação das penas foi calculada através da diferença no peso seco residual entre um controle (meio com penas sem inóculo) e a amostra tratada.

6.8 Atividade enzimática da queratinase

Para a determinação da atividade queratinolítica foi adotada uma metodologia modificada descrita por Bressollier et al. (1999). A mistura de reação continha 800 μL da solução enzimática e 3,2 mL de uma solução tampão Tris HCl 50 mM pH 8,5 acrescida de 0,013 g de azoqueratina. A mistura foi incubada durante 1h, em agitação de 100 rpm a 50°C, ao final do período de incubação, adicionou-se 800 μL de solução de TCA 10 %. Após filtração em peneira TYLER 200 (abertura em mm 0,074), a absorbância do sobrenadante foi determinada a 595 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica corresponde à quantidade da enzima que causa um aumento na absorbância de 0,01 nas condições citadas. Como branco foi utilizado 1,2 mL de solução TCA 10%, 1,2 mL de solução enzimática e 4,8 mL de tampão Tris-HCl pH 8,5, acrescida de 0,013 g de azoqueratina. Quando a atividade foi realizada utilizando como substrato a azoqueratina sintetizada em laboratório, a metodologia adotada foi a mesma, porém a leitura foi realizada a 440nm, uma vez

que após a realização de uma varredura, este foi o comprimento de onda em que ocorreu maior absorção.

6.9 Determinação da Atividade Proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica foi adotada uma metodologia modificada de Mc Donald e Chen (1965), em que 1 mL da enzima foi adicionada a 4 mL de uma solução contendo caseína 1% em tampão Mclvaine pH 8.0. Esta solução foi incubada durante 20 minutos a 50ºC sob agitação de 100 rpm. Após incubação, retirou-se 1 mL desta amostra e adicionou-se 1 mL de TCA 10%, esta amostra ficou em repouso por 12 horas à 4ºC. Após este período, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi adicionado a 5 mL de uma solução que continha: 100mL de Na_2CO_2 2%, 10mL de NaOH 10%, 1mL de tartarato de sódio e potássio ($KNaC_4H_4O_6$) 2,7% e 1mL de CuSO4 1%. Após 10 minutos adicionou-se 0,5 mL de Folin Ciocauteau (1:1). A leitura foi realizada a 700nm. A unidade de atividade proteolítica foi determinada como a quantidade de protease que libera o equivalente de cor a 1µg de tirosina/minuto. Para realização do branco seguiu-se o mesmo procedimento sendo que a enzima foi inativada por fervura durante 5 minutos.

6.10 Determinação da concentração de proteína

Para determinar a concentração de proteínas utilizou-se a metodologia de Lowry e Cols (1951), onde 1 mL da enzima foi adicionada a 5mL de uma solução contendo 50mL de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 N; 0,5 mL de $CuSO_4$ 1% em água e 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio 1%, esta solução ficou em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se 0,5 mL de Folin Cicauteau (1:1) a amostra e após 30 minutos realizou-se leitura à 660nm. A concentração de proteína foi expressa em mg/mL.

6.11 Síntese de Azoqueratina

A azoqueratina produzida em laboratório foi preparada segundo a metodologia descrita por Tomarelli et al., (1949).

As penas foram moídas (15 gr) e adicionadas em 680mL de água destilada, adicionou-se 100mL de $NaHCO_3$ (1N) em continua agitação. Simultaneamente preparou-se uma solução com 8,65 g de ácido sulfanílico dissolvido em 200mL de NaOH 0,12M, adicionando-a a mistura contendo penas em agitação.

Seqüencialmente foram adicionados a mistura inicial 1,7 gr de $NaNO_2$ e 10mL de HCl 5,0M e agitada por mais 2 minutos, então acrescentou-se 10mL de NaOH 5 M, sendo agitada por mais 5 minutos e posteriormente dialisada contra água destilada a 4°C.

Após diálise, a solução foi colocada em um rotavapor para evaporação do excesso de água presente na azoqueratina. Posteriormente, foi submetida à liofilização.

6.12 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar os aminoácidos presentes no caldo de cultivo quando realizadas fermentações em diferentes pHs (6.5, 7.0, 7.5 e 8.0). Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase – móvel a seguinte 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. As amostras consistiram de caldo de fermentação centrifugados de diferentes tempos de fermentação (24, 48 e 72 horas) além dos padrões de aminoácidos serina, prolina, tirosina, metionina cisteína e leucina.

6.13 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microrganismo *Bacillus amyloliquefacien*s foi cultivado em 100 mL de meio de cultura proposto por Willians et al. (1990) contendo 1% de penas inteiras, 2% de inóculo e incubado a 150 rpm, 40°C, pH inicial 7.5.

Para realização da análise microscópica, foram retiradas alíquotas com 6, 12, 24, 48 e 72 horas de cultivo. As amostras foram pré fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5 (v/v), paraformaldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato 50 mM pH 7.0 por 24 hs. Em seguida, as amostras foram equilibradas no mesmo tampão e pós fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) por 1h. Após fixação, as amostras foram

desidratadas 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).

6.14 Caracterização do caldo enzimático

6.14.1 Influência do pH sobre a Atividade Proteolítica e Queratinolítica de *Bacillus amiloliquefaciens*

Para determinação destes parâmetros, as fermentações foram realizadas utilizando o meio Willians et al. (1990), sendo que as condições utilizadas foram: 40ºC, 150 rpm, 2% inóculo e 1% de penas. O efeito do pH na atividade queratinolítica foi analisado utilizando azoqueratina (Sigma), sendo que também determinou-se a atividade proteolítica. Estas atividades foram estudadas nas faixas de pH entre 4.0 e 10.0, utilizando-se os seguintes tampões: Mclvane (4.0, 5.0 e 6.0), K_2HPO_4/NaOH (7.0), Tris HCl (8.5 e 9.0) e $NaHCO_3$/NaOH (10.0). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa, com o valor das atividades queratinolíticas (pH 8.5) e proteolíticas (pH 8.0) definidos com 100%.

6.14.2 Influência da temperatura e estabilidade térmica sobre a Atividade Proteolítica e Queratinolítica de *Bacillus amiloliquefaciens*

A temperatura ótima para atividade proteolítica e queratinolítica foi determinada pela variação da temperatura de incubação nos intervalos de 30ºC a 70ºC. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa, sendo o valor das atividades realizadas a 50ºC considerada com 100%. Para determinação da estabilidade térmica, a solução enzimática foi pré incubada de (30 a 70 ºC) durante 7 horas ou até que as atividades chegassem á valores inferiores a 25% ou quando não observou-se atividade. As atividades residuais foram calculadas com a atividade da enzima não incubada considerada como 100%.

6.14.3 Influência de substâncias químicas sobre a Atividade Proteolítica e Queratinolítica de *Bacillus amiloliquefaciens*

Para determinar a influência de substâncias químicas sobre a enzima, a solução enzimática foi pré-incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos com as seguintes substâncias: 2mM e 10mM ($CuSO_4$, $MgCl_2$, HgCl, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$ e $FeCl_3$), Triton (0,1 e 0,5%), Tween (0,1 e 0,5%), Dimetilsufóxido (1 e 5%), Isopropanol (1 e 5%), EDTA (5, 10 e 50°C mM) e Mercaptoetanol (0,1 e 0,5%). Após este tempo de incubação foi realizada a determinação da atividade queratinolítica e proteolítica. As atividades residuais foram expressas em porcentagem relativa, sendo que a enzima não incubada foi expressa em 100%.

6.15 Verificação da eficiência na precipitação das proteínas com Sulfato de amônio, etanol e acetona.

Para verificar com qual agente precipitante ocorre maior precipitação de proteínas, testou-se um sal e dois solventes comumente utilizados. Para isso realizou-se uma fermentação contendo 1 L de meio de cultura descrito por Willians et al., (1990) sendo que as condições de cultivo utilizadas foram: 40°C, 150 rpm, pH 7,5, 2% de inóculo, 1% de penas durante 72 horas. Ao final da fermentação o caldo foi centrifugado a 5000 *g* por 15 minutos à 20°C para remoção total das células. Testou-se para cada agente variadas faixas de saturação (25, 50, 75, 85 e 95%).

Utilizou-se para cada agente e concentração estudada um volume de 50 mL de caldo de cultura. Nos experimentos realizados com sulfato de amônio, o sal foi macerado até se apresentar como um pó fino sendo este adicionado lentamente ao filtrado. O etanol e a acetona foram utilizados gelados. Todo o processo foi realizado dentro de um refrigerador climatizado a 10°C. Após precipitação, as amostras foram ressupendidas em um volume menor de tampão Tris HCl 8.5 e dialisadas contra água sob agitação constante, “overnight” a 4°C. Destas amostras, determinou-se a atividade queratinolítica/proteolítica e concentração de proteína, conforme metodologia já descrita.

O melhor agente precipitante e faixa de saturação foram utilizados nas etapas de cromatografia.

6.16 Purificação da enzima queratinase e técnicas cromatográficas

6.16.1 Precipitação do caldo bruto com acetona

O caldo fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens* (500 mL) foi precipitado utlizando acetona gelada. Para isso, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 5000 *g* a 20 °C. Ao caldo livre de células foi adicionado acetona lentamente, sendo que todo o processo foi realizado a 10°C. A enzima foi recuperada por centrifugação, seguida por ressuspensão em 30 mL de tampão. Os tampões utilizados variaram em função do tipo de coluna e técnica utilizada. A amostra foi dialisada contra água destilada por 2 horas a 10°C.

Após ressuspensão foi realizada atividade queratinolítica e quantificação de proteína, para cálculo da atividade específica, fator de purificação e rendimento final.

A fermentação foi realizada utilizando-se 500 mL de meio de cultura descrito por Willians et. al., (1990) sob as condições de 40°C, 150 rpm, pH inicial 7,5, 1% de penas, 2% de inoculo durante 48 horas.

6.16.2 Troca iônica – (DEAE Sephadex A 50) e Filtração em gel (Sephadex G 75).

A suspensão enzimática após ser precipitada com acetona, foi aplicada em uma coluna XK 16 empacotada com a resina DEAE-Sephadex A 50 (1,5 x 16 cm) equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM pH 8.5. Nesta coluna foi aplicada 30 mL da solução enzimática, seguida de eluição com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna, o fluxo foi mantido em 60mL/h, sendo que foram coletadas frações de 3 mL por tubo. As proteínas adsorvidas à resina foram recuperadas aplicando-se um gradiente salino de (0-0,5 M). Realizou-se leitura a 280 nm de todas as frações, sendo que as frações com atividade queratinolítica foram agrupadas e liofilizadas. Com estas amostras realizou-se eletroforese para acompanhar o processo de purificação.

As amostras com atividade queratinolítica foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel (1,6 x 110 cm), empacotada com Sephadex G 75. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de amônio 50 mM pH 6,7 , sendo que o mesmo tampão foi utilizado para eluir a coluna. O fluxo foi mantido em 18 mL/h e frações de

3 mL foram coletadas. Realizou-se leitura a 280 nm, sendo que frações com atividade queratinolítica foram reunidas, liofilizadas e aplicadas em um gel de eletroforese.

6.16.3 Troca Iônica (DEAE Sepharose fast flow) e Filtração em gel (Sephadex G 75).

Neste experimento utilizou-se uma coluna (1,5 x 16,0 x cm) empacotada com a resina DEAE sepharose fast flow, esta foi equilibrada com tampão Tris HCl 20 mM pH 8.0, sendo que 30 mL do caldo enzimático produzido conforme descrito nos itens anteriores foi aplicado à coluna.

O fluxo de eluição da coluna foi mantido em 60 mL/h com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna, frações de 3 mL foram coletadas.

Frações com atividade queratinolítica foram reunidas. As proteínas adsorvidas à resina foram recuperadas aplicando-se um gradiente salino de 0 a 0,5 M, sendo que as frações com atividade também foram reunidas.

A fração que apresentou maior atividade da enzima foi dialisada, liofilizada, ressuspendida em 3 mL de tampão e aplicada em uma coluna de troca iônica (1,6 x 100). A coluna foi eluída com tampão acetato de amônio 50 mM pH 6.8, o fluxo foi mantido em 18 mL/h, frações de 3 mL foram coletadas. As frações com atividade foram reunidas e submetidas a uma eletroforese.

6.16.4 Eletroforese

A metodologia de eletroforese em sistema denaturante foi utilizada para verificar o estado de pureza das amostras, bem como para determinação da massa molar das proteínas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gel de gradiente 10 a 20 % e gel de empilhamento 3,75% de acrilamida/bisacrilamida, descrito por Lammli (1970). A eletroforese foi realizada em tampão contendo Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1 M em pH 8,3, sob corrente de 300 V.

Utilizou-se padrão com seis misturas liofilizadas de massas molares entre 14400-97000 (GE Healthcare), sendo que as amostras foram preparadas na

proporção de 1:1 em tampão de amostra (SDS 4%, glicerol 17%, azul de bromofenol 0,1%, mercaptoetanol 10% e Tris HCl 0,12 M, pH 6,8) e aquecidas por 5 minutos em água fervente . Após a corrida eletroforética, utilizou-se o método de coloração de proteínas com coomassie brilliante blue R-250 0,025% (m/v) em metanol: ácido acético: água (4:1:5) e Brilliant Blue G-Collidal Concentrate (Sigma-Aldrich).

Após o período de coloração do gel, este foi lavado com água destilada, e solução descolorante contendo etanol e ácido acético. (1:5: 6) até a visualização das bandas de proteína, sendo posteriormente fotografado.

6.17 Caracterização da enzima parcialmente purificada

A solução enzimática obtida da cromatografia de troca iônica empacotada com a resina DEAE Sepharose fast flow foi caracterizada quanto à temperatura e pH ótimos e inibidores de serina e metaloproteses.

6.17.1 Influência dos Inibidores químicos na atividade enzimática

Para determinar a influência das substâncias PMSF (1 mM) e EDTA (10 mM e 50 mM) na atividade da enzima parcialmente purificada, a solução enzimática foi pré incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos com estas substâncias. Após o tempo de incubação determinou-se atividade queratinolítica seguindo a metodologia usual. A atividade residual foi expressa em porcentagem relativa, sendo que a enzima não incubada com as substâncias citadas acima foi expressa em 100%.

6.17.2 Influência do pH na atividade enzimática

Estas atividades foram estudadas nas faixas de pH entre 4.0 e 10.0, utilizando-se os seguintes tampões: McIlvaine (4.0, 5.0 e 6.0), K_2HPO_4/NaOH (7.0), Tris HCl (8.5, 9.0) e $NaHCO_3$/NaOH (10.0). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa, sendo que a maior atividade enzimática obtida foi definida como 100%.

6.17.3 Influência da temperatura na atividade enzimática

A temperatura ótima para atividade enzimática foi determinada pela variação da temperatura e incubação no intervalo de 30 a 70°C. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa, sendo que a maior atividade enzimática obtida foi definida como 100%.

7. Resultados e Discussão

Capítulo 7.1: Isolamento, Seleção e Identificação do microrganismo estudado. Análise da degradação das penas por MEV (Microscopia eletrônica de varredura).

Como citado anteriormente, realizou-se coleta de amostras de duas fábricas de processamento de frangos, uma localizada em Rio Claro (SP) e a outra em Ipeúna (SP), assim como de um sítio localizado em Ajapi (SP). Vários microrganismos com potencialidade para degradar penas foram isolados e analisados.

A tabela abaixo apresenta os locais de coleta, com os respectivos microrganismos isolados.

Tabela 1: Amostras coletadas e respectivos microrganismos isolados.

Amostras	Microrganismo	Coloração de gram	Degradação
Decantador (Fricock)	LM1 (1)	Bastonete gram -	Média
Flotador (Fricock)	LM2 (2)	Bastonete gram +	Média
Lavagem (Fricock)	LM3 (3)	Bastonete gram +	Média
Escaldamento (Kori)	LM4 (4)	Bastonete gram -	Média
	LM5 (5)	Cocos gram +	Média
	LM6 (6)	"Actinomiceto"	Média
Lavagem (kori)	LM7 (7)	Bastonete gram -	Baixa
Curtume	LM8 (8)	Bastonete gram -	Média
	LM9 (9)	Bastonete gram -	Alta
Cama de frango	LM10 (10)	Bastonete gram -	Baixa
Compostagem	LM11 (11)	Bastonete gram -	Baixa
	LM12 (12)	Bastonete gram -	Média
Chorume	LM13 (16)	Bastonete gram -	Média
Cama de frango (Fricock)	LM14 (14)	Bastonete gram -	Baixa
Lavagem de vísceras (Kori)	LM15 (15)	Bastonete gram -	Alta
	LM16 (16) *Bacillus amyloliquefaciens*	Bastonete gram +	Alta
	LM17 (17)	Bastonete gram +	Alta

Com relação ao critério citado na tabela acima, os microrganismos potenciais produtores de queratinase foram descritos como LM9, LM15, LM16 e LM17.

Os microrganismos foram submetidos a uma fermentação por 72 horas, sob as condições de 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo, pH inicial de 7,5 e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990). Destas fermentações observou-se a potencialidade dos microrganismos para degradar as penas. Este fato foi verificado através da visualização da turbidez do meio de cultura, da degradação das penas inteiras e atividade queratinolítica. O resultado pode ser visualizado pelas figuras abaixo.

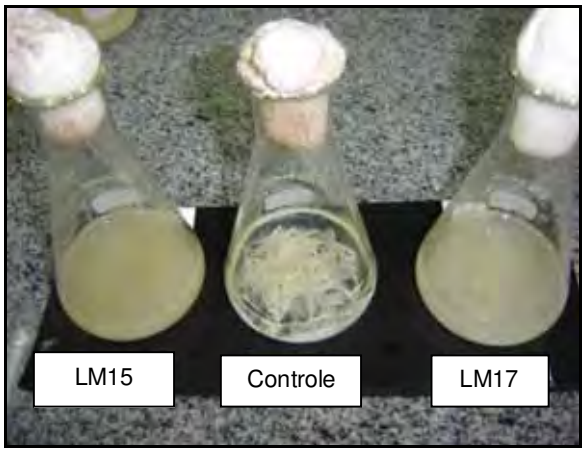


Figura 1: Fermentação utilizando as cepas LM15 e LM17 em 72 horas de cultivo, sob as condições de 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo e pH inicial 7,5.

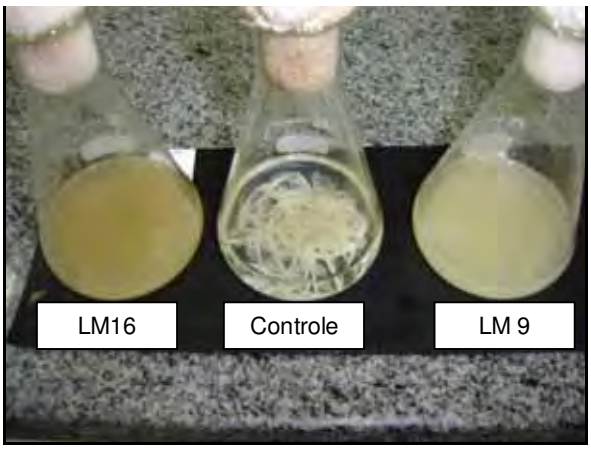


Figura 2: Fermentação utilizando as cepas LM16, LM10 em 72 horas de cultivo, sob as condições de 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo e pH inicial 7,5.

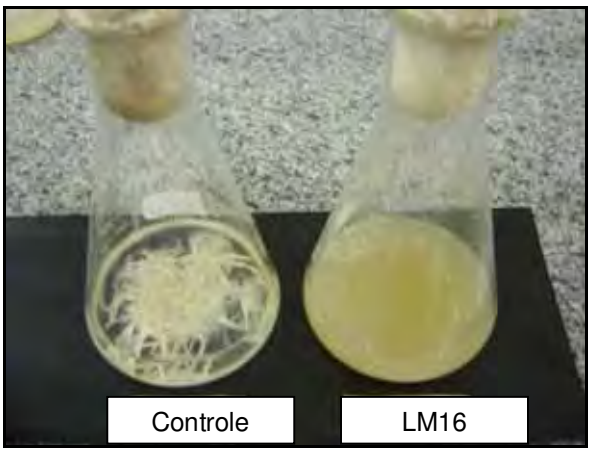


Figura 3: Fermentação utilizando LM16 (*Bacillus amyloliquefaciens*), após 72 h, sob as condições de 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo e pH inicial 7,5.

A Figura abaixo apresenta a porcentagem de degradação das penas pelos microrganismos selecionados, onde pode-se observar que o microrganismo que proporcionou maior degradação das penas foi LM16 (*Bacillus amyloliquefaciens*), com 97,7 % de degradação, a segunda maior porcentagem de degradação foi obtida por LM15, resultando em 97,1%

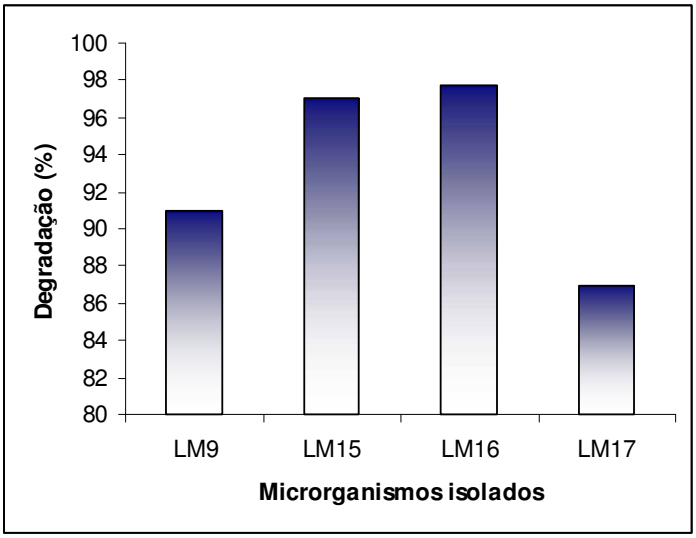


Figura 4: Microrganismos isolados e respectivas porcentagens de degradação das penas após 72 horas de fermentação.

Pelo fato dos resultados referentes à porcentagem de degradação terem sido muito próximos para as cepas LM15 e LM16, realizou-se uma fermentação com estes microrganismos sob as condições de 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo, pH inicial 7.5 e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990). Destas fermentações determinou-se a atividade queratinolítica produzida a cada 24 horas de cultivo, esta análise foi realizada até 72 horas de fermentação. Os resultados são apresentados na Figura 5.

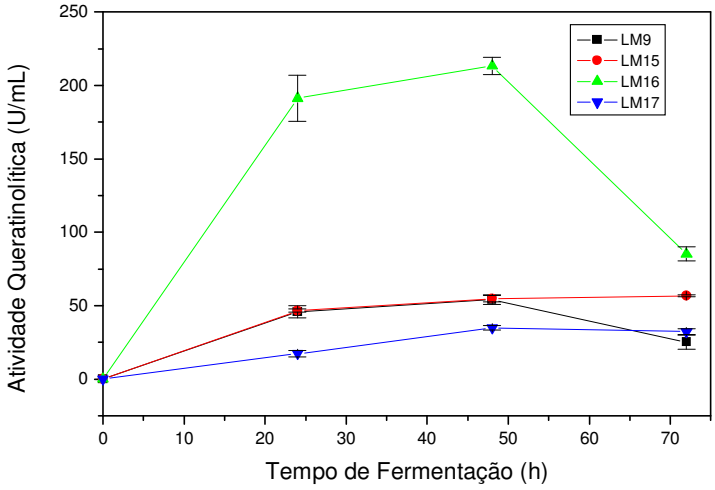


Figura 5: Atividade queratinolítica dos microrganismos isolados em função do tempo de fermentação. Condições de cultivo: 35°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo, pH inicial 7.5.

Pode-se observar que a maior atividade queratinolítica foi obtida no meio de cultivo inoculado com a cepa LM16 (*Bacillus amyloliquefaciens)* sendo que com 48 horas foi atingida a atividade de 213,4U/mL. Diante deste resultado, o microrganismo selecionado para o estudo a seguir foi LM16 (*Bacillus amyloliquefaciens).* As cepas LM9, LM15 e LM17 produziram uma atividade queratinolítica máxima de 54, 56,6; e 34,9 U/mL respectivamente.

Os resultados referentes ao crescimento celular, variação do pH durante o cultivo e a atividade queratinolítica durante a fermentação de LM16, podem ser visualizados na Figura 6.

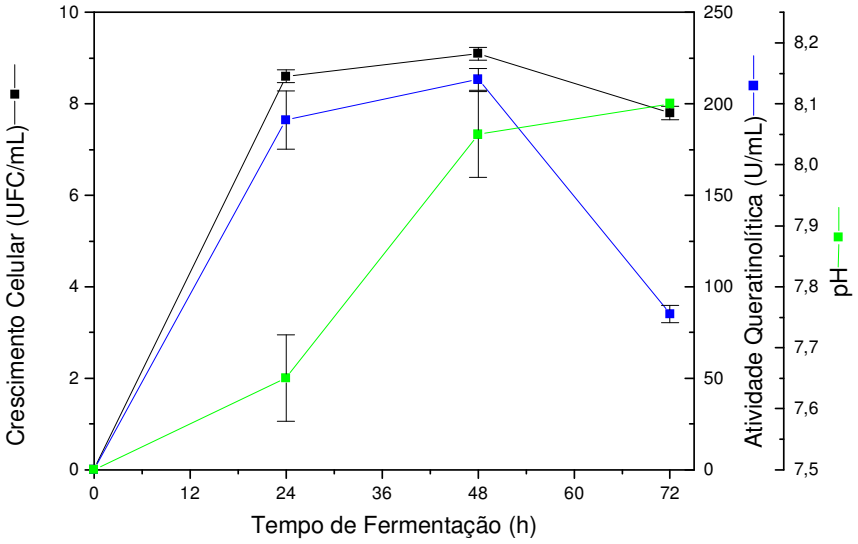


Figura 6: Verificação da atividade queratinolítica, pH e crescimento celular de LM 16 (*Bacillus amyloliquefaciens)* durante 72 horas de fermentação.

Como observado, a maior atividade queratinolítica foi obtida com 48 horas de cultivo (213,5 U/mL), tempo em que ocorreu o maior crescimento celular (9,1 UFC/mL). Após este período observou-se queda no crescimento celular e também na atividade queratinolítica.

Isto pode ser explicado pelo fato de que durante um processo fermentativo pode ocorrer uma variação quanto à concentração de biomassa, produção de enzima, concentração de substratos (nutrientes) e concentração de metabólitos que são produzidos pelo microrganismo durante sua adaptação ao meio de cultura, assim como as variações de temperatura, oxigenação e nutrientes presentes no meio de cultivo. Sendo assim, com 48 h de cultivo, observou-se maior atividade enzimática que ocorreu juntamente com a fase Log de crescimento e em que o pH do meio estava na faixa 8.0. A diminuição da atividade enzimática e crescimento celular podem ter ocorrido por diversos fatores, sendo eles:

1) O aumento do pH poder ter influenciado negativamente na produção da enzima e crescimento do microrganismo,

2) Para que ocorra aumento de biomassa, é necessário que haja nutrientes disponíveis, com o decorrer da fermentação ocorre diminuição na concentração destes nutrientes já que o microrganismo os utiliza como fonte de carbono e nitrogênio, entrado assim na fase estacionária e consequentemente de declíneo. O mesmo pode ser relatado para explicar a diminuição na produção da enzima, já que as penas são indutoras para que a enzima queratinase seja produzida.
3) Outro fator pode ser o acúmulo de metabólitos no meio de cultura, ocasionando toxicidade no meio, fator este que pode proporcionar morte celular.

Diante dos resultados promissores obtidos com a cepa LM16, esta cepa foi selecionada para estudo, realizando-se assim a identificação da mesma. Para isso, realizou-se taxonomia clássica convencional, e também identificação pela análise de ácidos graxos.

Como mostra a Tabela 2, quando a identificação foi realizada analisando-se a composição de ácidos graxos, foram encontrados seis possíveis espécies de microrganismos, sendo que *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou um índice de similaridade de 0,362.

Tabela 2: Microrganismos e respectivos índices de similaridade.

Microrganismo	**Índice de Similaridade**
Bacillus subtilis	0,434
Bacillus laevolacticus	0,421
Paenibacillus macerans	0,388
Bacillus coagulans	0,368
Bacillus megaterium	0,363
Bacillus amyloliquefaciens	0,362

Quando realizado identificação convencional, as colônias apresentaram coloração creme claro, forma circular elevada, margem levemente ondulada, superfície levemente rugosa com leve brilho, textura cremosa e sem presença de odor. As células apresentaram-se como bastonetes gram positivos, esporulados, móveis e aeróbios.

Quanto ao metabolismo bioquímico, estas apresentaram resultados positivos para catalase, redução de nitrato, crescimento com diferenciação de pH, hidrólise do amido, decomposição de caseína, fermentação de glicose em presença de 7% de NaCl, produção de acetoína, crescimento em diferentes concentrações de NaCl, utilização de carboidratos com formação de ácidos a partir de glicose, sacarose, manitol, inulina, amilopectina, maltose, esculina, salicina. Teste de fermentação de glicose em caldo na presença de inibidor seletivo: poliamidohigrostreptina, acetato de sódio, ácido mandélico, tiocianato de potássio.

Resultados negativos foram verificados para oxidase, assimilação de citrato, crescimento à 50°C, redução dos compostos 2,3,5- cloreto de trifeniltetrazólio. Utilização de carboidratos com formação de ácidos a partir de tagatose, trealose, galactose, arabinose, xilose, N-acetil-D-glicosamina, amigdalina, sorbitol, arabitol, ribose, palatinose, inositol e rafinose. Teste de fermentação de glicose em caldo na presença de inibidor seletivo: oleandomicina e ácido nalidíxico.

Com base nas características citadas acima verificou-se que o microrganismo isolado e selecionado como potencial produtor de queratinase trata-se da cepa de *Bacillus amyloliquefacienes.*

O isolamento de microrganismos produtores de queratinase também foi realizado por EL-Refai et al. (2005), os quais utilizaram amostras de solo contendo penas inteiras. O microrganismo selecionado foi identificado como sendo pertencente ao gênero *Bacillus pumilis* FH9. Quando comparado com outras espécies de *Bacillus*, este proporcionou uma alta porcentagem de degradação (97,8 %). Outros microrganismos estudados também apresentaram alta porcentagem de degradação, sendo *Streptomyces venezulae* DSM4027 (94%) e *Bacillus licheniformes* SA1 (87,2%), já *Bacillus subtilis* e *Streptomyces sp*. NRC-1 apresentaram baixa capacidade de degradação (49,2 e 35 %) respectivamente.

Manczinger et al. (2002) também isolaram microrganismo do gênero *Bacillus* a partir de penas degradadas, o microrganismo foi descrito como sendo *Bacillus licheniformes* K-508, este se mostrou mais ativo quando cultivado á 47°C, 180 rpm e pH inicial 7.0. Bactérias do gênero *Bacillus* também foram isoladas por Zerdani et al. (2004) e Willians et al, (1990), estas cepas apresentaram alta capacidade de degradação de penas.

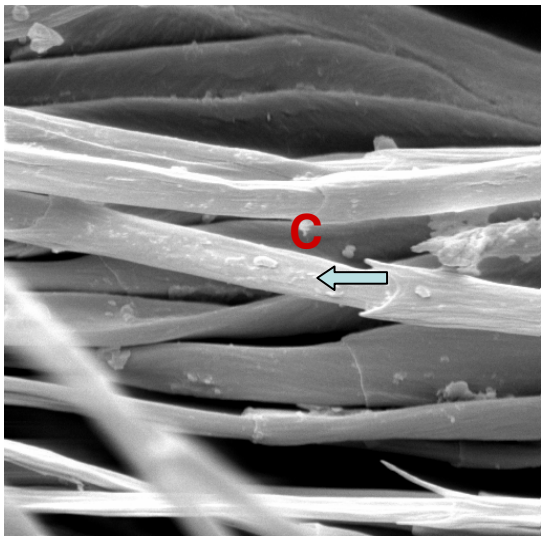
Segundo Suntorsuk e Suntorsuk (2003) a porcentagem de proteína bruta na pena é 89,2%, enquanto que em penas degradadas por *Bacillus sp*. FK 46 foi de 67,4%. O autor justifica este resultado pelo fato da proteína ter sido hidrolisada pela enzima produzida pelo microrganismo e utilizada como nutriente pela bactéria, os autores verificaram que a estrutura da pena foi alterada pela atividade da bactéria, portanto os resíduos da pena degradada pode tornar-se uma proteína digerida facilmente, podendo ser utilizada para nutrição animal.

Com o intuito de verificar a colonização das penas pelo microrganismo selecionado, assim como a estrutura das penas degradadas, realizou-se microscopia eletrônica de varredura das penas durante diferentes tempos de fermentação.

Como pode ser observada pela microscopia eletrônica de varredura apresentada na Figura 7, a fibra de queratina apresenta-se intacta antes de ser colonizada pela cepa de *Bacillus amyloliquefaciens.* A Figura 8 apresenta a microscopia realizada com 6 h de cultivo, onde pode-se observar o início da colonização das penas pela bactéria.

A partir de 24 horas de fermentação (Figura 9), fase esta em que a cepa começou a se adaptar ao meio de cultivo, o número de microrganismos aderidos às penas ainda é pequeno, devido ao crescimento reduzido dos mesmos. Nas amostras realizadas com 48 horas (Figuras 10, 11 e 12) já é possível observar maior colonização, provavelmente por ser a fase exponencial, a qual é caracterizada por crescimento acelerado do microrganismo.

Figura 7: MEV das penas em suspensão antes do cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens.* Amostra 0 h, resolução de 3000x**.**



.

Figura 8: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 6 h de cultivo, resolução 2000x, (C) célula de *Bacillus amyloliquefaciens.*

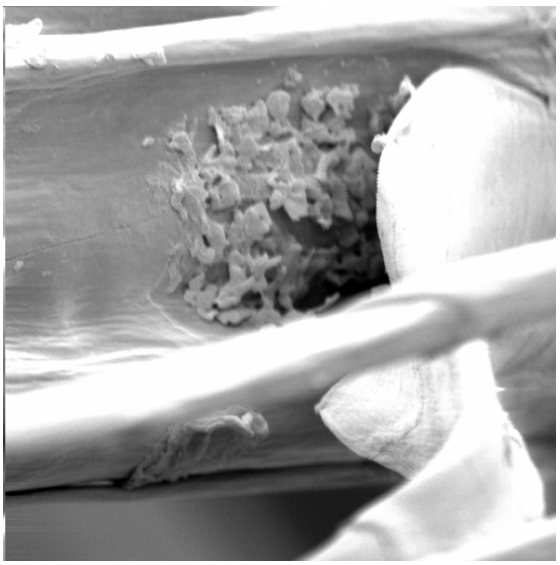


Figura 9: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 24 h de cultivo, resolução 4500x.

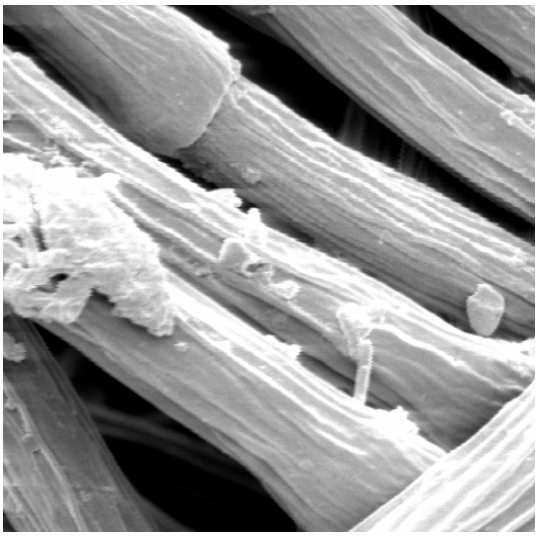


Figura 10: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 48 h de cultivo, resolução 3000x.

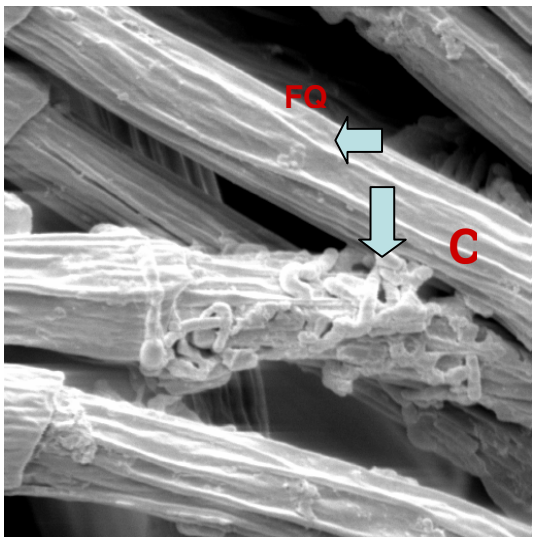


Figura 11: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 48 h de cultivo, resolução 3000x, (C) célula de *Bacillus amyloliquefaciens,* FQ Fibra de queratina.

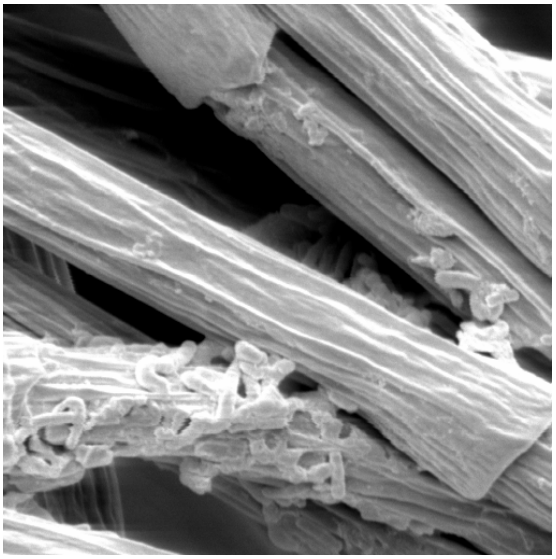


Figura 12: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 48 h de cultivo, resolução 3000x.

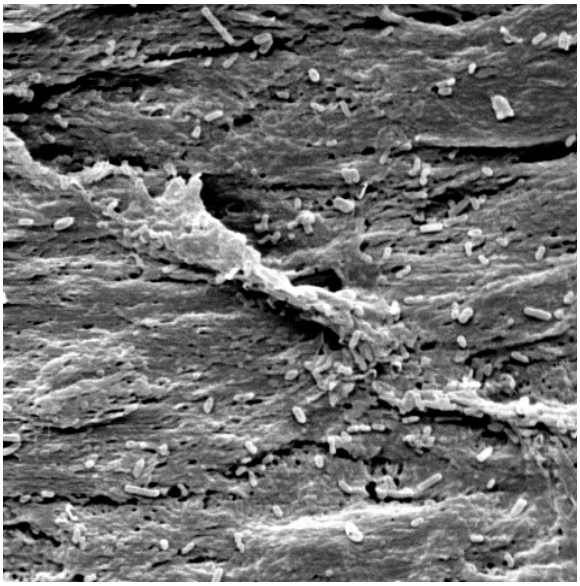


Figura 13: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

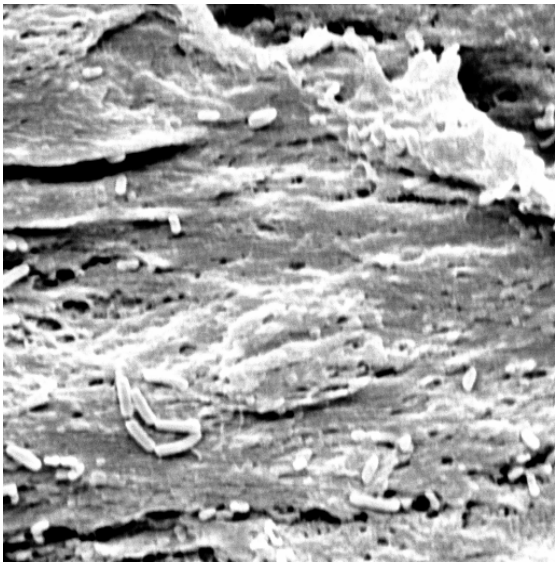


Figura 14: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

As Figuras 13 a 18 apresentam as microscopias realizadas de amostras com 72 horas de cultivo, além de se observar forte aderência dos microrganismos nas fibras de queratina, notam-se ranhuras, mostrando assim, elevada degradação. A cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou um comprimento de 1,88 µm.

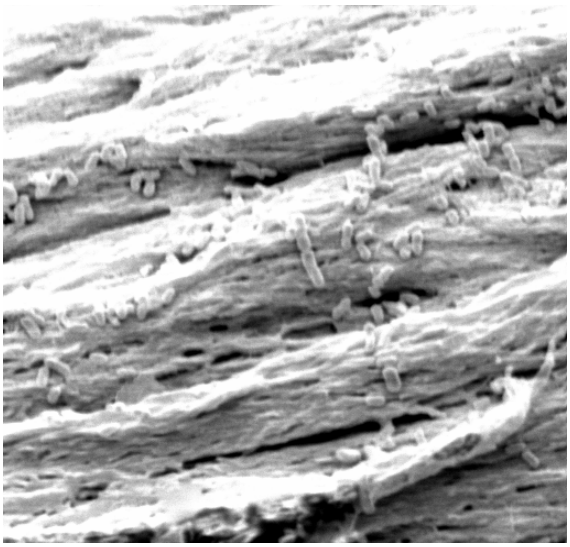


Figura 15: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

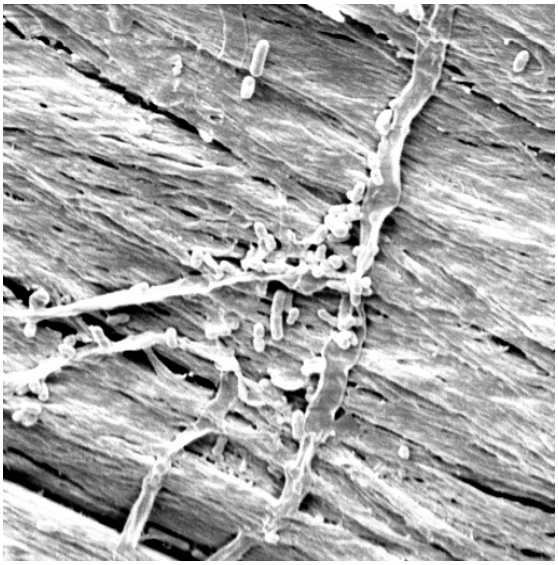


Figura 16: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

Figura 17: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

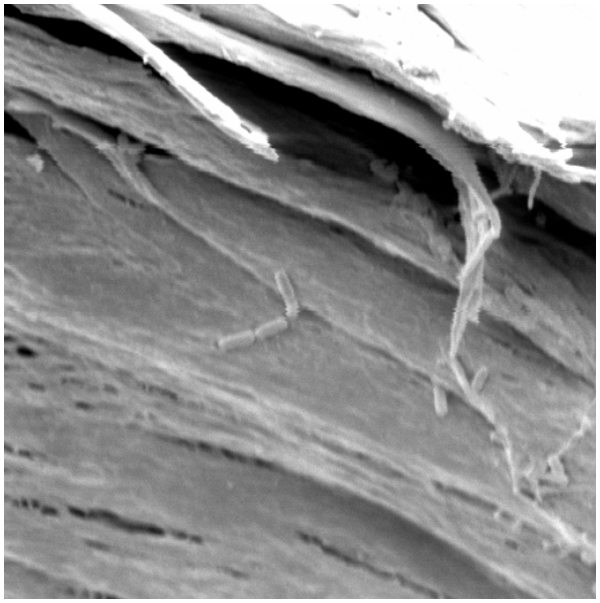


Figura 18: MEV das penas em suspensão após cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de cultura descrito por Willians et al. (1990). Amostra com 72 h de cultivo, resolução 2000x.

<u>Capítulo 7.2</u>: Estudo das condições ótimas de cultivo em shaker para a cepa *Bacillus amyloliquefaciens.*

Determinação da presença de aminoácidos no meio de cultura fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Estudo das condições ótimas de cultivo em reator para a cepa *Bacillus amyloliquefaciens.*

Caracterização físico-química do caldo enzimático de *Bacillus amyloliquefaciens.*

A fim de estudar as melhores condições de cultivo em shaker para a produção da enzima queratinase e degradação das penas por *Bacillus amyloliquefaciens,* verificou-se a influência da temperatura, agitação, pH inicial do meio de cultivo, concentração de substrato e adição de glicose no meio de cultivo.

Inicialmente verificou-se a influência da temperatura nos parâmetros citados acima, as fermentações foram conduzidas a 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo, pH inicial 7,5 e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990). A Figura 1 apresenta o efeito da temperatura de cultivo na atividade queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*, podendo-se observar que a maior atividade foi alcançada a 40 °C em 24 horas de cultivo (186,3 U/mL), resultado similar foi obtido quando a cepa foi cultivada a 35°C (167,5 U/mL), porém esta atividade foi alcançada com um tempo maior de fermentação, ou seja com 48 horas. Quando utilizada uma temperatura maior (45°C) a atividade queratinolítica produzida foi menor (38,25 U/mL), diante dos resultados obtidos pode-se inferir que a cepa seja mesofílica.

O efeito da temperatura na produção da enzima queratinase também foi estudado por Suntornsuk e Suntornsuk (2003), os autores verificaram que a melhor temperatura de cultivo foi 37°C resultando em 1,7 U/mL após 5 dias. Quando cultivado a 45°C *Bacillus* sp. produziu uma atividade enzimática menor (0,9 U/mL).

Espécies de *Bacillus* são geralmente mesofílicos e apresentam um bom crescimento quando cultivados a temperaturas entre 30-40°C (SNEATH et al. 1986 apud SUNTORNSUK e SUNTORNSUK 2003), já *Bacillus licheniformes* apresenta uma maior atividade e crescimento celular quando cultivados em temperaturas entre

45-50°C, sendo que a 65 °C não foi observado crescimento celular (WILLIANS et al. 1990).

Uma cepa de *Bacillus licheniformes* K-508 foi estudada por Manczinger et al. (2003), os quais verificaram que cultivada à 47°C esta cepa apresentava alta biomassa (8,5 UFC/mL) após 7 dias de fermentação, enquanto a 37°C o crescimento celular foi menor resultando em 7,5 UFC/mL.

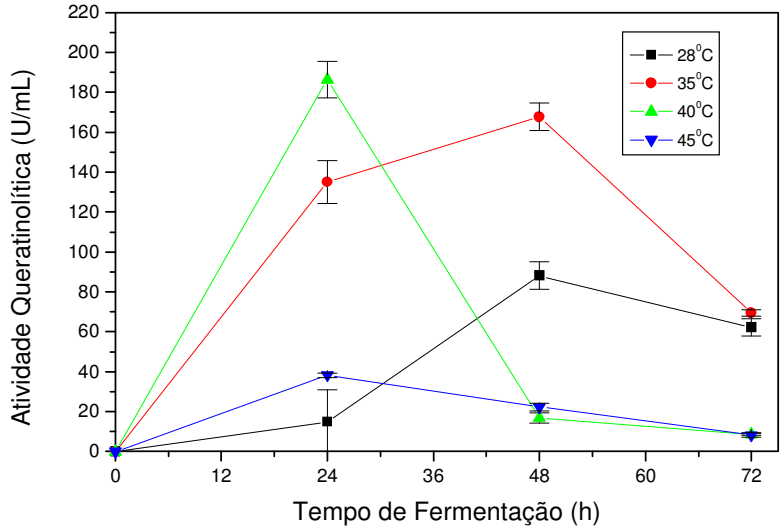


Figura 1: Efeito da temperatura (28, 35, 40 e 45°C) na atividade queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*. Condições de cultivo: 150 rpm, 1% de penas, pH inicial 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

Assim como para a atividade da enzima queratinase, a temperatura de 40°C foi a que proporcionou maior crescimento celular para a cepa estudada neste trabalho, obtendo 9,02 UFC/mL. Os resultados referentes ao crescimento celular podem ser observados na Figura 2.

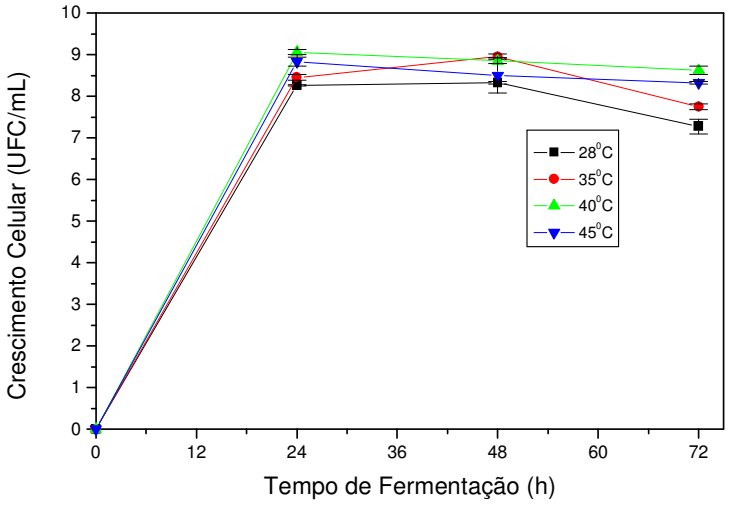


Figura 2: Efeito da temperatura (28, 35, 40 e 45°C) no crescimento celular de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 150 rpm, 1% de penas, pH inicial 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

A comparação das Figuras 3, 4 e 5 mostra o efeito da agitação no processo fermentativo neste estudo. Diante dos resultados obtidos, pode-se constatar que a maior produção da enzima ocorreu quando utilizada uma agitação de 150 rpm, como apresentado na Figura 4. Quando utilizada 100 rpm a atividade queratinolítica máxima atingida foi de 67,15 U/mL, enquanto para uma agitação maior (200 rpm) a atividade obtida foi menor (41,6 U/mL). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que uma agitação maior promove uma maior oxigenação, o que pode ter inibido a produção da enzima e conseqüentemente a degradação da queratina. Em relação ao crescimento celular é observado que não houve diferença significativa, estes resultados podem ser verificados nas Figuras 3, 4 e 5.

Resultado contrastante foi verificado por Suntornsuk e Suntornsuk (2003), os quais utilizaram uma agitação de 250 rpm. Os autores trabalharam com uma cepa de *Bacillus* sp. FK 46 utilizando 100 mL de meio de cultura contendo 1% de pena, pH 9.0, 5% de inóculo e temperatura de 37°C, nestas condições a atividade queratinolítica foi de 0,9 U/mL. Segundo estes pesquisadores uma agitação maior (200-250 rpm) promove uma maior taxa de transferência de oxigênio e melhor

mistura entre as células e o substrato, resultando em maior degradação, o que não ocorre quando utilizada agitação de 100 rpm, já uma agitação maior (300rpm) resulta em um baixo crescimento celular o que pode ser atribuído a possível danificação celular.

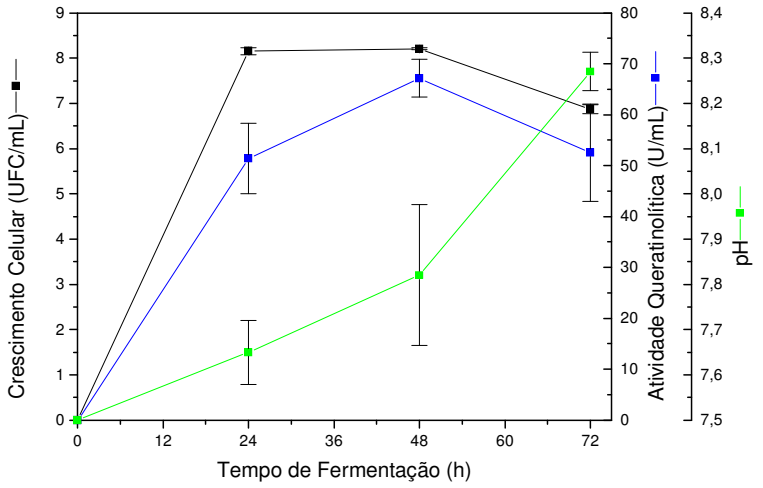


Figura 3: Influência da agitação (100 rpm) na atividade queratinolítica, pH e crescimento celular de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 1% de penas, pH inicial 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

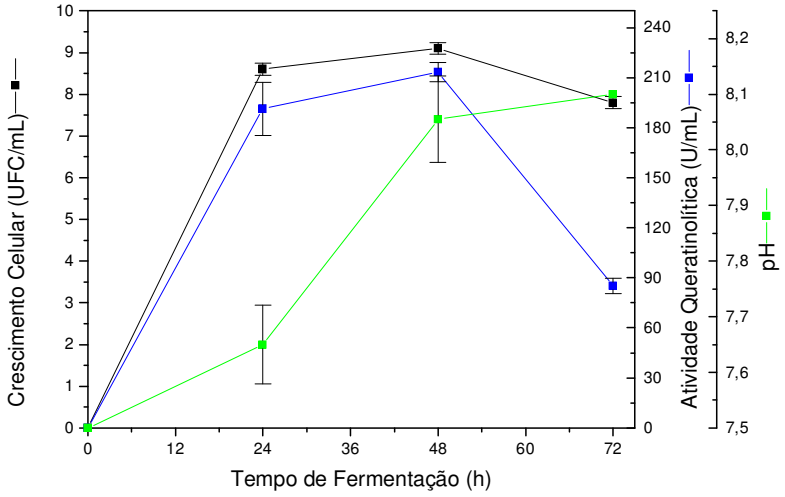


Figura 4: Influência da agitação (150 rpm) na atividade queratinolítica, crescimento celular e pH de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 1% de penas, pH inicial 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

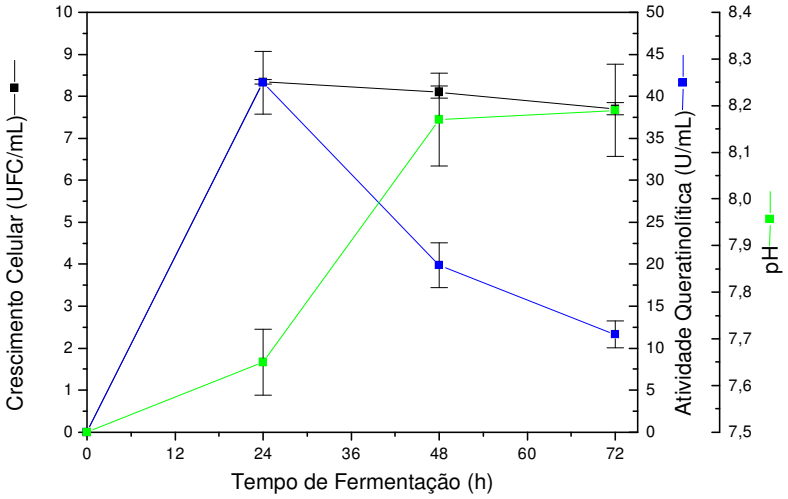


Figura 5: Influência da agitação (200 rpm) na atividade queratinolítica, crescimento celular e pH de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 1% de penas, pH inicial 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

Quando estudada a influência do pH inicial do meio de cultivo na produção da enzima queratinase, observou-se que para todas as fermentações realizadas, o pH do meio de cultivo tende a aumentar com o tempo de fermentação (Tabela 1), sendo que após 72 h de cultivo, observou-se um odor de amônia. Esse resultado também foi observado nos trabalhos de Suntornsuk e Suntornsuk (2003) e Riffel et al. (2003). Essa tendência em alcalinizar o meio de cultivo resulta da produção de amônia por meio da deaminação de peptídios e aminoácidos originados da degradação da queratina. Além disso, o aumento do pH é típico de microrganismos que crescem em substratos protéicos (RIFFEL et al. 2003; SANGALI e BRANDELLI, 2000).

Tabela 1: Influência do pH do meio de cultura no crescimento celular e pH final de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

pH	Tempo de Fermentação (h)	Crescimento Celular (UFC/mL)	pH
6,5	0	0	6,50
	24	8.52	8,50
	48	8.37	9,21
	72	8.00	8,60
7,0	0	0	7,00
	24	8.37	8,70
	48	8.23	9,29
	72	7.92	8,45
7,5	0	0	7,50
	24	8.40	7,70
	48	7.35	8,66
	72	7.34	8,65
8,0	0	0	8,00
	24	8.34	8,50
	48	7.35	9,26
	72	7.30	8,64

A Figura 6 apresenta o efeito do pH inicial do meio de cultivo na atividade da enzima queratinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*. Constatou-se que a atividade queratinolítica para pHs entre 6,5 e 7,5 aumenta com o aumento do pH, sendo que maior atividade enzimática foi produzida quando utilizado pH inicial 7,5 (100,5 U/mL).Porém quando a fermentação foi realizada com pH inicial 8.0 foi obtida uma atividade menor (79,12 U/mL).

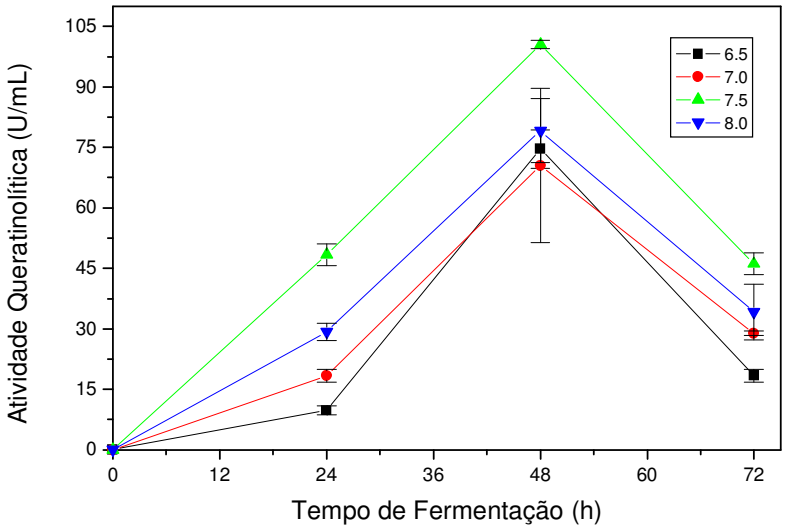


Figura 6: Influência do pH do meio de cultivo na atividade queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

Resultado similar ao obtido neste estudo, foi relatado por El-Refai et al. (2005), os autores verificaram que a atividade da enzima foi maior quando utilizado pH entre 7,5 e 8,0, resultando assim em atividade de 6,51 - 6,70 U/mL respectivamente.

Santos et al. (1996) também estudaram o efeito do pH do meio de cultivo na atividade enzimática de *Aspergillus fumigatus*, os pHs estudados foram 5,2, 6,4, e 7,2, a concentração de penas utilizada foi 1%. Os autores verificaram que a maior produção da enzima e degradação das penas ocorreu quando utilizado pH inicial de 5,2, resultando em uma atividade de 0,2 U/mL. Os autores salientaram que este resultado era esperado já que geralmente os fungos têm crescimento maior quando cultivados em pHs de ácido para neutro.

Vários autores estudaram o efeito do pH do meio de cultura na produção da enzima queratinase. Willians et al. (1990) trabalharam com *Bacillus licheniformes* em pH 7,5, Rosz et al. (2001) utilizaram o mesmo microrganismo, porém utilizando pH 7.0, *Bacillus pumilis* foi cultivado por EL-Refai et al. (2005) à pH 7,5, mesmo pH utilizado nas fermentações realizadas por Lin et al. (1997), já Suntornsuk e Suntornsuk (2003) utilizaram pH 9.0 para cultivar uma cepa de *Bacillus* sp.

Wang et al. (1999), demonstraram em seu trabalho que o controle do pH durante a fermentação não é necessário, os mesmos utilizaram duas cepas de *Bacillus*, sendo *Bacillus subtilis* FDB-29 e *Bacillus licheniformes* PWD-1. A maior atividade da enzima foi alcançada quando não foi utilizado controle de pH, quando o pH passou a ser controlado, a cepa de *Bacillus subtilis* produziu maior atividade quando cultivada a pH 8.5, e *Bacillus licheniformes* em pH 7,5. Vale ressaltar que a concentração de penas no meio de cultura foi de 1%, sendo que a temperatura usada na fermentação foi diferente para as duas cepas estudadas, a cepa de *B. subtilis* foi cultivada a 37°C e *B. licheniformes* 50°C. Para a determinação da atividade queratinolítica foi usado azoqueratina sintetizada em laboratório.

Com o intuito de verificar a presença de aminoácidos no caldo de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* quando cultivado em diferentes pHs, realizou-se cromatografia em camada delgada das amostras de caldo de cultura de diferentes pHs e tempo de cultivo.

Como observado na Figura 7, as amostras do caldo de cultura com pH inicial de 6,5 com 24 e 48 horas de cultivo não formaram manchas visíveis, o aminoácido cisteína apareceu em todas as amostras, os aminoácidos serina, (que é um aminoácido presente em β – queratina) também. Além desse aminoácido, o caldo de cultura mostrou a presença de prolina que é um aminoácido raro presente nas penas.

O aminoácido metionina foi mais fortemente evidenciado nas amostras cultivadas a pH 8,0, este aminoácido presente no caldo de cultura é um aminoácido raramente encontrado na queratina de penas e, dessa forma, tal como foi sugerido por Nam et al. (2002) provavelmente é produzido como metabólito pela bactéria.

Não se pode afirmar com certeza a liberação dos aminoácidos tirosina e leucina, devido ao fato das manchas se sobreporem, portanto fica de difícil análise se a mancha apresentada foi da liberação de tirosina ou leucina ou de ambas, porém esses aminoácidos foram encontrados no caldo da cultura de *Streptomyces thermoviolaceus* através da cromatografia em papel realizada por Chitte et al. (1999).

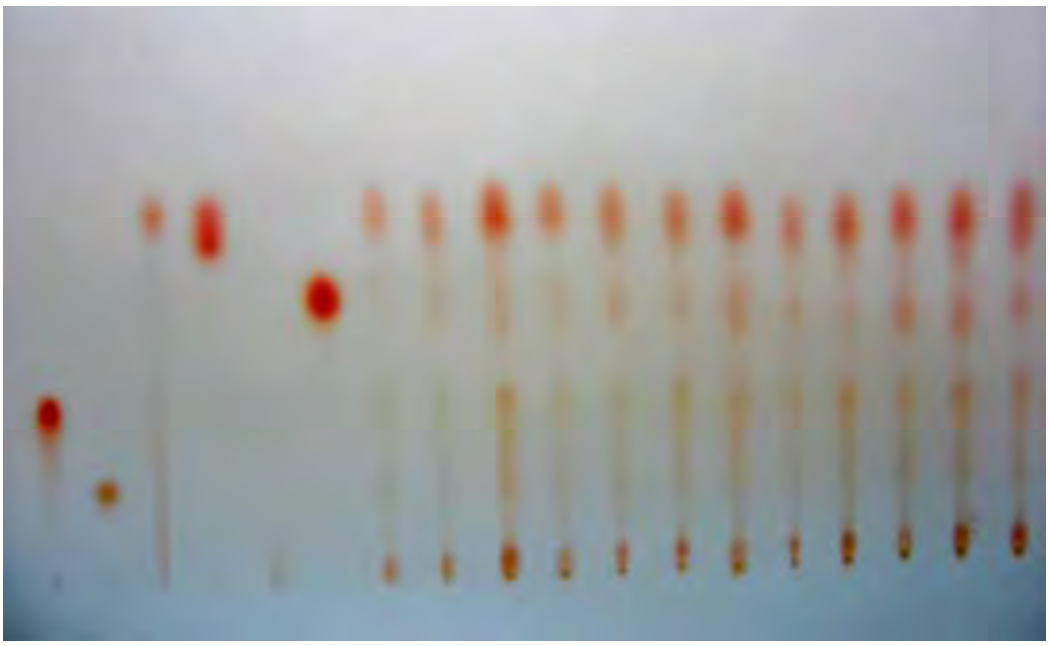


Figura 7: Cromatografia em camada delgada (da esquerda para a direita: amostra padrão Serina, Prolina, Tirosina, Leucina, Cisteína e metionina, amostra do material fermentado: pH 6.5 (24, 48 e 72 h), pH 7.0 (24, 48, 72 h), pH 7.5 (24, 48 e 72 h), pH 8.0 (24, 48 e 72 h).

Os resultados obtidos pela cromatografia em camada delgada constatam a liberação dos aminoácidos no caldo de cultura de *Bacillus amyloliquefacines,* permitindo assim sua utilização como ração animal.

Outro parâmetro importante a ser analisado, sendo, portanto, estudado neste trabalho, foi a influência da concentração de penas no meio de cultivo, e a influência desta concentração na atividade queratinolítica e crescimento celular de *Bacillus amyloliquefaciens*. A concentração de penas utilizada no meio de cultivo pode influenciar na produção da enzima queratinase e no crescimento celular do microrganismo. Observando a Figura 8, pode-se verificar que para um aumento da concentração de penas ocorreu um aumento na atividade da enzima, sendo que utilizando 3% de penas a atividade queratinolítica foi de 166,5 U/mL, resultado este obtido com 72 horas de fermentação. Fato similar foi constatado por Refai et al. (2005), os quais observaram que o aumento da concentração de penas foi proporcional a atividade da enzima. Resultado similar foi também obtido por Suntornsuk e Suntornsuk (2003).

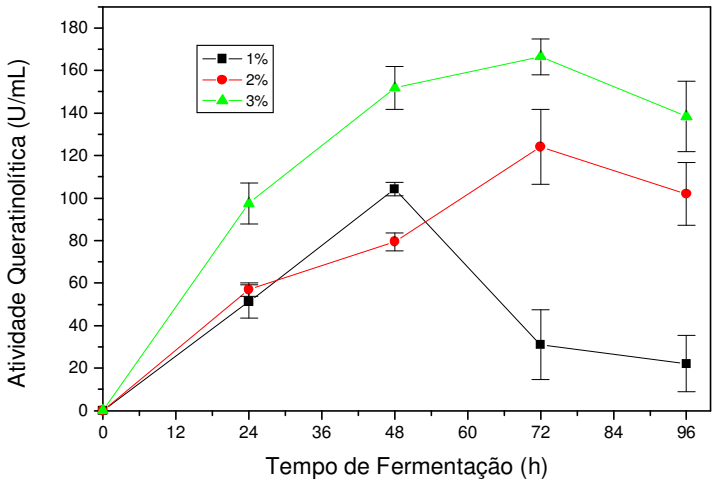


Figura 8: Efeito da concentração de penas na atividade enzimática *Bacillus amilolyquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 150 rpm, pH 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

A Figura 9 apresenta a porcentagem de degradação das penas quando utilizado diferentes concentrações de substrato, pode-se concluir que a porcentagem de degradação foi maior quando utilizada 2% de penas, atingindo ao final de 96 horas 98,5%, enquanto para 3% de penas a porcentagem de degradação foi de 88,26%.

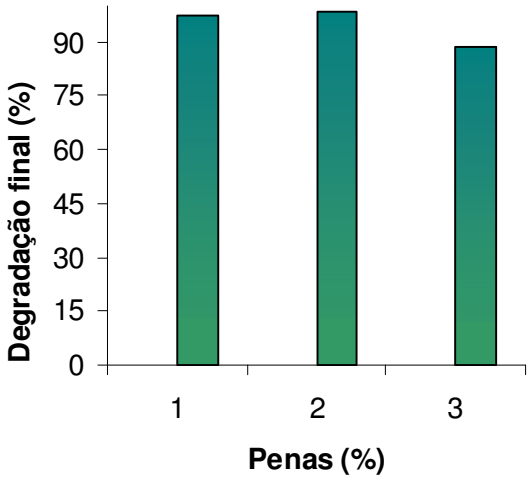


Figura 9: Porcentagem de degradação das penas em função da concentração de penas no meio de cultura.

A Figura abaixo apresenta a influência da concentração de penas no crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens,* mostrando que quando utilizado 3% de penas o crescimento celular foi maior, alcançando com 48 h de cultivo 8,72 UFC/mL.

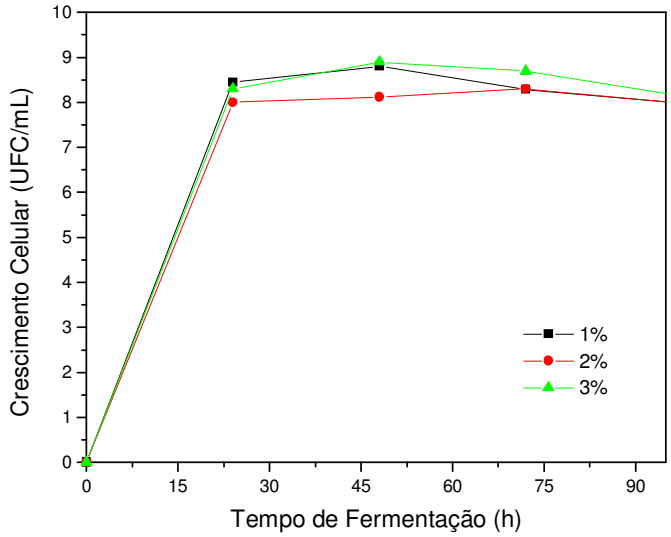


Figura 10: Influência da concentração de penas no crescimento celular de *Bacillus amilolyquefaciens.* Condições de cultivo: 40°C, 150 rpm, pH 7,5, 2% de inóculo e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

Por fim, estudou-se a influência da adição de glicose no meio de cultivo. Pode-se notar pela Figura 11 que analisou-se também a atividade proteolítica em diferentes tempos de fermentação, esta determinação passou a ser realizada por se constatar durante os estudos que o substrato utilizado (azoqueratina-Sigma) não se apresentava de forma homogênea quanto a coloração, sendo assim, a realização de ensaios de atividade proteolítica podem ajudar na conclusão dos resultados obtidos.

Analisando a Figura 11, pode-se concluir que a adição de glicose no meio de cultura não favoreceu a produção da enzima, sendo que a maior atividade enzimática foi obtida com 48 horas de cultivo (94,25 U/mL), já o crescimento celular foi alto, com 24 horas de cultivo observou-se 9,9 UFC/mL, isto pode ser explicado pela presença da glicose no meio de cultivo, sendo esta uma fonte de carbono facilmente metabolizada pelo microrganismo.

Esta queda na atividade da enzima quando carboidratos são adicionados ao meio de cultura é um mecanismo de repressão catabólica por carboidratos no controle de biossíntese de proteases microbianas (West et al. 1994), incluindo queratinases produzidas por *Bacillus licheniformes* (Lin et al. 2001) e S*treptomyces thermonitrificans* (Mohamedin 1999).

As enzimas induzidas quando submetidas a fontes extras de carbono, sofrem repressão catabólica, sendo este comportamento comumente encontrado em espécies do gênero *Bacillus.* Espécies desse gênero usam preferencialmente glicose como fonte de energia, portanto, a biossíntese de enzimas envolvidas no catabolismo protéico só é observada na ausência de fontes de carbono facilmente metabolizadas, como a glicose (STULKE e HILEN 2000). O mecanismo de repressão pode também ser parcial, onde a repressão é diminuída, como acontece com alguns microrganismos produtores de proteases queratinolíticas, sendo este mecanismo relatado por Noval e Nickrson, 1958 (*Streptomyces fradie*), Wang e Shih 1999 (*B. licheniformes)* e Thys et al. 2004 (*Microbacterium sp*).

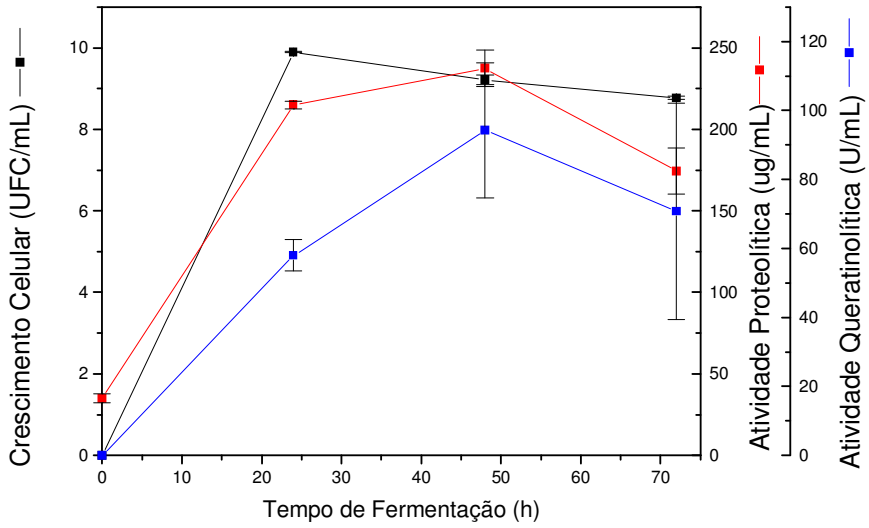


Figura 11: Influência da adição de glicose 50mM, no crescimento celular e atividades proteolítica e queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*. Condições de cultivo: 40°C, 150 rpm, pH 7,5, 2% de inóculo, 1% de penas e meio de cultura proposto por Willians et al. (1990).

A adição de glicose no meio de cultura favoreceu a produção da enzima queratinase nos estudos realizados por El-Naghy et al. (1998), sendo que o meio de cultura contendo glicose a 1% elevou a atividade da enzima em 133%.

Resultado similar em que a adição de glicose resultou em inibição da atividade de proteases foi relatado por Thys et al. (2004). Os autores verificaram que não houve atividade queratinolítica quando o meio de cultura contendo: penas 1,5 %, NaCl 0,05%, K_2HPO_4 0,07 e KH_2PO_4 0,14, foi suplementado com glicose 0,5%.

Forte Inibição por glicose ocorreu também nos estudos realizados por Wang e Shih (1999), os autores verificaram que a atividade queratinolítica teve um declínio de 96,4% em relação ao meio sem glicose. Inibição por glicose também foi constatado por Brandelli e Riffel (2005), sendo que os autores cultivaram a cepa de *Chryseobacterium* sp em um meio contendo (g/L) penas 10, NaCL 5, Na_2HPO_4 0,4 e NaH_2PO_4) sendo a adição de glicose na concentração de 10g/L reduziu a atividade queratinolítica em 94,45%. Resultado similar foi obtido por Suntornsuk e Suntornsuk (2003), que observaram uma queda de 77,8% na atividade da enzima quando glicose foi adicionada ao meio de cultura em uma concentração de 1%.

Riffel (2006) verificou que a cepa *Chryseobacterium sp* Kr6 apresentou maior crescimento celular quando cultivada em meio contendo além de penas, glicose (50 mM), sendo que maior biomassa ocorreu com 25 horas de cultivo (9,7 UFC/mL), quando cultivada em meio contendo penas sem a adição de glicose, o crescimento foi de 9,6 UFC/mL resultado este obtido com o mesmo tempo de fermentação. O meio de cultura contendo somente glicose como fonte de carbono resultou em um crescimento de 7,5 UFC/mL.

Uma vez definida as condições ótimas de cultivo para a produção da enzima queratinase em shaker, realizou-se uma fermentação na qual foram reunidas as condições encontradas (40°C, 150 rpm, 2% de inóculo, 1% de penas e pH inicial 7,5), os resultados podem ser visualizados na tabela abaixo.

Tabela 2: Atividade queratinolítica, proteolítica e crescimento celular de *Bacillus amyloliquefaciens* obtido na fermentação realizada sob as condições de: 40°C, 150 rpm, pH 7,5, 2% de inóculo, 1% de penas e meio de cultura proposto por Willians et. al. (1990).

Tempo de Fermentação (horas)	Atividade Queratinolítica (U/mL)	Atividade Proteolítica (µg/mL)	Crescimento Celular (UFC/mL)
24	57,0	360,0	8,45
48	132,8	373,0	9,20
72	53,3	292,5	8,40

Com 48 horas de cultivo, tempo em que ocorreu maior atividade queratinolítica (132,75 U/mL), a fermentação foi interrompida e o caldo bruto livre de células foi caracterizado, analisando assim, a influência de agentes químicos e físicos na atividade da enzima.

Para realização deste estudo, primeiramente analisou-se a influência do pH na atividade queratinolítica e proteolítica. Como observado, tanto a atividade proteolítica (Figura 12) como queratinolítica (Figura 13) apresentaram-se baixas quando determinadas em valores extremos de pH. Valores extremos de pH geralmente inativam as enzimas, pela protonação ou desprotonação de aminoácidos que estão presentes no sítio catalítico da enzima (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Observou-se que a atividade proteolítica ótima foi obtida em pH 8, sendo que para valores inferiores e superiores a esse pH ocorreu diminuição da atividade proteolítica.

Valores similares foram encontrados quando se determinou a atividade queratinolítica, sendo que em pH 4.0 obteve-se menor atividade, e maior atividade foi obtida quando o ensaio foi realizado em pH 8,5.

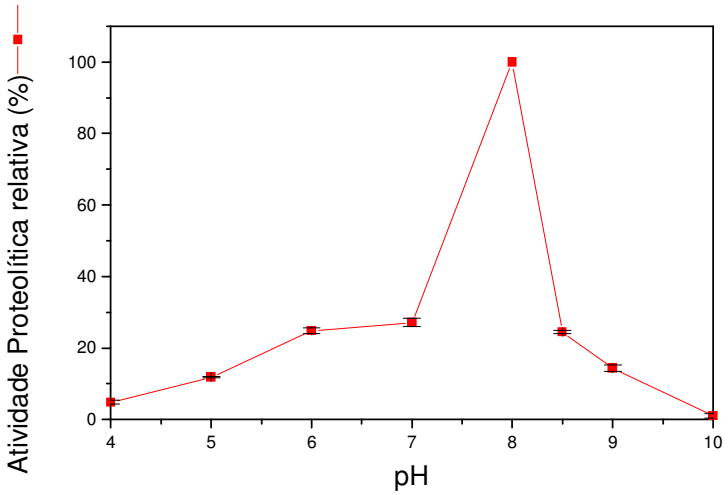


Figura 12: Atividade Proteolítica em diferentes valores de pH. Atividade determinada a 50ºC.

A influência do pH na atividade da enzima queratinase também foi relatada por Riffel (2006), o autor realizou este estudo com a enzima purificada, constatando que em pHs mais baixos 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 e 10,0) atividades inferiores foram verificadas: 40, 45 e 65% respectivamente.

Geralmente as determinações de atividade enzimática são realizadas em pH 8,0 ou 8,5, sendo mais ativas nesta faixa. Nos estudos realizados por Oliveira (2006), a queratinase produzida por *Streptomyces* sp apresentou-se mais ativa nesta faixa de pH, o autor verificou que a atividade queratinolítica tende a aumentar com o aumento do pH, decrescendo quando determinada em pH 9,0 (20% inferior).

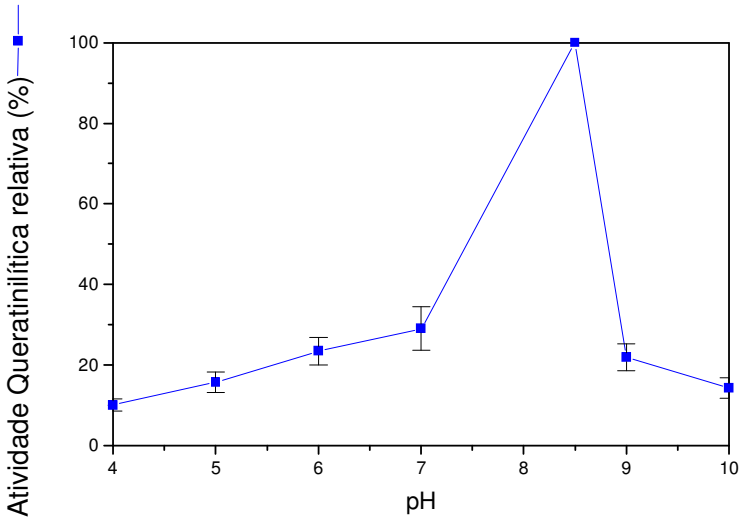


Figura 13: Atividade Queratinolítica em diferentes valores de pH. Atividade determinada à 50ºC.

Resultado semelhante foi obtido por Letourneau et al. (1997), os autores constataram que a atividade da enzima queratinase produzida por *Streptomyces* sp foi determinada em pH 5,0, esta se apresentou inativa, porém diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, atividade máxima ocorreu em pH 10.0. Máxima atividade da enzima ocorreu também em pH 10.0 nos estudos realizados por Bernal et al, (2003), quando estudada a queratinase produzida por *Kokurea rosea* LPB 3.

Outras enzimas mostraram-se mais ativas em pH alcalino, como aquelas estudadas por Yamamura et al. (2002), El-Refai et al. (2004) e Riffel et al. (2003).

Quando verificada a influência da temperatura na atividade da enzima queratinase, como mostra a Figura 14, esta se apresentou mais ativa em uma variação de temperatura de 40 a 60°C, alcançando um valor máximo quando incubada a 50ºC, isto ocorreu tanto para a atividade proteolítica quanto para queratinolítica. Menor atividade enzimática foi obtida quando a temperatura de 30ºC foi usada, resultando em uma atividade 95,1% inferior a observada a 50ºC. Este resultado contrasta com o observado por Scopes (1993), o qual relatou que com o aumento da temperatura, ocorreu uma elevação da atividade da enzima, aumentando assim, a formação do complexo enzimático.

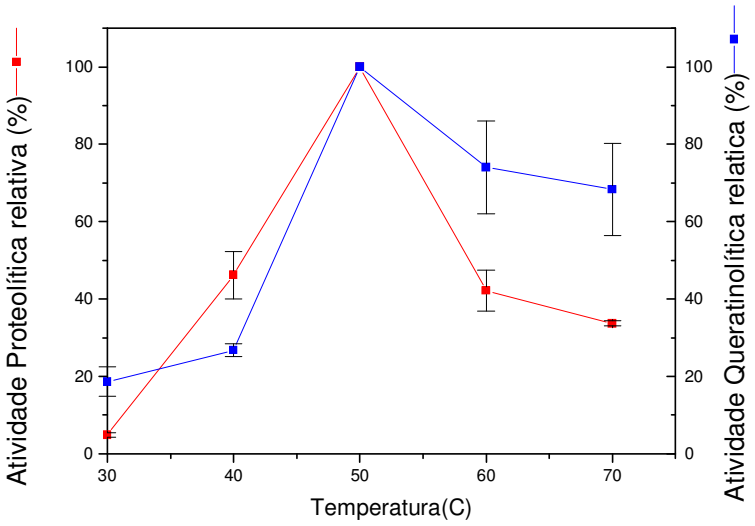


Figura 14: Atividade Proteolítica e Queratinolítica em diferentes temperaturas

Sabe-se que com o aumento contínuo da temperatura, entretanto, pode ocorrer inativação gradativa da enzima, até sua inativação total, fato este causado pela desnaturação da proteína pelo calor, o que foi comprovado neste trabalho. 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 em temperaturas na faixa de 45ºC (BOBBIO e BOBBIO 1995).

Riffel (2003), trabalhando com a cepa *Chryseobacterium* sp Kr6 constatou que a enzima purificada apresentou maior atividade quando incubada a 50ºC. Quando a temperatura de 60ºC foi utilizada ocorreu uma diminuição da atividade em 70%. Oliveira (2006), trabalhando com cepa de *Streptomyces* sp também observou que a 60ºC a enzima apresentava maior atividade. Gessesse et al. 2002 trabalhando com a cepa de *Nesternkonia* sp e *Bacillus pseudofirmus* obtiveram melhor atividade enzimática utilizando a temperatura de incubação de 50ºC.

A enzima sintetizada por *Streptomyces* sp apresentou alta atividade quando incubada a 70ºC (100%), sendo que a 80ºC manteve sua atividade em 50% (LETOURNEAU et al. 1998). Valores ótimos de atividade (100%) foram observados por Thys et al. (2004) e Bockle et al. (1995), quando 55ºC foi à temperatura usada. Alta atividade também foi observada por Riffel et al. (2003), obtendo 100% de

atividade quando a enzima produzida por *Chryseobacterium* sp foi incubada a 75ºC.

A enzima excretada pela cepa de *Kokurea rosea* LPB 3, apresentou alta atividade quando incubada a 40ºC, já a enzima relatada no trabalho de Yamamura et al. (2002), foi mais ativa em 30ºC, perdendo 70% de sua atividade quando incubada a 50ºC.

El-Refai et al. (2004), observaram em seus estudos que a enzima produzida por *Bacillus pumilis* FH 9 foi mais ativa na temperatura de 55ºC, mantendo alta atividade quando incubada a 45 e 65Cº (90%), sendo que a 75ºC esta atividade apresentou-se 65% inferior.

A Figura 15 apresenta a estabilidade térmica das proteases do caldo de fermentação de *Bacillus amyloliquefaciens* quando incubada a 40ºC. Pode-se observar que a atividade proteolítica manteve-se em 50% por 4 horas de incubação, sendo que após 7 horas esta atividade sofreu um declínio de 70%. Resultado semelhante foi obtido para a atividade queratinolítica, a qual manteve 50% de sua atividade após 4 horas de incubação.

Quando utilizou-se a temperatura de incubação de 50ºC (Figura 16), a atividade proteolítica apresentou-se menor, sendo que com 2 horas de incubação esta atividade permaneceu 66,3%. Já a atividade queratinolítica manteve-se 50% após 3 horas de incubação.

Observa-se que a enzima produzida por B*acillus amyloliquefaciens* apresentou baixa atividade quando incubada a 60ºC (Figura 17), sendo que com 2 horas, a atividade proteolítica apresentou-se 79% inferior, porém a atividade queratinolítica foi maior neste mesmo tempo de incubação (58,8%), após 5 horas esta apresentou-se baixa (12,7%).

Como mencionado anteriormente, altas temperaturas podem desnaturar algumas proteínas, o que ocorreu quando a temperatura de incubação utilizada foi 70ºC, nesta temperatura houve total inibição quando a atividade da enzima queratinase foi determinada, sendo que a atividade proteolítica mostrou-se também inferior (Figura 18).

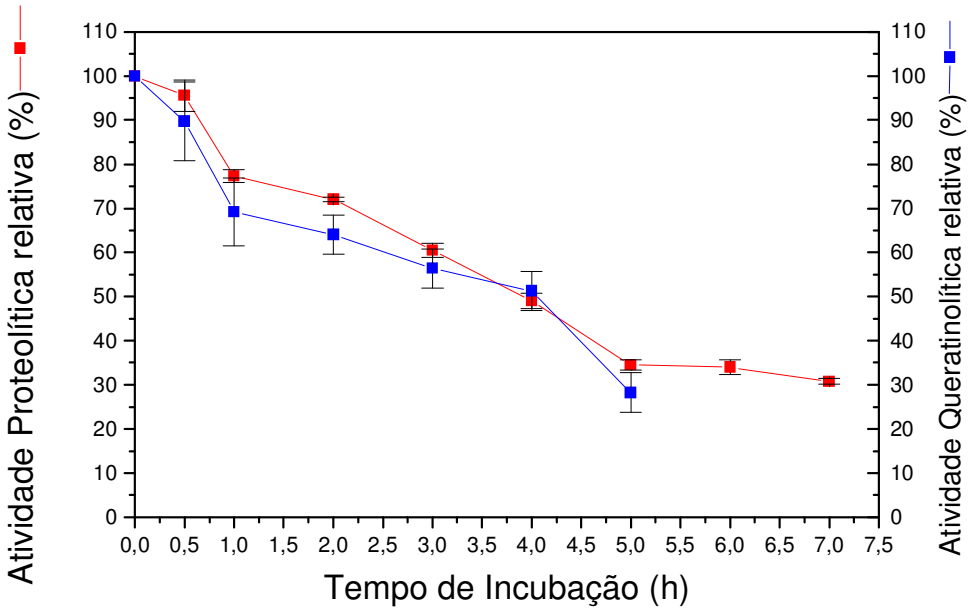


Figura 15: Estabilidade térmica de proteases e queratinase em temperatura de 40ºC

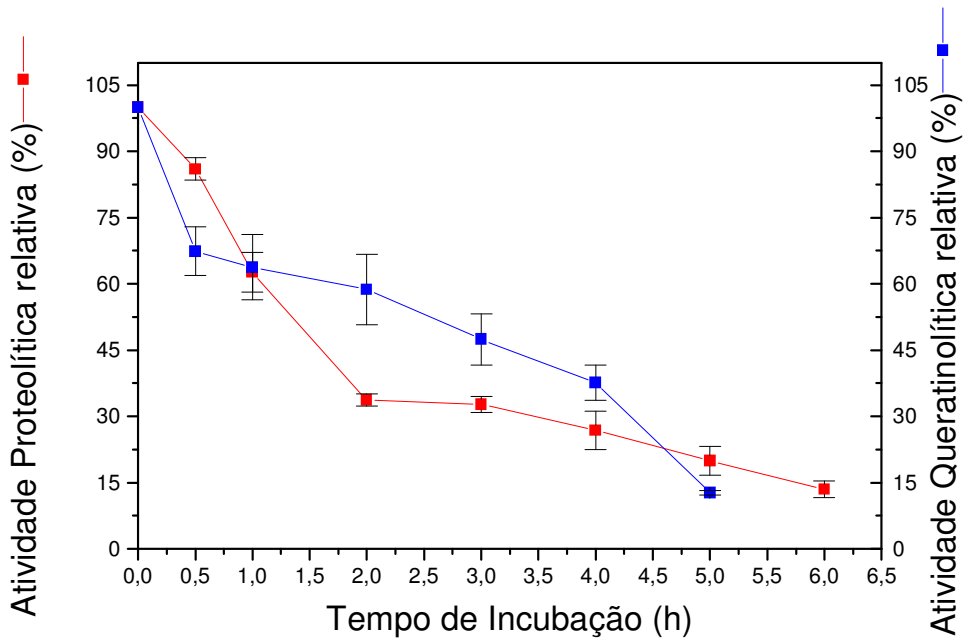


Figura 16: Estabilidade térmica de proteases e queratinase em temperatura de 50ºC

Maior estabilidade apresentou a enzima excretada pela cepa de *Streptomyces* sp, no qual o autor observou que a 37ºC a atividade queratinolítica manteve-se próxima a 100%, após 250 minutos de incubação. Quando incubada a 50ºC, a enzima manteve 60% de sua atividade após o mesmo período. Já a 80 ºC não houve atividade da enzima (OLIVEIRA, 2006).

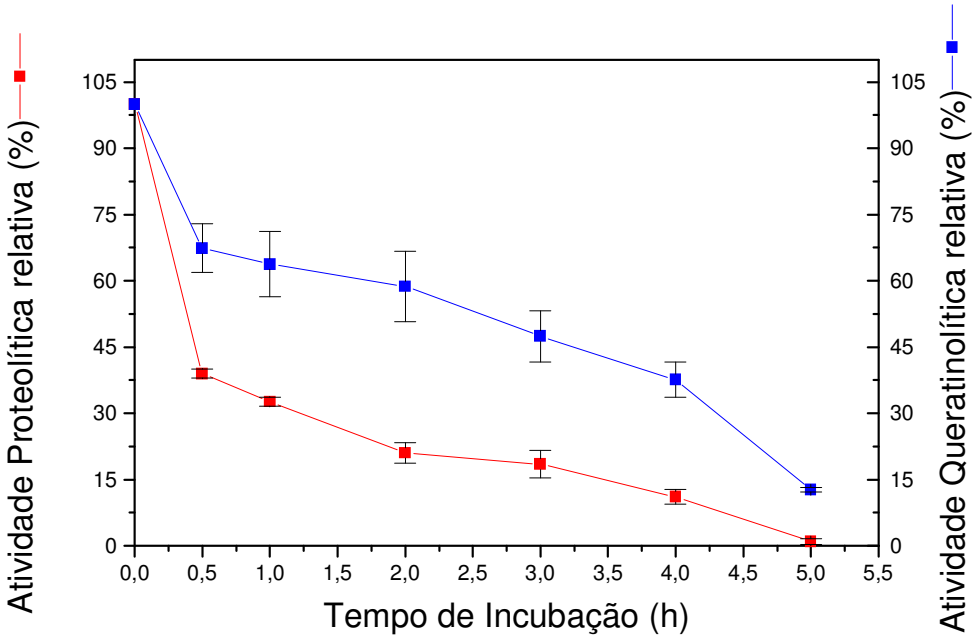


Figura 17: Estabilidade térmica de proteases e queratinase em temperatura de 60ºC

A influência da temperatura na estabilidade de proteases também foi verificada por Gessesse et al. (2003). Os autores trabalharam com a cepa de *Nesternkonia* sp AL-20 e *Bacillus pseudofirmus* AL-89, verificando que enzimas produzidas por AL-20 apresentaram maior estabilidade quando incubadas a 55ºC, mantendo após 60 minutos atividade proteolítica próxima a 100%. Quando incubada a 65ºC, esta estabilidade foi menor, sendo que com 60 minutos observou-se 80% de atividade. Quando utilizada uma temperatura elevada (70 ºC) ocorreu uma perda de 80% de atividade após um curto período de incubação (30 minutos).

Menor estabilidade foi observada com proteases produzidas por AL-89. Quando incubadas a 55ºC manteve 80% de sua atividade após 60 minutos de incubação, em 65ºC após 40 minutos houve perda de 75% de sua atividade e a 75ºC após 20 minutos houve inibição total.

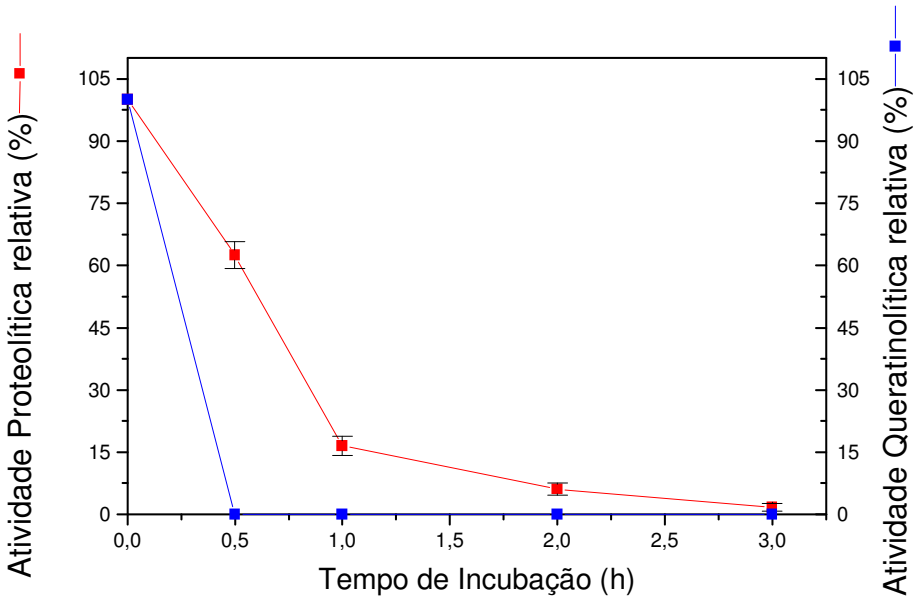


Figura 18: Estabilidade térmica de proteases e queratinase em temperatura de 70ºC

A enzima queratinase produzida por *Stenotrophomonas* sp foi incubada em uma faixa de temperatura de 10 a 60ºC durante 60 minutos. Os autores constataram que com o aumento da temperatura ocorreu diminuição na estabilidade das mesmas, sendo que a 50 e 60ºC a enzima foi inativada após 10 minutos de incubação.

El-Refai et al. (2004) analisaram a estabilidade da queratinase produzida por *Bacillus pumilis* quando incubada por 30 minutos, em diferentes temperaturas. Os autores constataram que houve perda de 14, 28, 51 e 89% da atividade quando incubadas a 50, 60, 70 e 80ºC respectivamente. Estabilidade maior observou Riffel et al. (2003) quando incubou a enzima produzida por *Chryeobacterium* sp em diferentes temperaturas, os autores verificaram que a enzima foi estável por 1 hora a

37ºC mantendo 80% de sua atividade inicial, a 55ºC manteve 60% de atividade após 2 horas e quando incubada a 70ºC, 50% da atividade foi mantida.

A Figura 19 apresenta as atividades proteolíticas relativas quando o caldo de cultura isento de células foi incubado em diferentes substâncias. Nota-se que houve ativação quando incubadas em $MgCl_2$ (2mM- 107,2%), $MnCl_2$ (2mM- 117%), $MnCl_2$ (10mM- 115,6%), $CaCl_2$ (2mM-108%). Inibição ocorreu na presença de $CuSO_4$ (2mM- 78%), $CuSO_4$ (10mM- 82,8), HgCl (2mM- 75,4%), HgCl (10mM- 77,6%), $BaCl_2$ (2mM- 83,8%), $BaCl_2$ (10mM- 62,8%), $FeCl_3$ (2mM-27,6%), $FeCl_3$ (10mM-24,8%), ZnCl (2mM-54,2%) e ZnCl (10mM-34,5%).

Quando a atividade queratinolítica (Figura 20) de *Bacillus amyloliquefaciens* foi avaliada, observou-se que houve inibição quando a enzima foi incubada em $CuSO_4$ (2Mm- 61,3%), $CuSO_4$ (10mM-55,8%), $MgCl_2$ (2mM-47,6%), $MgCl_2$ (10mM- 37,5%), HgCl (2mM- 41,6%), HgCl (10mM- 53,1%), $MnCl_2$ (2mM- 53,7%), $MnCl_2$ (10mM-33,4%), $FeCl_3$ (2mM- 62,6%) e $FeCl_3$ (10mM- 51,1%).

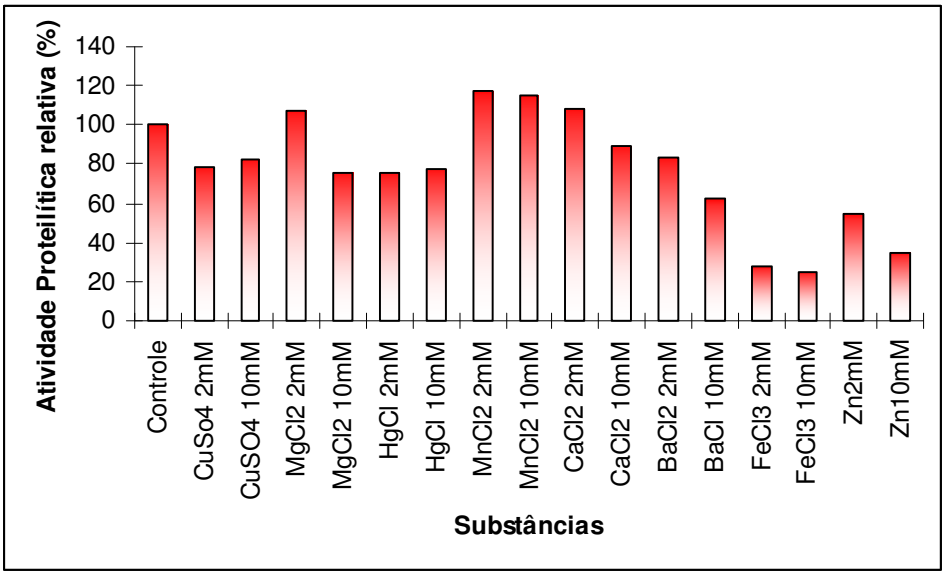


Figura 19: Atividades Proteolíticas residuais quando incubadas com diferentes íons.

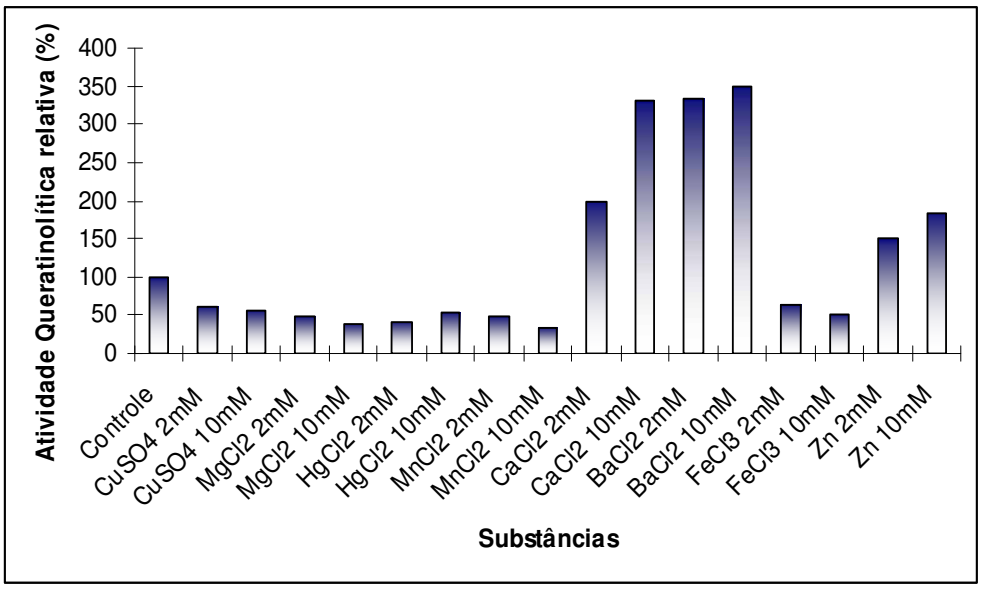


Figura 20: Atividades Queratinolíticas residuais quando incubada com diferentes íons

Ativação ocorreu quando o extrato enzimático foi incubado em CaCl2 (2mM e 10mM) atingindo respectivamente uma atividade relativa de 200 e 330%.

Na presença de $BaCl_2$ a ativação também foi alta, sendo que, a concentração de 10mM resultou em uma atividade relativa de 350%.

Contrastando com os resultados obtidos de atividade proteolítica, em que a presença de Zn inibiu esta atividade, houve aumento na atividade queratinolítica em 150% e 183,3% quando as concentrações de 2 e 10 mM foram adicionadas a enzima.

Alguns metais aumentam e estabilizam a atividade de proteases. Estes resultados sugerem que estes metais aparentemente protegem a enzima da desnaturação térmica, mantendo a conformação da enzima mesmo em altas temperaturas.

Analisando a enzima secretada por *Streptomyces* sp, Riffel (2006) constatou que a enzima sofreu ativação quando incubada em Cálcio (355%), Magnésio (114%), sendo que quando incubada em Cobre (2mM) esta apresentou apenas 24% da atividade inicial.

Oliveira (2006) verificou em seu trabalho que a enzima queratinase produzida por *Streptomyces sp* foi estimulada por $BaCl_2$ 2mM (138,5%), sendo que o mesmo apresentou efeito inverso quando na concentração de 10mM. A enzima foi fortemente inibida por $CaCl_2$, $MnCl_2$, $HgCl_2$ e $ZnCl_2$. Inibição total por Zn (1mM) foi constatado por Letourneau et al, (1998) o qual estudou a queratinase produzida por *Streptomyces* sp.

Várias peptidases são inibidas pelo excesso de zinco, particularmente em meio neutro e alcalino, sendo que algumas metaloproteases são inibidas por este excesso. Vale ressaltar que o íon metálico age provavelmente como uma espécie de "ponte" para manter a estrutura da conformação do substrato ao complexo enzimático. O íon metálico também exerce um papel importante na estabilidade de proteases térmicas (SUNTORNSUK e SUNTORNSUK 2003).

Inibição por $HgCl_2$ foi verificada nos estudos realizados por Thys et al. (2004), sendo que a concentração de 5mM levou a uma inativação total da enzima. O efeito do Hg inibindo a enzima sugere que cisteína esteja presente no sítio ativo da enzima ou próxima dessa região.

Kumar et al. (1999) verificaram que a enzima secretada por *Bacillus* sp foi fortemente inibida quando incubada com Hg 10mM (96% de inibição), mesmo uma concentração menor (1mM) ocasionou inibição elevada (74%). Cálcio nas concentrações de 1 e 10mM exerceram pouco efeito na atividade, resultando em 101 e 115% de atividade, o mesmo ocorreu com Mg e Mn, sendo que a concentração de 10mM de Mg elevou a atividade em 16% e Mn na mesma concentração em 19%.

Como observado na Figura 21, a atividade de proteases foi inibida por Tween, DMSO (dimetilsulfóxido) e isopropanol (5%). Ativação ocorreu quando Triton e mercaptoetanol foram incubados no caldo isento de células. Quanto à atividade queratinolítica (Figura 22), observa-se que também houve inibição pelo solvente orgânico DMSO, isopropanol, porém ocorreu aumento na atividade queratinolítica quando esta foi incubada na presença de tween.

Solventes orgânicos como metanol, etanol e isopropanol parecem induzir a atividade da enzima, desta maneira, estes desnaturantes aparentemente induzem mudanças na enzima resultando em grande atividade catalítica (Peek et al. 1992).

As atividades foram parcialmente inibidas quando incubadas em EDTA, sendo que com o aumento da concentração ocorreu diminuição nas atividades, inibição total foi verificada quando a concentração de 50 mM foi utilizada.

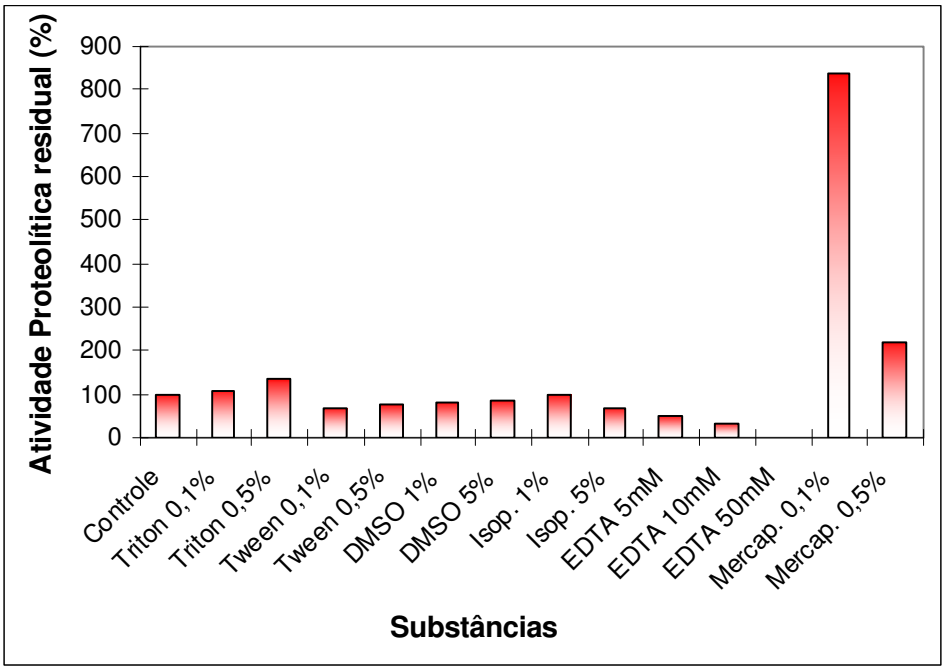


Figura 21: Atividades Proteolíticas residuais quando incubada com diferentes substâncias

Leve Inibição da enzima por EDTA foi verificada por Letourneau et al., (1998), resultando em uma perda de 30% na atividade quando incubada em 5 e 10mM desta substância, esta também inibiu a atividade da enzima produzida por *Kokurea rósea,* sendo a inibição de 14% na concentração de 7,5mM (Gessesse et al. 2002). Forte inibição foi observada com a enzima secretada por *Microbacterium* sp, sendo que a concentração de 5 mM resultou em uma atividade 98% inferior (Thys et al. 2004).

Riffel (2006) demonstrou em seus estudos que a enzima produzida por *Streptomyces* sp apresentou uma inibição de 35% quando incubada em EDTA 10mM, aumento na inibição ocorreu quando esta foi incubada em uma concentração maior (50mM), resultando em uma inibição de 79%, os autores relataram que a queratinase pertence a família das metaloproteases, já que houve inibição por EDTA. O mesmo autor verificou que a enzima produzida por *Chryseobacterium* sp apresentou uma inibição de 57% quando incubada em EDTA (5mM).

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 2mM foi adicionado a enzima.

Suh e Lee (2001) constataram que a enzima secretada por *Bacillus subtilis* quando incubada na presença de EDTA (0,1mM) não foi inibida, e leve inibição foi apresentada na concentração de 1mM (1,7%).

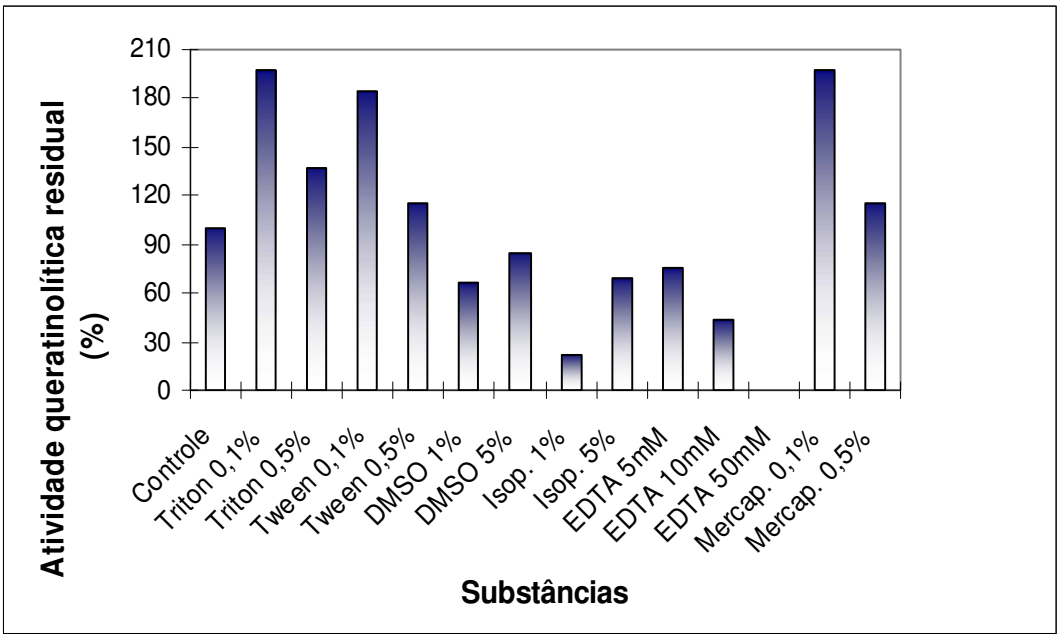


Figura 22: Atividades queratinolíticas residuais em diferentes substâncias

A inibição da enzima 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 a redução da autólise enzimática (ALPRESS et al. 2002).

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

Uma vez estudada as condições de cultivo para produção da enzima em shaker e realizada a caracterização físico química do extrato enzimático, as fermentações passaram a ser realizadas em reator.

No intuito de determinar de forma mais concisa os resultados referentes à atividade queratinolítica, sintetizou-se uma azoqueratina em laboratório, sendo esta testada nos ensaios de atividade queratinolítica nas fermentações realizadas em reator.

Como pode ser observado pelas Figuras 23 e 24, as azoqueratinas diferiram quanto à coloração e a granulometria. A azoqueratina sintetizada em laboratório apresenta a cor alaranjada, e apresenta-se como um pó fino, já que as penas utilizadas para preparo do substrato, foram cortadas em pequenos fragmentos e trituradas em um moinho de bolas.

Já a azoqueratina comercial, apresenta uma coloração azul, sendo que em um mesmo frasco observam-se fragmentos com um tom de azul acentuado, apresentando-se assim de forma não homogênea.

Figura 23: Azoqueratina sintetizada em laboratório

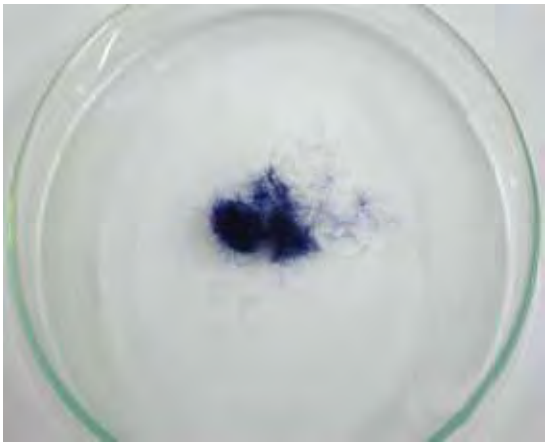


Figura 24: Azoqueratina comercial (Sigma)

Para realização dos cultivos, utilizou-se um reator (Bio T mini – ZETA), este possui volume útil de 4 litros, sendo o volume de meio utilizado no estudo de 2 L. O reator é equipado com sistema de aeração, agitação, temperatura, controle de pH e sistema de oxigênio dissolvido.

As fermentações realizadas em reator foram conduzidas a 40ºC, meio de cultura descrito por Willians et al.,(1990), 2% de inóculo, 1% de penas inteiras, variando-se a agitação e a aeração. As atividades queratinolíticas foram determinadas utilizando-se os dois substratos descritos em literatura (Sigma e

sintetizado em laboratório) para fins de comparação. As Figuras 25 e 26 apresentam as fotos do fermentador utilizado nestes experimentos.

Figura 25: Fermentador (Bio T mini – ZETA): Condições de cultivo: 40ºC, 300 rpm, 180 L/ar/hora, 2% inoculo, 2 L de meio de cultura, 1% penas inteiras, 72 h.

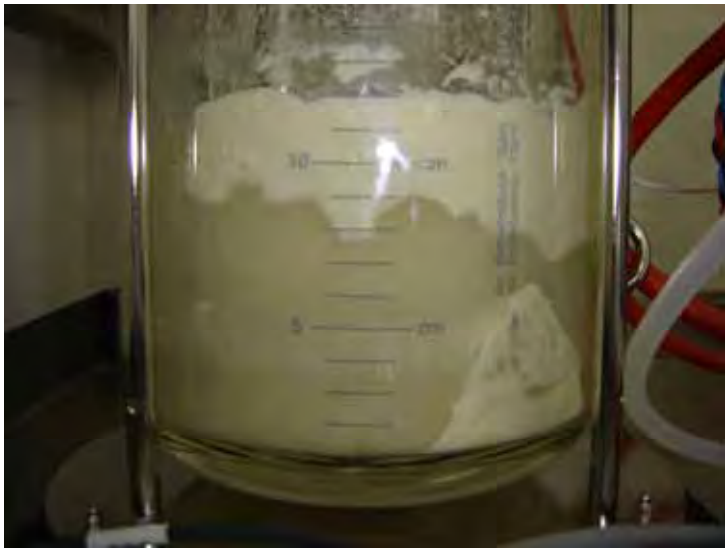


Figura 26: Fermentador (Bio T mini – ZETA): Condições de cultivo: 40ºC, 300 rpm, 180L/ar/hora, 2% inóculo, 2 L de meio de cultura, 1% penas inteiras, 72 h.

Inicialmente realizou-se uma fermentação com agitação de 300 rpm e com uma aeração baixa (60L/h), já que espécies de *Bacillus* geralmente são microaerófilos. Nestas condições a atividade da enzima queratinase apresentou-se baixa. Quando a atividade foi determinada com substrato (Sigma), a atividade queratinolítica foi de 15 U/mL sendo superior àquela determinada com substrato sintetizado em laboratório, (10,8 U/mL).

Quando aumentada à aeração (180L/h) e interrompida a agitação observou-se aumento na atividade queratinolítica, para as determinações realizadas com os dois substratos, sendo de 30,3 U/mL para substrato Sigma e 108,8 U/mL para azoqueratina sintetizada em laboratório. Os resultados de atividade enzimática determinada com os dois substratos pode ser visualizado nas Figuras 27 e 28.

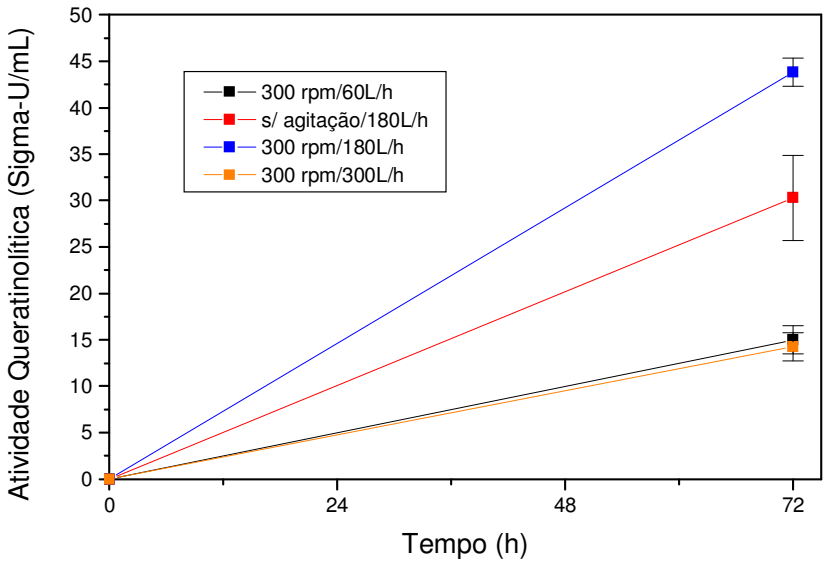


Figura 27: Atividade queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens* determinada com azoqueratina comercial, em diferentes condições de cultivo.

Maior atividade queratinolítica foi obtida quando a fermentação foi realizada com uma agitação de 300 rpm e aeração de 180L/h, quando a atividade foi determinada com substrato sintetizado obteve-se 126,9 U/mL, resultado superior ao obtido com azoqueratina comercial (43,8 U/mL).

Como apresentado nas Figuras 27 e 28, aeração alta não favoreceu a produção da enzima queratinase, nestas condições a atividade foi de 14,25 U/mL quando determinada com substrato Sigma e 12,75 U/mL para substrato sintetizado, estes resultados podem ser explicados pelo fato do microrganismo ser microaerófilo.

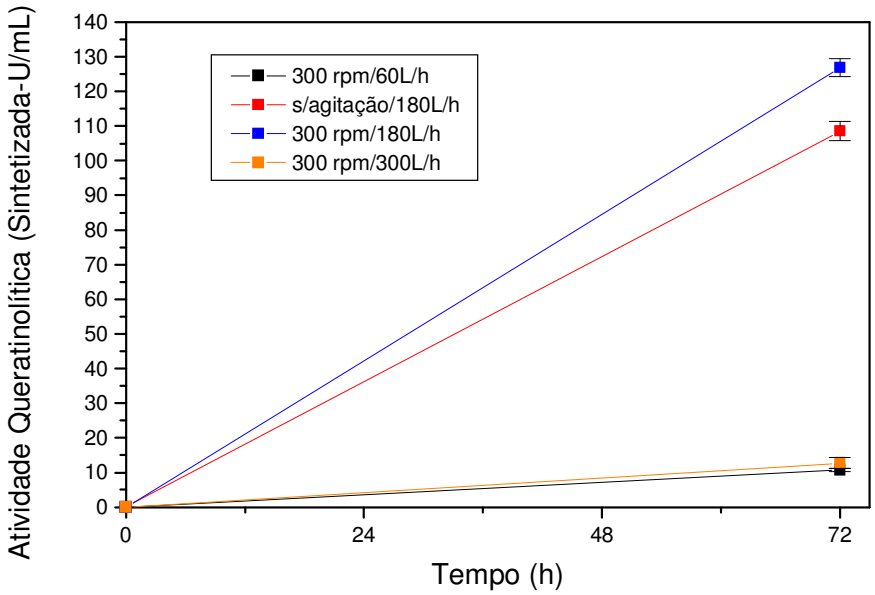


Figura 28: Atividade queratinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens* determinada com azoqueratina sintetizada em laboratório, em diferentes condições de cultivo.

A maior atividade proteolítica foi alcançada quando o microrganismo foi cultivado sem agitação e aeração 180 L/ar/h, evidenciando que o microrganismo necessita de pouca aeração e a suspensão da agitação favorece um ambiente de microaerofilia, além de que a aeração já promove a homogeneização do meio de cultura.

A Figura 29 apresenta as atividades proteolíticas obtidas em função das condições de cultivo, mostrando que a maior atividade proteolítica foi obtida quando o meio não foi agitado e a aeração foi de 180 L/ar/h, obtendo-se assim 217 µg/mL. Quando utilizado a mesma aeração, porém utilizando uma agitação de 300 rpm, observou-se uma diminuição nesta atividade (68,25 µg/mL). Já o aumento da aeração resultou na menor atividade proteolítica observada 18,42 µg/mL.

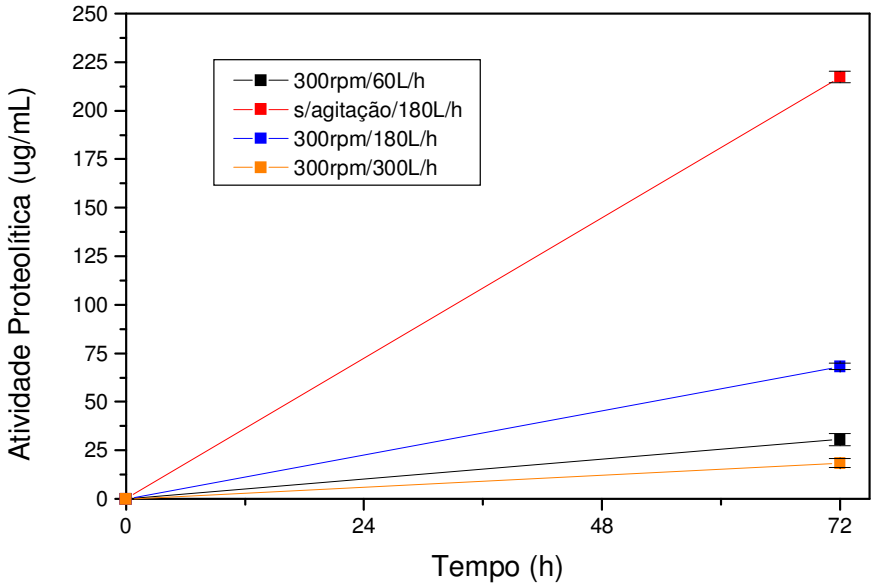


Figura 29: Atividade proteolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*, em diferentes condições de cultivo.

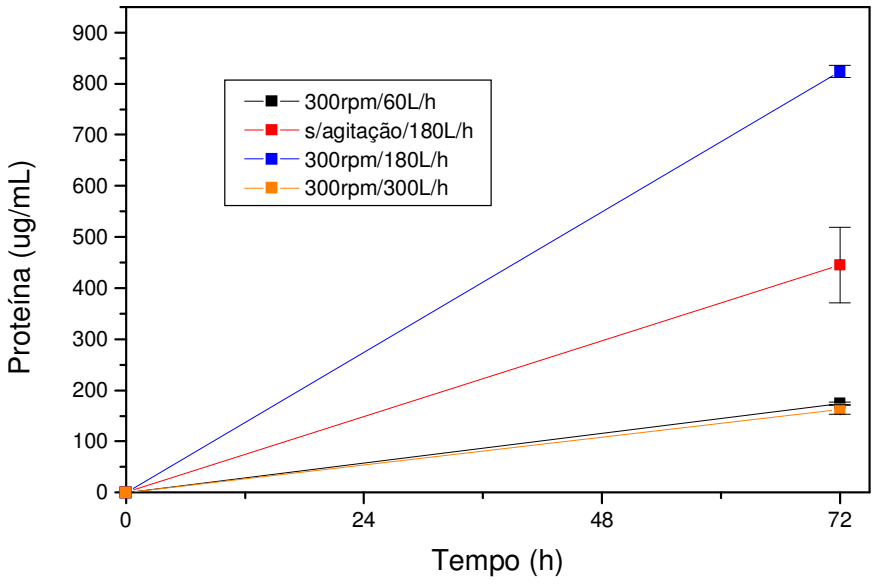


Figura 30: Concentração de proteínas no caldo fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens*, em diferentes condições de cultivo.

Como observado na Figura 30, a concentração de proteínas foi alta quando a fermentação foi conduzida a 300 rpm e aeração de 180 L/h, resultando em 823,8 µg/mL, a segunda maior concentração protéica foi obtida quando a cepa foi cultivada sem agitação e aeração de 180 L/h (445,0 µg/mL). Como já mencionado, maior taxa de aeração pode exercer efeito negatico no processo fermentativo, fato este constatado quando realizado cultivo a 300 rpm e aeração de 300L/ar/h, nestas condições a concentração protéica foi a menor obtida quando comparada às outras condições estudadas em reator (163,0 µg/mL).

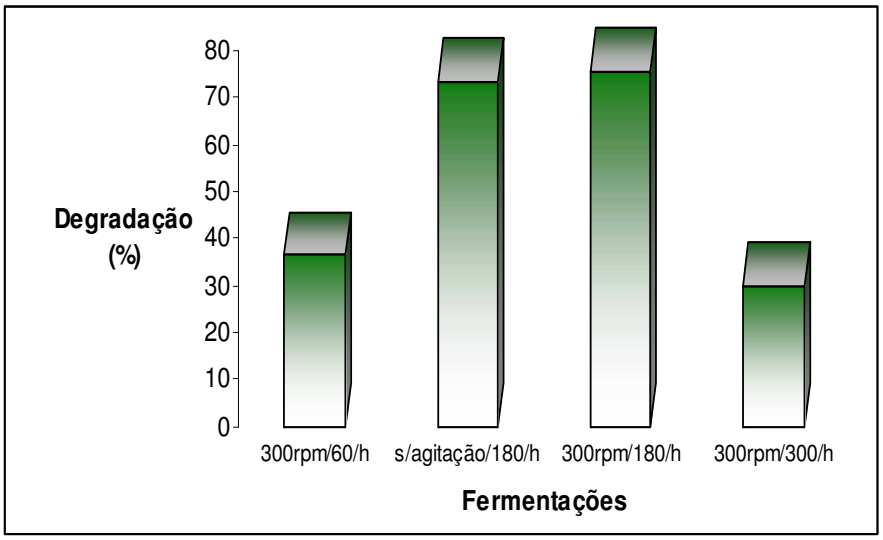


Figura 31: Porcentagem de degradação das penas após 72 h de fermentação em função das condições de cultivo.

Como apresentado na Figura 31, a fermentação realizada com uma agitação de 300 rpm e aeração de 180L/ar/hora, resultou em maior degradação das penas. Após 72 horas de cultivo, a degradação foi de 75,4%. Alta degradação também foi obtida quando a fermentação foi realizada sem agitação e uma taxa de aeração de 180L/h resultando em 73,4%.

Como esperado houve baixa degradação nas fermentações em que as atividades queratinolíticas foram baixas, sendo a menor porcentagem de

degradação obtida quando *Bacillus* foi cultivado a 300 rpm e aeração de 300L/ar/h (29,8%).

São poucos os trabalhos sobre produção de queratinase em reator. Coello et al., (2003) cultivaram a cepa de *Kucurea rósea* em reator para avaliar o potencial deste microrganismo em degradar penas e produzir a enzima queratinase. Os autores trabalharam com um fermentador Bioflow III (New Brunswick Scientific) com capacidade de 5 litros de meio de cultura, sendo que o meio de cultura utilizado foi o proposto por Willians et al. (1990). Este meio de cultura foi suplementado com 20 g/L de penas moídas. A fermentação foi conduzida a 40°C, 1,8 vvm (432L/h), 400 rpm, 10% de inóculo durante 24 h. A atividade enzimática foi determinada utilizando substrato (Sigma). Nas condições descritas acima a atividade foi de 51 U/mg. O microrganismo apresentou também atividades colagenolíticas e elastinolística podendo, portanto, ser incorporada em processos industriais.

Uma cepa de *Streptomyces* sp foi estudada por Letourneau et al. (1997). Os autores trabalharam com um fermentador de 2L (SGI instruments) e com meio de cultura contendo (g/L) NH_4Cl 0,22, $CaCl_2$ 0,22, $MgSO_4.7H_20$ 0,2, K_2HPO4 0,3, KH_2HPO4 0,4, extrato de levedura 0,2. O volume de meio de cultura contendo 1% de penas foi de 1 litro. As condições de ensaio foram: 30°C, 500 rpm e 60 L/h. Os autores determinaram a concentração de proteínas e atividade queratinolítica (substrato Sigma) do caldo de fermentação, esses valores foram expressos em atividade relativa.

Kocurea rosea foi cultivada por 24 h em fermentador New Brunswick com capacidade para 4 litros de meio de cultura sob as condições de 40°C, 400 rpm, 1,8 vvm (432 L/h). O meio de cultura utilizado foi o proposto por Willians et al. (1990). Quando o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram verificados (glicose, farinha de trigo e farinha de soja) observou-se que houve diminuição na atividade da enzima queratinase, alcançando respectivamente 0,9, 10,6 e 13,1 U/mL. Quando o meio não foi suplementado a atividade foi de 17 U/mL (BERNAL et al. 2003).

A produção da enzima queratinase por *Bacillus licheniformes* foi realizada em fermentador Bioflow com capacidade para 10 litros de meio, nos estudos efetivados

por Wang e Shih (1999). O meio de cultura foi composto de (g/L) NaCl 0,5, KH_2HPO4 0,7, K_2HPO4 1,4, $MgSO_4.7H_2O$ 0,1 com adição de 0,5% (p/v) de penas. Os autores estudaram algumas condições de cultivo, sendo que a agitação foi mantida em 300 rpm e aeração de 3 L/ar/minuto. A maior atividade foi obtida quando a fermentação ocorreu a 37°C e sem controle de pH (450 U/mL em 35 h de cultivo). Alta atividade foi reportada quando a fermentação foi realizada sem controle de pH a 50°C nas primeiras 8 h e depois 37°C até o final desta, alcançando assim uma atividade de 440 U/mL com 25 h. Menor atividade foi obtida quando a fermentação foi conduzida a 50°C e sem controle de pH (250 U/mL) com 12 h de cultivo.

Capitulo 7.3 : Purificação da enzima queratinase

Verificação da eficiência de agentes precipitantes na precipitação de proteínas do caldo fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens* (Determinação da atividade enzimática utilizando azoqueratina sintetizada).

Os métodos de separação de proteínas baseiam-se em propriedades tais como: solubilidade, tamanho, carga elétrica e afinidade por determinados compostos.

O método de purificação a ser escolhido depende do tipo de proteína que se pretende purificar e geralmente são utilizadas combinações seqüenciais de diferentes métodos.

Frequentemente, o primeiro passo empregado para a separação de proteínas de extratos brutos é a precipitação por adição de sais (sulfato de amônio) ou solventes orgânicos miscíveis em água. A separação neste caso, baseia-se em diferenças de solubilidade apresentadas pelas proteínas (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Algumas proteínas se apresentam insolúveis em soluções com baixa concentração salina, enquanto outras apresentam-se insolúveis em altas concentrações salinas. Esta característica constitui o princípio da precipitação de proteínas como método de separação: a adição de sais, em pequenas e em grandes

quantidades causa a precipitação de algumas proteínas e não de outras: a solubilidade de algumas proteínas diminui conforme diminui a concentração salina; o contrário também ocorre (SCOPES 1993). No caso de se optar por realizar a precipitação de proteínas com sulfato de amônio, torna-se necessário realizar a diálise para remoção do sal contido na amostra.

É importante salientar que a purificação de proteínas deve ser monitorada ao longo de diferentes etapas de separação e, para isso, é necessário dispor de um método que permita detectar e quantificar unicamente a proteína de interesse.

Geralmente nesta primeira etapa de purificação de proteínas é utilizado sulfato de amônio como agente precipitante, isto pelo fato de ser mais barato, mesmo em elevado grau de pureza e por não apresentar significante variação de solubilidade em um grande intervalo de temperatura (0 a 30°C).

Na maior parte dos estudos sobre purificação da enzima queratinase, os autores utilizaram o sal sulfato de amônio para precipitar e concentrar a proteína de interesse, dentre eles pode-se citar: Cheng et al. (1995), Farag e Hassan (2003), Gessesse et al. (2002), Anbu et al. (2004).

Neste trabalho, inicialmente, estudou-se a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, os resultados estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. Pode-se observar que houve baixa precipitação protéica quando esta foi realizada utilizando-se 95% do sal, sendo que a maior precipitação foi alcançada com a adição de 50% do sal, obtendo-se 39,9 mg/mL de proteínas.

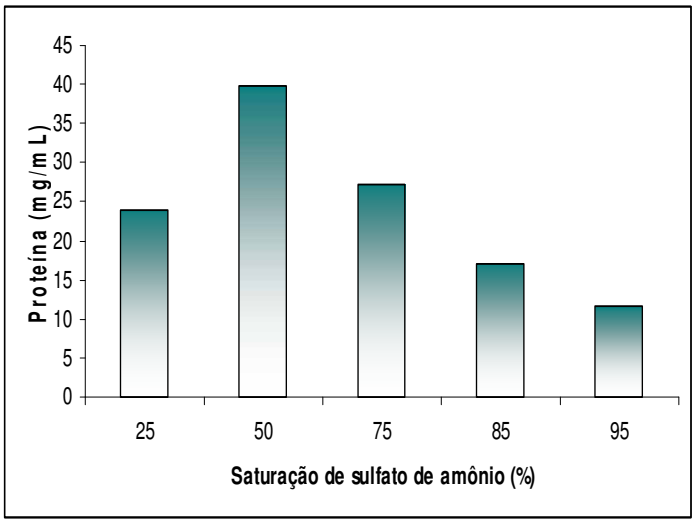


Figura 1: Concentração de proteínas no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com sulfato de amônio.

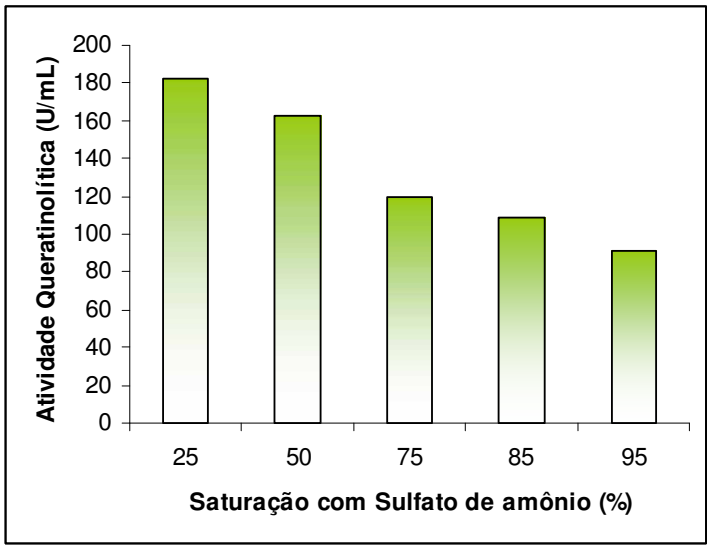


Figura 2: Atividade Queratinolítica do filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com sulfato de amônio.

Como pode ser observado, com o aumento da concentração de sal ocorreu diminuição da atividade queratinolítica, sendo a maior atividade obtida quando adicionado 25% do sal ao extrato bruto livre de células, obtendo assim uma

atividade de 182,3 U/mL. Quanto à atividade proteolítica, esta foi maior quando adicionado 50% do sal, sendo a atividade de 197,9 µg/mL.

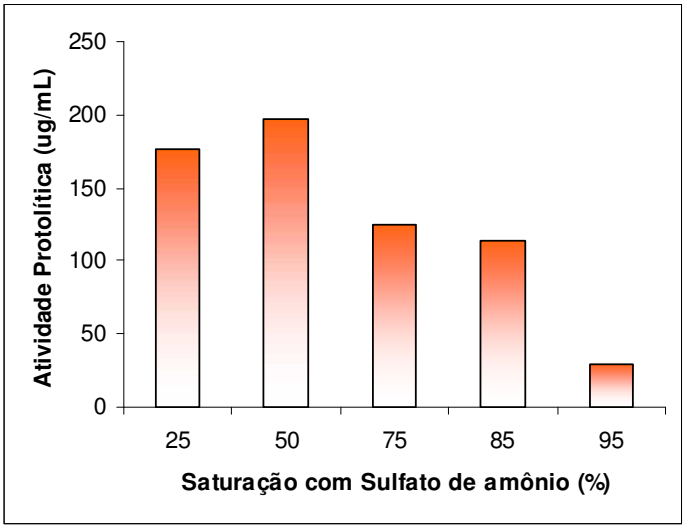


Figura 3: Atividade Proteolítica do filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com sulfato de amônio.

Nos estudos realizados utilizando acetona como agente precipitante, os resultados foram mais eficientes, já que a concentração de proteínas foi maior aos obtidos nos estudos em que foi utilizado sulfato de amônio e etanol. Quando adicionado 300% de acetona a concentração de proteínas foi de 46,2 mg/mL. Resultado semelhante foi obtido para a atividade queratinolítica e proteolítica, sendo maiores também nesta faixa de concentração de acetona. Utilizando acetona na proporção de 3:1 a atividade queratinolítica foi de 180,3 U/mL.

Quando utilizado etanol, maior concentração de proteínas foi alcançada quando utilizado 95% de etanol, obtendo assim uma concentração de proteínas de 24,4 mg/mL. A atividade queratinolítica também foi maior com a adição de etanol em 95%, sendo a atividade queratinolítica de 128,3 U/mL e proteolítica de 48,7 µg/L, porém o rendimento foi baixo (27,6%).

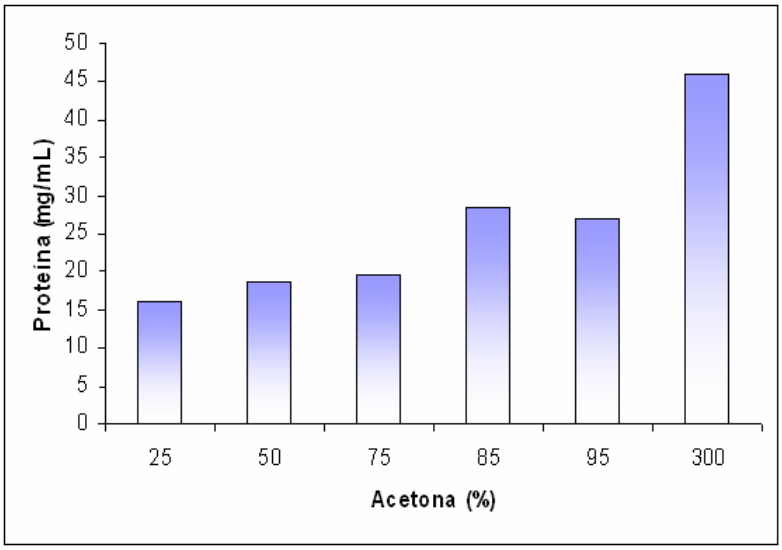


Figura 4: Concentração de proteínas no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com acetona.

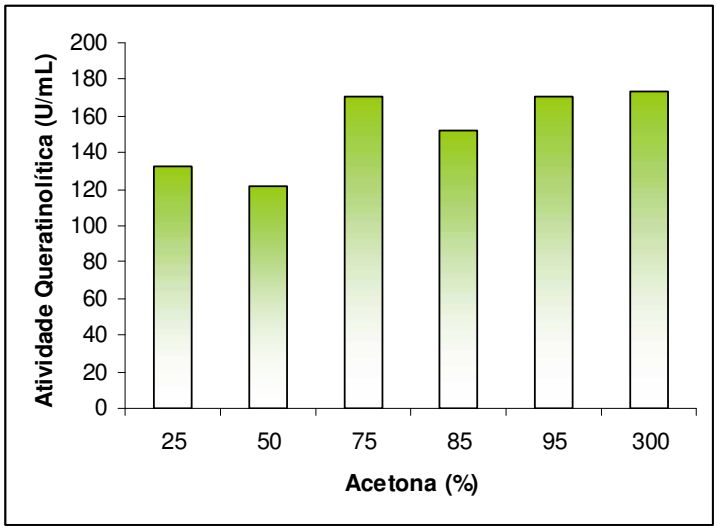


Figura 5: Atividade Queratinolítica no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens*, precipitado com acetona.

Kumar et al. (1998) também utilizaram nas etapas iniciais de purificação, acetona como agente precipitante. Os autores trabalharam com a protease produzida por *Bacillus* spp, sendo que 10 litros de extrato bruto (sobrenadante) foi precipitado com acetona (250%). Após precipitação e centrifugação, as proteínas

obtidas passaram pelo processo de liofilização para serem utilizadas nas etapas cromatográficas seguintes.

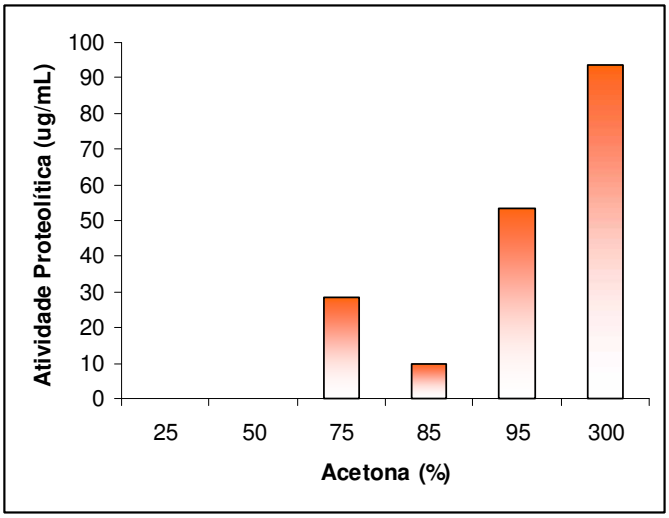


Figura 6: Atividade Proteolítica no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com acetona.

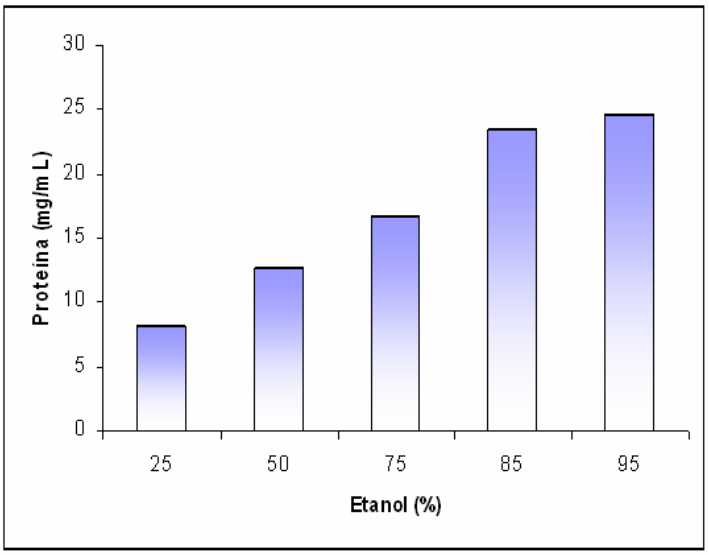


Figura 7: Concentração de proteínas no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com etanol.

Assim como neste trabalho, Farag e Hassan (2004) avaliaram a eficiência do sulfato de amônio, acetona e etanol na precipitação das proteínas produzidas por *Aspergillus oryzae.* Os autores utilizaram 100 mL de caldo enzimático livre de

células, sendo que várias faixas de concentração do sal foram utilizadas (25, 35, 50, 65, 75, 85 e 95%). As concentrações de etanol e acetona foram às mesmas citadas acima. Os autores constataram que a faixa de saturação com sulfato de amônio na qual ocorreu maior precipitação protéica foi 85%, sendo a concentração de proteínas de 7,38 mg/mL, maior atividade queratinolítica também foi alcançada nesta faixa de saturação (88,07 U/mL).

Quando os mesmos autores analisaram a eficiência da acetona neste processo inicial de purificação, observaram que este solvente foi menos efetivo, sendo que na concentração de 75% o resultado obtido foi de 5,95 mg/mL de proteínas. A atividade da enzima queratinase também foi menor, sendo de 48,48 U/mL quando utilizado 65% de acetona.

Quando utilizado etanol, os autores observaram resultados significativos em relação à concentração de proteínas, sendo que a faixa de 75% resultou em 6,7 mg/mL, já a atividade da enzima queratinase foi similar a obtida quando utilizado acetona, resultando em uma atividade de 47,75 U/mg, quando concentrada com 65% de etanol.

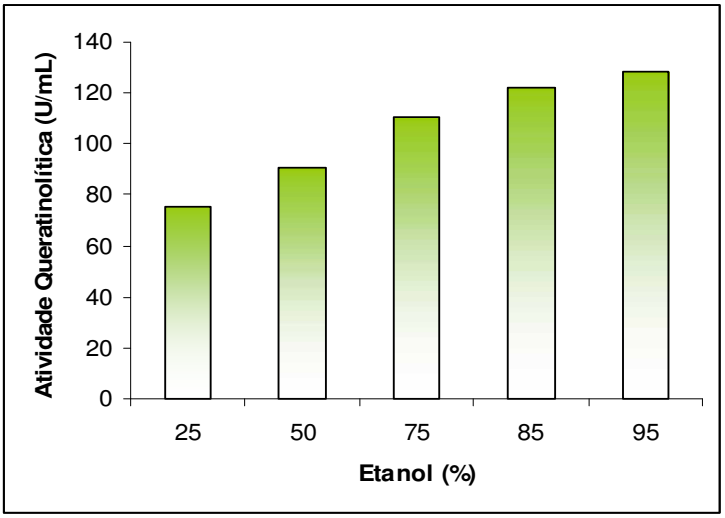


Figura 8: Atividade Queratinolítica no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com etanol.

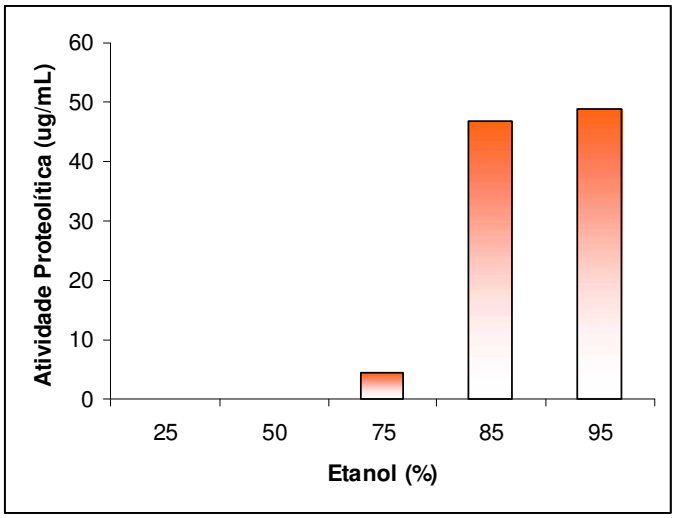


Figura 9: Atividade Proteolítica no filtrado de cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* precipitado com etanol.

Pelo fato da maior concentração de proteínas ter sido obtida no extrato bruto precipitado com acetona, quando comparado ao etanol e sulfato de amônio, este solvente foi utilizado nas etapas de cromatografia.

Técnicas Cromatográficas

1) Troca Iônica (DEAE Sephadex A 50) e filtração em gel (Sephadex G 75).

Como citado anteriormente, após centrifugação e precipitação do caldo bruto (acetona 3:1), a solução enzimática (30 mL) foi aplicada em uma coluna de DEAE sephadex A 50 (1,5 x 16 cm), equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM pH 8.5. A coluna foi eluída com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3 mL em um fluxo de 60 mL/h. As amostras foram submetidas a leitura de absorbância a 280 nm. As frações que apresentaram alta absorbância foram reagrupadas e destas frações determinou-se a atividade queratinolítica e concentração de proteínas.

Como mostra a Figura 10, pode-se observar 2 picos de proteína, que ocorreram entre as frações 10 a 43 e 44 a 117.

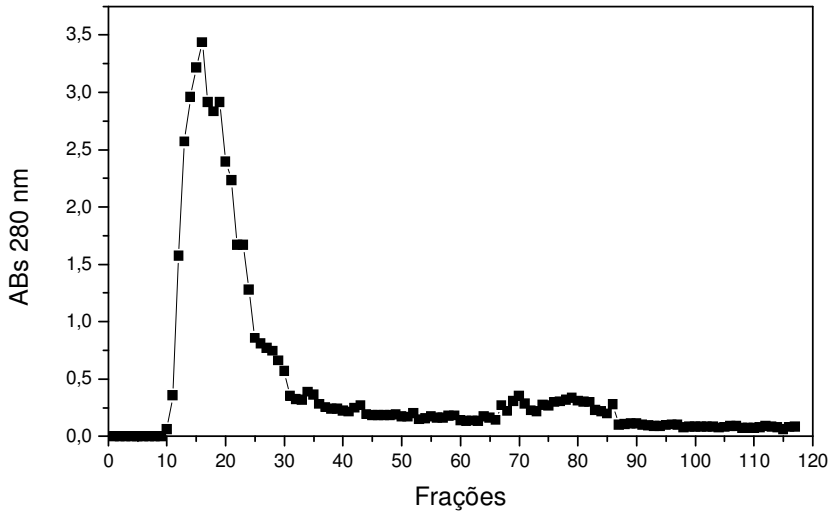


Figura 10: Perfil de eluição em cromatografia de troca iônica das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Foram reunidas as frações 10 a 43 que apresentaram alta absorbância e as frações 44 a 117. Quando determinada atividade enzimática destas frações constatou-se que a primeira fração apresentou uma atividade de 20,25 U/mL e a segunda 2,4 U/mL. As duas frações foram submetidas a uma eletroforese como mostra a Figura abaixo (Figura 11).

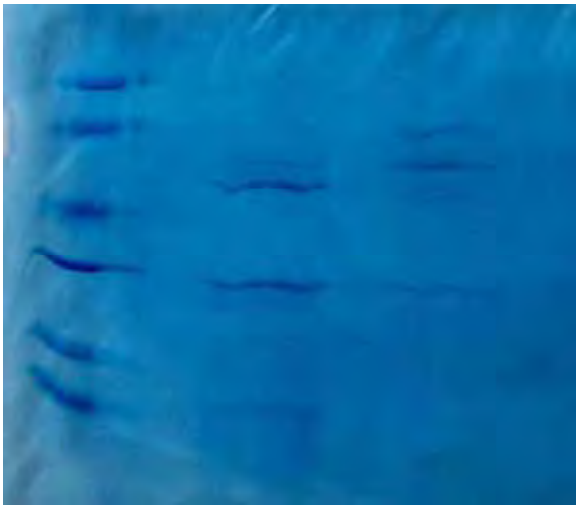


Figura 11: Perfil eletroforético em SDS PAGE gradiente de 10 a 20 % de acrilamida -. Linha 1: Padrões de proteínas (de cima para baixo): fosforilase, albumina de soro bovino, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina, α lactalbumina. Linha 2: Fração1, Linha 3: Fração2, ambas as frações eluídas da coluna DEAE Sephadex A 50.

Posteriormente a coluna foi eluída com tampão Tris HCl 50 mM contendo um gradiente salino (0 – 0,5 M), sendo que as frações de proteínas adsorvidas a resina e recuperadas foram analisadas. Como mostra a Figura 12, observa-se um pico de proteínas, que quando analisado apresentou baixa atividade queratinolítica (0,9 U/mL).

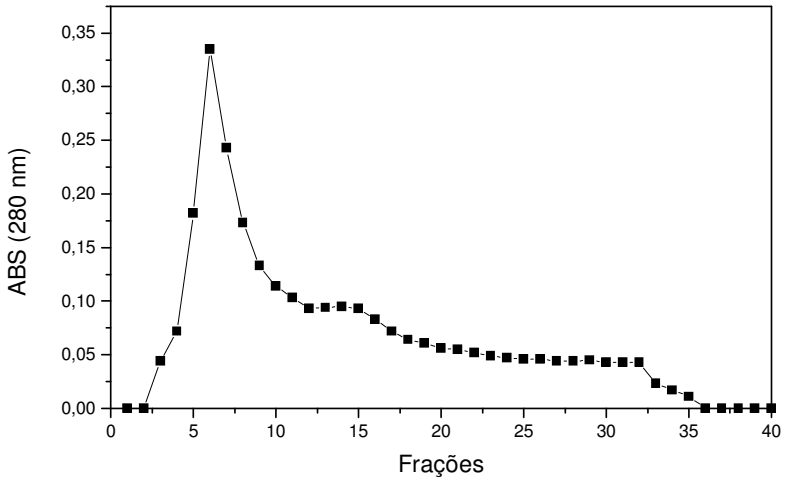


Figura 12: Perfil de eluição com NaCl 0 -0,5 M em cromatografia de troca iônica das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens .*

Diante deste resultado, a fração que apresentou maior atividade enzimática (fração 10 a 43) foi liofilizada, ressuspendida em 3 mL de tampão Tris HCl 8.5 e aplicada em uma coluna Sephadex G 75 (100 x 1,6). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de amônio 50 mM pH 6.9. O fluxo foi mantido em 20 mL/h e frações de 3 mL foram coletadas. Vale ressaltar que todo o processo foi realizado a 10°C.

A Figura 13 apresenta o perfil de eluição das proteínas, observando-se 5 picos. Estas frações foram reagrupadas e determinou-se atividade queratinolítica e concentração de proteínas. Quanto a atividade enzimática, as frações apresentaram atividade enzimática de 0,11, 3,75, 0,20, 18,0 e 0,9 U/mL respectivamente.

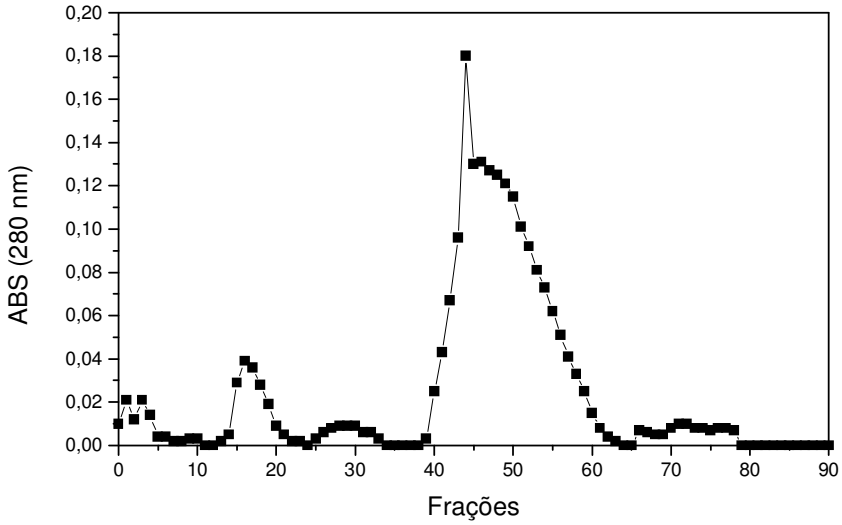


Figura 13: Perfil de eluição em cromatografia de filtração em gel das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Como observado pela Figura 13, a fração F4 apresentou uma atividade queratinolítica de 18,0 U/mL, sendo esta foi submetida a uma eletroforese, que pode ser visualizada na Figura 14.

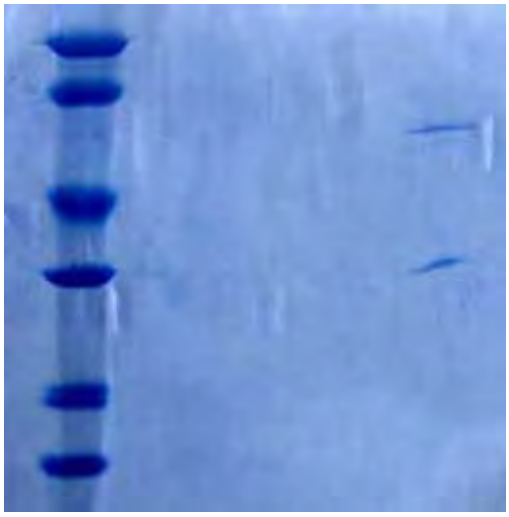


Figura 14: Perfil eletroforético em SDS PAGE gradiente de 10 a 20 % de acrilamida -. Linha 1: Padrões de proteínas (de cima para baixo): fosforilase, albumina de soro bovino, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina, α lactalbumina. Linha 2: Fração 4 eluída da coluna Sephadex G 75.

Como observado, o perfil eletroforético apresentou duas bandas, supondo que a amostra foi parcialmente purificada. Após determinação das distâncias de migração dos padrões, da amostra e do tampão de corrida, foi feita uma reta do logaritmo da massa molar versus a mobilidade relativa encontrada (Rf). A equação da reta foi utilizada para calcular a massa molar das proteínas. Os valores obtidos foram 53,6 e 41,8 KDa.

A Tabela 1 apresenta as etapas de purificação realizadas, e os resultados obtidos, observando-se que a solução enzimática resultante da coluna sephadex G 75 apresentou uma atividade de 1080 U e uma concentração de proteínas de 0,516 mg, obtendo assim uma atividade específica de 2093 U/mg, com um fator de purificação de 2,66 vezes com um rendimento de 2,56 %.

Tabela 1: Etapas para purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Etapas	**Atividade Enzimática (U)**	**Proteína (mg)**	**Atividade Específica (U/mg)**	**Fator de Purificação**	**Rendimento (%)**
Caldo Bruto	42150	53,55	787,1	1	100
Precipitação com Acetona	3870	5,376	719,8	0,91	9,18
Sephadex A 50	2004,75	3,35	598,43	0,76	4,76
Sephadex G 75	1080	0,516	2093	2,66	2,56

U= Uma unidade de atividade queratinolítica corresponde à quantidade da enzima que causa um aumento na absorbância de 0,01 nessas condições.

2) Troca Iônica DEAE Sepharose Fast Flow e Filtração em Gel Sephadex G 75.

A coluna utilizada na cromatografia de troca iônica (1,5 x 14,5 cm) foi empacotada com a resina DEAE sepharose fast flow. Esta foi equilibrada com tampão Tris HCl 20 mM pH 8.0, sendo que 30 mL do caldo enzimático livre de células e precipitado com acetona (3:1) foi aplicado na coluna.

A coluna foi eluída a um fluxo de 60 mL/h com o mesmo tampão utilizado para equilibrá-la, frações de 3 mL foram coletadas.

A Figura abaixo apresenta o perfil de eluição das proteínas de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo possível detectar 2 picos de proteínas (Figura 15). Para análise de atividade enzimática e concentração de proteínas, reuniu-se as frações de 10 a 20 (F1) e 21 a 38 (F2).

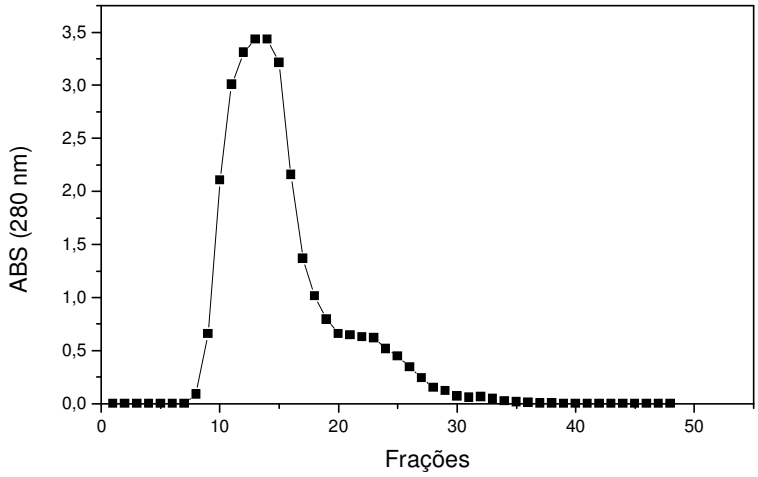


Figura 15: Perfil de eluição em cromatografia de troca Iônica das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Ambas as frações apresentaram a mesma atividade queratinolítica (121,5 U/mL), porém a fração F1 apresentou maior concentração protéica (94 µg/mL), sendo que na segunda fração a concentração foi de 38,2 µg/mL.

Quando aplicado um gradiente salino (0- 0,5 M), observou-se vários picos (Figura 16), sendo que as frações de 17 a 40 apresentaram uma atividade de 127,5 U/mL e uma concentração protéica de 158,6 µg/mL, nas outras frações não foi detectado atividade da enzima queratinase.

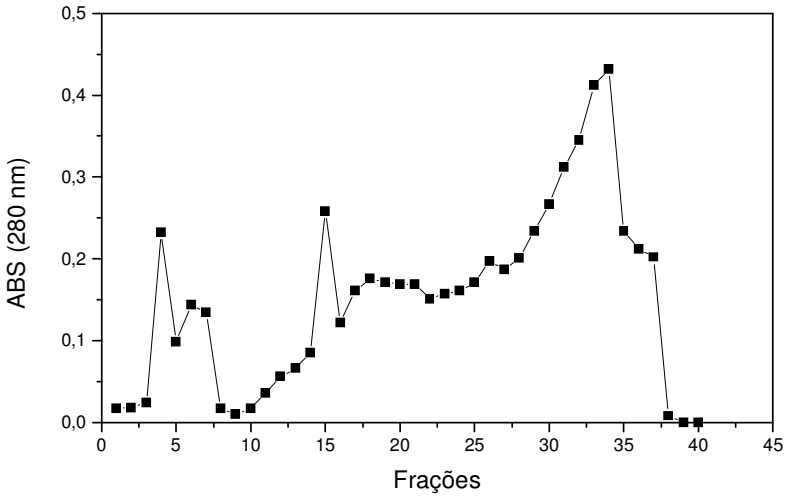


Figura 16: Perfil de eluição com NaCl 0-0,5 M em cromatografia de troca Iônica das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.*

A fim de analisar a fração com maior atividade enzimática, esta fração foi dialisada, liofilisada e aplicada em um gel de eletroforese, observando-se a presença de duas bandas, com massas molares de 65,9 e 41,8 KDa.

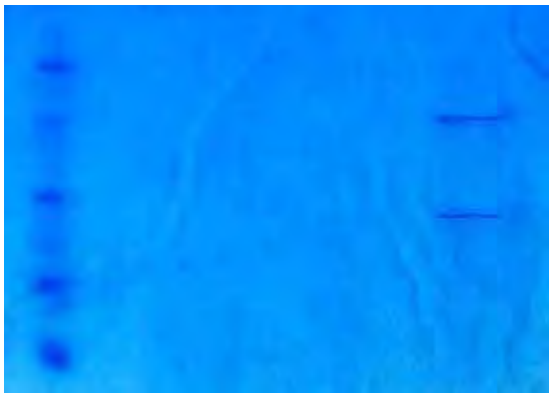


Figura 17: Perfil eletroforético em SDS PAGE gradiente de 10 a 20 % de acrilamida -. Linha 1: Padrões de proteínas (de cima para baixo): fosforilase, albumina de soro bovino, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina, α lactalbumina. Linha 2: Fração 3 eluída com gradiente salino da coluna DEAE Sephadex Fast flow.

Diante deste resultado, esta fração foi liofilizada, ressuspendida em 3mL de tampão Tris HCl 20 mM pH 8.0 e aplicada em uma coluna de filtração em gel (1,5 x 100 cm) empacotada com a resina sephadex G 75. A coluna foi eluída com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna.

A Figura 18 apresenta o perfil cromatográfico das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.* Para análise, reuniu-se as frações de 4 a 29 e 30 a 37. Constatou-se que ambas as frações não apresentaram atividade queratinolítica, porém apresentaram uma concentração protéica de 0,3 e 0,9 µg/mL respectivamente.

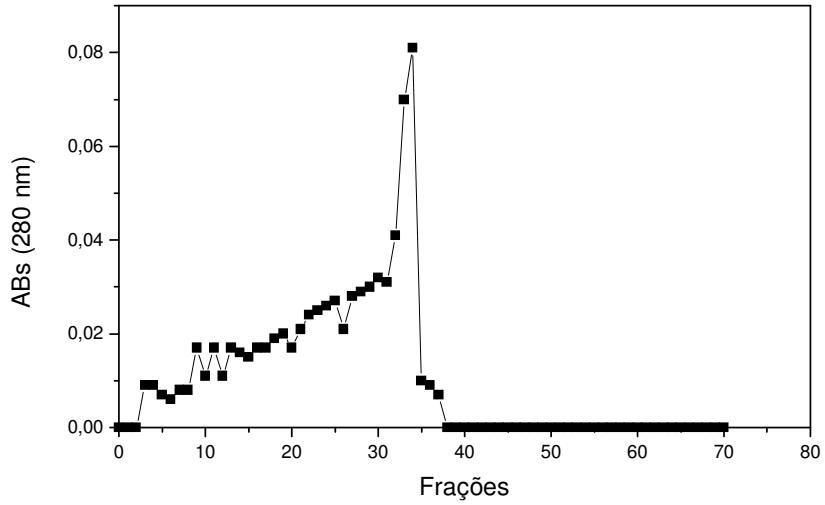


Figura 18: Perfil de eluição em cromatografia de filtração em gel das proteínas produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens.*

O caldo enzimático resultante da cromatografia de troca iônica contendo duas bandas protéicas apresentou uma atividade específica de 803,4 U/mg, com um fator de purificação de 6,7 vezes e rendimento final de 12,4%, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Etapas para purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens.*

Etapas	Atividade Enzimática (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação	Rendimento (%)
Caldo Bruto	71250	593,5	120	1	100
Precipitação com acetona	7065	30,5	231,6	1,93	9,9
Troca Iônica	8797,5	10,95	803,4	6,7	12,4
Filtração em gel	**Sem atividade**				

Quando esta amostra foi caracterizada observou-se que houve inibição quando incubada com EDTA 10 mM, sendo totalmente inativada na presença de EDTA na concentração de 50 mM, porém manteve sua atividade total quando incubada em PMSF 1 mM. Diante desse resultado pode-se inferir que a queratinase parcialmente purificada neste trabalho pertença as metaloproteases. Os resultados podem ser visualizados na Tabela abaixo.

Tabela 3: Influência de inibidores na atividade enzimática.

Substância	Concentração	Atividade residual (100%)
Controle	0	100
EDTA	10 mM	52,7
EDTA	50 mM	0
PMSF	1 mM	100

Quanto à influência do pH e da temperatura na atividade queratinolítica (Figuras 19 e 20) pode-se observar que temperaturas abaixo de 50 ºC resultaram nas menores atividades enzimáticas, sendo que a temperatura de 50 ºC resultou na maior atividade observada. Quando determinada a 60ºC, houve uma perda de 28,6 % de atividade.

Valores baixos de pH também resultaram em baixa atividade enzimática, a menor atividade foi obtida em pH 4.0, e a maior em pH 8.5.

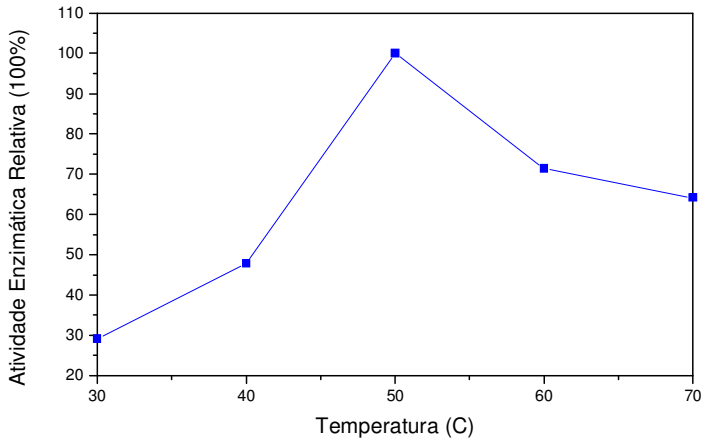


Figura 19: Atividade enzimática determinada em diferentes temperaturas.

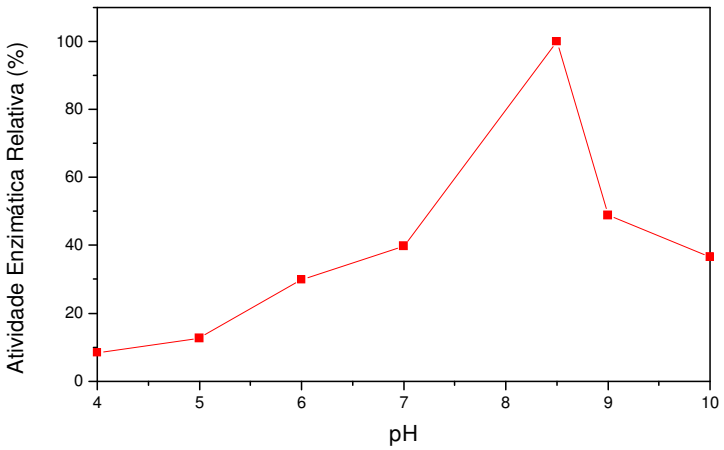


Figura 20: Atividade enzimática determinada em diferentes pHs.

Como pode ser observado, em ambos os processos cromatográficos estudados e discutidos anteriormente, houve a presença de uma banda com massa molar de 41,8 KDa, podendo esta se tratar da enzima queratinase, já que na literatura há relatos de queratinases com massa molares próximas ao valor encontrado.

Kumar et al. (2008) purificaram a enzima queratinase produzida por *Bacillus pumilis* utilizando apenas um processo cromatográfico. O caldo enzimático foi precipitado com sulfato de amônio, e dissolvido em tampão Tris HCl 25 mM pH 7.8. O caldo enzimático obtido foi aplicado em uma coluna de troca iônica empacotada com a resina DEAE sepharose fast flow equilibrada e eluída com tampão Tris HCl 20 mM pH 8.0. A enzima purificada apresentou uma massa molar de 65 KDa.

Nos estudos realizados por Thys et al. (2004) a enzima produzida por uma espécie e *Microbacterium* foi parcialmente purificada. Para isso, o caldo enzimático foi aplicado em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina sephadex G 100 sendo eluída com tampão PBS. Após análise, a enzima parcialmente purificada apresentou máxima atividade em pH 7.0, 55 °C, sendo inibida por EDTA e mercaptoetanol. Diante desses resultados os autores relataram que a enzima possivelmente deve pertencer à classe das metaloproteases.

Uma queratinase com massa molar de 80 KDa foi produzida por *Bacillus cereus* DCUW nos estudos realizados por Ghosh et al. (2008). Para realização da purificação, os autores utilizaram três processos cromatográficos. Primeiramente aplicaram a amostra em uma coluna de sephadex equilibrada com tampão HCl 100 mM pH 7.5. A coluna foi então eluída com um gradiente salino sendo que a fração com atividade queratinolítica foi dialisada e concentrada. Esta amostra foi aplicada em uma coluna de cromatografia de afinidade e finalmente aplicada em uma coluna de filtração em gel (Sephacril S 300). Após estes três processos, a atividade específica alcançada foi de 34,5 U/mg, com um rendimento de 50 %.

Kumar et al. (1998) purificaram a enzima produzida por *Bacillus* sp. O caldo enzimático foi eluído em uma coluna de DEAE sepharose CL-6B equilibrada com tampão Tris HCl 0,02 M pH 7.8 contendo 5 mM de $CaCl_2$. As frações que apresentaram atividade da enzima queratinase foi dialisada e concentrada e então aplicada em uma coluna empacotada com CM sepharose CL-6B equilibrada com

tampão Tris acetato 0,02 M pH 7.2. A Coluna foi eluída com um gradiente salino. Ao final desse processo duas proteases foram detectadas AP1 e AP2 com massas molares de 28 e 29 KDa respectivemante.

Massa molar próxima à relatada neste relatório foi apresentada nos estudos realizados por Cheng et al. (1995). Os autores purificaram uma queratinase com massa molar de 31,4 KDa. A enzima mostrou-se estável em pH de 5 a 12 e temperatura na faixa de 50 a 55 °C.

Nos estudos realizados Gessesse et al. (2002), duas enzimas foram purificadas e caracterizadas. As enzimas produzidas por *Bacillus* (AL-89) e *Nesternkonia* (AL-20) foram inicialmente precipitadas com sulfato de amônia e após esta etapa, purificadas utilizando técnicas de troca iônica e gel de filtração. A massa molar determinada por SDS-PAGE foi de 23 KDa para AL-20 e 24 KDa para AL-89. A protease AL-20 foi ativa em pH 7.5 a 11.5, com pico de atividade em pH 10.0 a 70°C.

Na literatura há relatos de queratinases com massas molares de 18 a 200 KDa. A menor massa molar foi encontrada para a queratinase produzida por *S. albidoflavus* SK 1-02 (18 KDa) como descrito por Chitte et al., (1999).

Nam et al. (2002) e Bernal et al. (2003) estudaram queratinases com massas molares de 200 KDa. Entretanto a maior massa molar relatada para a enzima queratinase foi a produzida por um fungo patógeno, esta apresentou uma massa molar de 440 KDa conforme descrito por Kim et al. (2004).

8. Conclusão

Dos microrganismos isolados, o que apresentou maior degradação das penas e consequentemente maior atividade queratinolítica foi LM16, identificado como sendo *Bacillus amyloliquefaciens.*

Pela análise de microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar forte aderência do microrganismo às penas após 24 horas de cultivo, sendo que foi possível observar a degradação das mesmas.

Quando estudados as condições ótimas de cultivo em shaker para a cepa, observou-se que essas condições foram: 40°C, 150 rpm, 3% de penas, 2% de inóculo, pH inicial 7,5 e meio de cultura descrito por Willians et. al. (1990).

Analisando a presença de aminoácidos no caldo de cultura, verificou-se a presença de cistéina, além de prolina e serina. O aminoácido metionina foi mais fortemente evidenciado nas amostras cultivadas a pH 8.0, este aminoácido presente no caldo de cultura é um aminoácido raramente encontrado na queratina de penas e, dessa forma, provavelmente foi produzido como metabólito pela bactéria.

Nas fermentações realizadas em reator, observou-se que a maior atividade queratinolítica foi obtida quando as condições utilizadas foram: 300 rpm e 180 L/ar/h (43,8 U/mL).

Nos estudos realizados utilizando-se acetona como agente precipitante, os resultados foram mais eficientes, já que a concentração de proteínas foi maior que os obtidos nos estudos realizados com sal e etanol. Quando adicionado 300% de acetona a concentração de proteínas foi de 46,2 mg/mL.

O caldo enzimático aplicado em uma coluna de troca iônica empacotada com a resina DEAE sephadex A 50 e posteriormente aplicado em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina DEAE sephadex G 75 apresentou duas bandas com massas molares de 65,9 e 41,8 KDa. Ao final destes dois processos cromatográficos, a atividade específica foi de 2093 U/mg, com um fator de purificação de 2,66 vezes, sendo o rendimento de 2,56.

Resultado relevante também foi obtido quando a solução enzimática foi aplicada em uma coluna de troca iônica empacotada com a resina DEAE sepharose

fast flow, sendo que a amostra eluída com gradiente salino que apresentou maior atividade queratinolítica foi submetida a uma eletroforese, que após análise apresentou duas bandas, uma de 53,6 KDa e outra com 41,8 KDa. Quando estas amostra foram aplicadas em uma coluna de filtração em gel, não foi detectada atividade da enzima em nenhum dos picos analisados.

Como pode ser observado, em ambos os processos estudados houve a presença de uma banda com massa molar de 41,8 KDa, podendo se tratar da enzima queratinase, já que na literatura há relatos de queratinases com massa molares próximas ao valor encontrado.

Quando a enzima parcialmente purificada foi caracterizada, observou-se que esta foi inibida quando incubada em EDTA 50 mM, mantendo sua atividade inicial quando incubada em PMSF. Diante desse resultado pode-se inferir que esta pertença as metaloproteases.

9. Referências Bibliográficas

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

ANBU, P., GOPINATH, S.C.B., HILDA, A., LAKSHMIPRIYA, T., ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate Scopulariopsis brevicaulis. **Bioresource Technology**. 2006.

BARRET, A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 17, p. 136-139, 1995.

BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 255-261, 2003.

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

BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1° Ed. São Paulo: Editora Legis Summa, Ltda, 2004, v. 1, cap.16, p. 291-306.

BRADBURY JH. The structure and chemistry of keratin fibers. **Adv Prot Chem**, v. 67, 111-211, 1973.

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

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETT, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C. Purification and characterization of a 43.5 KDa Keratinolytic metalloprotease from Microsporum canis. **Medical Micology**, Norwalk, v. 39, n. 3, p. 269-275, 2001.

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

BUSSON, B.; ENGSTRON, P.; DOUCET, J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 6, p. 1021-103, 1999.

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.

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

ELMAYERGI, H.H., SMITH, R.E. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* in pepsin-HCI digestibility and methionine content of feather meal. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, p. 1067-1072. 1971.

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

FARAG, A.M.; HASSAN, M. A. Purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillus oryzae* . **Enzyme and Microbiol Technology.** v. 34, p. 85-93, 2004.

GARRET, S.; GRISHAN C. M. Protein Folding and Tertiary Structure. In: **Biochemistry.** London: Saunders College Publ., 1995. Chap. 5, p. 159-168.

GHOSH, A., CHAKRABARTI, K., CHATTOPADHYAY, D. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cerus* DCUW. **Journal Industrial Biotecnhology** v, 35, p. 825-834, 2008.

GESSESSE, A., HATTI-KAUL, R., GASHE, B.A., MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 519-524, 2003.

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

HADAS, A.; KAUTSKY, L. Feathers meal, a semi-slow-realease nitrogen fertilizer for organic farming. **Fertil Research**. v. 38, p. 165-170, 1994.

IGNATOVA, Z.; GOUSTEROVA, A.; SPASSOV, G.; NEDKOV, P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from wool degrading thermophilic actinomyces strain *Thermoactinomyces candidus*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 217-222. 1999.

JULIO ALBERTO RODIGHERI. Informações sobre desempenho da carne de frango em 2007 e perspectivas para 2008. Disponível em: < http://www.cepa.epagro.sc.com.br> Acesso em 10 de Outubro de 2008.

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

KILIKIAN, B. V.; PESSOA, Jr. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Barueri, São Paulo, Manole, 2005.

KUMAR, C.G., TIWARI, M.P., JANY, K.D. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic Bacillus spp.: purification and some properties. **Process Biochemistry**. v. 34, p. 441-449, 1998.

KUMAR, A. G.; SWARNALATHA, S.; GAYATHRI, S.; NAGESH.; SEKARAN G. Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilis*. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 411-419, 2008.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin onhibitor. II. General properties. **Journal of General Physiology**, New York , v. 30, p. 291-310, 1947.

LATSHAW, j. D., MUSHARA, N., RETRUM, R. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 47, 179-188, 1994.

LETOURNOU, F.; SOUSSOTTE, P.; BRESSOLLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNOEUIL. Keratinokytic activity of *Streptomyces* sp. $S.K_{1-02}$: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 77-80, 1998.

LIN, X., WONG, S.L.; SHIH, J. Expressions of the *Bacillus licheniformes* keratinase gene in *Bacillus subtilis*. **Journal Industrial Microbiology**, v.19, n. 2, p. 134-138. 1997.

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**, v.58, n. 10, p:3271-3275. 1992 **.**

LONGSHAW, C.M.; WRIGHT, J.D.; FARRELL, A.M.; HOLLAND, K.T. *Kytococccus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v 93, n. 5, p: 810-816, 2002.

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

LUCAS, P.S.; BROENNIMANN, L.; FEBBRARO, P.; HEEB, P. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, v. 45, p. 282-290, 2003

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Ed Guanabara Koogan, 1999.

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

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

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

MUSHIN, T.M.; AUBAID, A.H. Partial purification and some biochemichal characteristics of exocellular keratinase from *Trychophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycopathologia**. n. 150, n.3 , p. 121-125. 2001

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-produceing thermophilic anaerobic. **Archives of Microbiology**, v.178, n.6, p. 538-547, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Estrutura tridimensional de proteínas. In: **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3 ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002. p. 132-133.

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

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.

NOVAL; J. J; NICKERSON, W. J. Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradie* . **journal of Bacteriology**, v. 77, p. 251-263, 1958.

OLIVEIRA, G. M. **Atividade queratinolítica de uma cepa de *Streptomyces* sp isolada de um abatedouro de aves**. 2006 47 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Unesp, Rio Claro, 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.** v. 66, p. 1-11, 1998

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

PUMPHREY, B.; JULIEN C. An introduction to fermentation, 1996. Disponível em <http://www.nbsc.com/papers/fermbas.doc>Acesso em 20 Setembro de 2004.

RAWLINGS, N.D., BARRET, A.J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183-228, 1995.

RIESEN, S.; ANATRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**. 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. **Arch. Microbiol.** , 179:258-265, 2003

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

RIFFEL, A**. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratonolítica.** 2006, 98 f. Dissertação de doutorado-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

ROZS, M., MANCZINGER, L., VÁGVOLGYI, C.S., KEVEI, F. Secretion of trypsin-like thiol proteases by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformes.* **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p. 221-225, 2001.

RUFFLIN, P.; ANDRIEU, S.; BISERTE, G. Sulphitolysis in Keratinolyses. **Sabouraudia**, v. 14: 181, 184. 1976.

SAFRANECK, W.W.; GOOS, R.I. Degradation of wool by saprophytic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p.137-140, 1982.

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

SANTOS, R.M.D.B., FIRMINO, A.A.P., de Sá, C.M., FELIX, C.R. Keranolitic activity of *Aspergillus fumigatus*. **Current Microbiology**, v. 33, p.364-370, 1996.

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

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

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

SINGH, C.J. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. **Mycopathologia**, India, v. 137, p. 13-16, 1997.

STULKE, J.; HILLEN, W. Regulation of carbon catabolism in Bacillus species. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 54, p. 849-880.2000.

SUH, H. J.; LEE, H. K. Characterization of a keratinolytic serine protease from Bacillus subtilis KS-1. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 165-169, 2001.

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

SZABO, I.; BENEDEK, A.; MIHALY SZABO, I., BARABAS, Gy. Feather degradation with a thermotolerant Streptomyces graminofaciens strain. **World journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, p. 253-255, 2000.

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**, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.

TOMARELLI R.M. CHARNEY J., HARDING ML. The use the azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. **J Lab Clin med.** V 34, p. 428-433, 1949.

WANG, J.J.; SHIH, J. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformes* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 608-616, 1999.

WILLIAMS, C.M., RIECHESTER, C.S., MACKENSI, J.M., SHIH J.C.H. Isolation, identification and characteriazation of a feather degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1509 –1515, 1990.

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

YU, R. J.; HARMON, S.R.; BLANK, F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of Trichophyton mentagrophytes. **Journal of bacteriology**, v. 96, n. 4, p. 1435-1436, 1968.

ZERDANI, I.; FAOD, M.; MALKI, A. Feather wastes digestion by a new isolated strains *Bacillus* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 67-70, 2004.