

**ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA DE UMA CEPA DE
Streptomyces sp ISOLADA DE UM ABATEDOURO DE
AVES**

GUSTAVO MONTEIRO DE OLIVEIRA

Orientador: Profa. Dr. JONAS CONTIERO

Co-orientador (a): Prof. Dr(a). ELEONORA CANO CARMONA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área de
concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Agosto de 2006

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por ter chegado até onde cheguei.

Este trabalho não teria sido possível sem o financiamento do CNPq. Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas Contiero, pela paciência, ajuda e companheirismo nesta dissertação bem como à minha co – orientadora Prof(a) Dr(a) Eleonora cujos conselhos foram muito úteis, e por sua disponibilidade em todas as vezes em que a procurei. Agradeço o apoio e a amizade da brilhante e competente equipe do Laboratório de Microbiologia Industrial: Guilherme, Márcia Cazetta, Márcia (gauchinha), Mariana, Daniel, Juliana, Siddartha, Roberta, Fabrício, Maria Paula, Bárbara e Fabiano. Igualmente importante foi o auxílio de todos os funcionários, professores e alunos do Departamento de Bioquímica (Prof. Marconato, Prof(a) Dejanira, Beto, Carmen, Luíza, Inês, Fátima e aos demais) aos quais dedico meus sinceros agradecimentos. Agradeço também à ajuda do Prof. Dr. Maurício bem como ao doutorando André na identificação do microrganismo utilizado neste trabalho. Agradeço finalmente às empresas Fricock e Agroceres pelo fornecimento da farinha de penas e dos resíduos utilizados em minha pesquisa bem como aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões.

ÍNDICE	PÁGINA
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1) Proteases alcalinas.....	4
3.2) Microrganismos produtores de queratinase.....	5
3.3) O gênero <i>Streptomyces</i>	9
3.4) Queratina.....	10
3.5) Queratinases e mecanismo de ação.....	11
3.6) Penas de galinhas: características e aproveitamento.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1) Microrganismo e meio de manutenção.....	20
4.1.2) Obtenção do inóculo e determinação da curva de crescimento.....	21
4.1.3) Meio de fermentação e condições de crescimento.....	22
4.2) Determinações analíticas.....	23
4.2.1) Atividade queratinolítica.....	23
4.2.2) Determinação da concentração de proteínas.....	23
4.2.3) Efeito do pH na atividade da queratinase.....	23
4.2.4) Efeito da temperatura na atividade enzimática e verificação da estabilidade térmica da queratinase.....	24
4.2.5) Efeitos de alguns íons metálicos e EDTA na atividade queratinolítica	24
4.2.6) Porcentagem de degradação das penas.....	24
4.2.7) Estudo in vitro.....	25
4.2.8) Cromatografia em camada delgada.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1) Produção da queratinase.....	26
5.2) Estudo in vitro.....	28
5.3) Efeito de íons metálicos e EDTA.....	30
5.4) Efeito do pH na atividade.....	31
5.5) Efeito da temperatura na atividade	32
5.6) Estabilidade térmica da enzima.....	34
5.7) Cromatografia em camada delgada.....	36
6. CONCLUSÕES	39
7. LITERATURA CITADA	40

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1 Gráfico Proteína X Atividade.....	26
Figura 2 Gráfico da curva de crescimento.....	27
Figura 3 Estudo in vitro.....	28
Figura 4 Gráfico da atividade em diferentes pHs.....	30
Figura 5 Gráfico da atividade em diferentes temperaturas	31
Figura 6 Gráfico da estabilidade térmica.....	33
Figura 7 Cromatografia em camada delgada.....	35

LISTA DE TABELAS	PÁGINA
TABELA 1 Microrganismos produtores.....	8
TABELA 2 Queratinases e suas características.....	14
TABELA 3 Atividade com íons metálicos e EDTA.....	29
TABELA 4 Valores de RF.....	36

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a queratinase produzida por uma cepa de *Streptomyces* sp LMI-1 isolada de uma fábrica de processamento de aves domésticas. A enzima degradou 87% das penas após 120h de cultivo. Ela foi estimulada por íons Ba^{+2} e inibida por Ca^{+2} , Mn^{+2} , EDTA e Hg^{+} . O pH ótimo de atividade da enzima foi 8,5 e a temperatura de maior atividade foi 60°C. A enzima é estável por até 2h em 50°C. Na análise do caldo de cultura detectou-se a presença dos aminoácidos serina, metionina, prolina, tirosina e leucina logo após 72h de cultivo. A enzima apresenta potencial para utilização industrial na produção de ração animal.

Palavras – chave: queratinase, *Streptomyces*, pH, temperatura, atividade, aminoácidos, ração.

ABSTRACT

In the present work was studied keratinase produced by *Streptomyces* sp LMI-1 isolated of an industrial plant of poultry processing when cultivated with feathers as a carbon source. The enzyme degraded 87% of feathers after 120 hours. The enzyme was stimulated by Ba^{+2} and inhibited by Ca^{+2} , Mn^{+2} , EDTA and Hg^{+} . The optimum pH and temperature for the enzyme was 8,5 and 60°C, respectively. The enzyme was stable after 2 hours at 50°C. The culture broth analysis by thin layer chromatogram showed presence of amino acids serine, methionine, proline, tyrosine and leucine after 72 hours of incubation. The enzyme presents potential for industrial use in the production of animal feed preparation.

1. INTRODUÇÃO

Resíduos animais têm sido utilizados como uma fonte constante de nutrientes na produção agropecuária. Durante as últimas 3 décadas, pesquisas têm sido conduzidas para melhorar a utilização agrônômica de resíduos animais, incluindo os resíduos de aves domésticas. O aumento da produção resultou em grandes elevações na quantidade de resíduos a serem gerenciados (KIM et al, 2001). Além disso, penas são produzidas em grande quantidade como um subproduto residual das fábricas de processamento, as quais geram milhões de toneladas por ano em todo o mundo (RIFFEL et al, 2003).

A queratina é uma proteína que constitui 90% ou mais das penas das aves (SANGALI ; BRANDELLI, 2000; LIN et al, 1992). As penas acumulam-se como restos após o processamento de frangos para o consumo humano, apresentando implicações poluidoras ao meio ambiente.

Apesar das penas de aves domésticas possuírem uma quantidade de proteínas e aminoácidos com potencial para serem aproveitadas como substância alimentar para animais, elas são subaproveitadas devido à resistência à degradação da queratina (ONIFADE et al, 1998; CHENG et al, 1995). Essa resistência resulta da sua estrutura química, já que esta proteína possui várias ligações cruzadas de pontes dissulfeto (cistina), ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (LIN et al, 1992; CHENG et al, 1995; YAMAMURA et al, 2002; ALPRESS et al, 2002; RIFFEL et al, 2003; SANGALI ; BRANDELLI, 2000). Um dos métodos de se hidrolisar a queratina consiste no uso da enzima queratinase.

As queratinases são aplicadas nas áreas de medicina, cosméticos, tratamento de esgotos, bem como nas indústrias de couro, alimentos, têxteis e farmacêuticas (FARAG ; HASSAN, 2004; RIESSSEN ; ANTRANIKIAN, 2001; ALPRESS et al, 2002; CHITTE et al, 1999).

A crescente preocupação com o meio ambiente, aliado à busca por tecnologias voltadas à bioconversão de resíduos queratinosos em produtos reaproveitáveis, agregando maior valor econômico, tem levado à procura por microrganismos produtores de queratinase (SINGH, 1999).

Vários microrganismos foram estudados como fontes de enzimas queratinolíticas, sendo que algumas das queratinases estudadas foram purificadas e / ou caracterizadas.

Como as propriedades dessas enzimas parecem diferir de acordo com a espécie do microrganismo produtor, torna-se importante encontrar microrganismos que produzam enzimas queratinolíticas mais resistentes, específicas e termoestáveis para serem aplicadas na indústria (RIESSEN ; ANTRANIKIAN, 2001; FARAG ; HASSAN, 2004).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização parcial da queratinase produzida por uma bactéria do gênero *Streptomyces* sp LMI-1 isolada de um abatedouro de aves. A bactéria foi cultivada em 30°C e 150 rpm para a verificação do efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade bem como a estabilidade térmica da queratinase . O caldo de cultura foi analisado por cromatografia em camada delgada para a determinação dos aminoácidos presentes. Dessa forma, com os resultados obtidos, pretendeu-se avaliar a viabilidade ou não da utilização desta enzima em indústrias de ração animal.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Proteases alcalinas

Antes de se abordar as queratinases, é importante o esclarecimento de alguns conceitos para a compreensão dos diferentes tipos de enzimas.

Peptidases são todas aquelas enzimas que hidrolizam ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. Dessa forma, elas causam uma modificação irreversível ou a destruição de seus substratos, o que pode ser de importância biológica, seja na patologia e fisiologia humanas, ou na tecnologia. Incontáveis exemplos da relevância prática comprovada das peptidases têm sido descritas (BARRET et al, 2001).

O termo tipo é utilizado para se referir às peptidases distinguidas de acordo com os grupos químicos responsáveis pela catálise, como em tipo - serina, tipo – cisteína, tipo – aspártico ou tipo – metalo. O termo família é utilizado para descrever um grupo de enzimas no qual cada membro mostra um relacionamento evolucionário durante toda a sequência ou ao menos em parte da sequência responsável pela atividade catalítica (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

Em anos recentes, o uso potencial de enzimas alcalinas termoestáveis têm chamado a atenção para uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas em virtude de sua estabilidade em altos valores de pH e temperatura, e na presença de surfactantes, solventes orgânicos e agentes desnaturantes, os quais possibilitam sua utilização em

processos em que o uso de enzimas convencionais é restrito (KUMAR et al, 1999). Os três maiores critérios utilizados para a classificação das peptidases são: (1) a reação catalisada; (2) a natureza química do sítio catalítico e o relacionamento evolucionário revelado por sua estrutura. De acordo com a Nomenclatura Enzimática de 1992, a classe 3 contém as hidrolases e a subclasse 3.4 contém as hidrolases de peptídeos ou peptidases. As peptidases podem ser divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases agem apenas próximo ao final da cadeia polipeptídica. Já as endopeptidases agem preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica. Tanto as carboxipeptidases (exopeptidases que agem no terminal C livre) como as endopeptidases também dividem-se em subclasses com base no seu mecanismo catalítico. As peptidases do tipo- serina têm um centro ativo no qual a serina está envolvida no processo catalítico, as peptidases do tipo – cisteína têm um resíduo de cisteína no centro ativo e as endopeptidases do tipo aspártico dependem de 2 resíduos de ácido aspártico para sua atividade catalítica. As metalopeptidases utilizam um íon metálico (normalmente zinco) no mecanismo catalítico (BARRETT, 1994).

3.2 Microrganismos Produtores de Queratinases

A procura por microrganismos produtores de queratinase tem sido uma constante, uma vez que essa enzima possui um amplo espectro de aplicação.

Entre os fungos produtores de queratinase estão *Trichophyton mentagrophytes* (YU et al, 1968; MUHSIN ; AUBAID, 2000), *Trichophyton simii* (SINGH, 1997), *Malbranchea gypsea* (SINGH, 1999) e, mais recentemente, *Aspergillus oryzae* (FARAG ; HASSAN, 2004). Este último foi isolado a partir do sedimento marinho. Os fungos do gênero *Trichophyton* são dermatófitos, ou seja, parasitas da pele, unhas e cabelos.

Friedrich et al (1999) estudaram várias espécies de fungos produtores de queratinases isolados a partir do solo ou do ar. Em placas de ágar contendo queratina solúvel, os mais ativos produtores da enzima foram fungos dos gêneros *Fusarium*, *Acremonium* e *Geotrichum*. Já em cultura submersa, *Aspergillus flavus* foi o mais potente produtor de queratinases extracelulares, seguido por *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotrys atra*. Além dos já citados, outros fungos causadores

de infecções na pele foram estudados, como os do gênero *Microsporum* bem como leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (MEYERS ; AHEARN, 1977). Pelo fato de muitas espécies de fungos queratinolíticos serem patogênicos, os estudos mais recentes têm focado nas bactérias como fonte destas enzimas para uso industrial (SAID ; PIETRO, 2004).

A maioria dos trabalhos publicados se referem a bactérias produtoras de queratinases, entre as quais estão as cepas de *Bacillus licheniformis* (LIN et al, 1992; CHENG et al, 1995; MANCZINGER et al, 2003). Tais bactérias, normalmente isoladas a partir de penas parcialmente degradadas em fábricas de processamento de aves domésticas, têm se mostrado úteis na degradação da queratina das penas, além de melhorar a digestibilidade da farinha de penas.

Suh e Lee (2001) caracterizaram uma serina protease queratinolítica de *Bacillus subtilis*, a qual hidrolisava caseína mais efetivamente do que penas.

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

Foram também pesquisadas espécies de *Streptomyces* (BOCKLE et al, 1995; CHITTE et al, 1999; SZABO et al, 2000). A cepa estudada por Chitte et al (1999) foi isolada a partir de uma cratera de meteoro ocupada pelo lago Lonar na Índia. Letourneau et al (1998) isolaram uma cepa de *Streptomyces* S.K₁₋₀₂, a partir de penas em decomposição, que apresentava uma alta atividade queratinolítica quando cultivada em meio contendo farinha de penas. Comparando a queratinase dessa bactéria com proteases comerciais, eles descobriram que a mesma poderia ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica útil na degradação de resíduos de penas ou no processo de depilação das indústrias de couro.

No ano seguinte, Bressollier et al (1999), dando continuidade a pesquisa de Letourneau et al (1998), identificaram a cepa S.K₁₋₀₂ como sendo de *Streptomyces albidoflavus*, chegando a purificar a queratinase além de compará-la com a protease B de *Streptomyces griseus*.

Bactérias dos gêneros *Vibrio* e *Chryseobacterium* foram isoladas a partir de resíduos do processamento de aves domésticas e apresentaram produção de enzimas queratinolíticas (SANGALLI ; BRANDELLI, 2000; RIFFEL et al, 2003).

Em anos recentes, bactérias anaeróbias termofílicas demonstraram atividade queratinolítica (NAM et al, 2002; RIESSEN ; ANTRANIKIAN, 2001). Ambos os trabalhos estudaram bactérias isoladas de fontes de água geotermiais, sendo que aquela do artigo de Riessen e Antranikian (2001) foi a primeira do gênero *Thermoanaerobacter* a ser descrita como capaz de degradar queratina.

Bactérias dos gêneros *Lysobacter* e *Kocuria* também foram alvos de pesquisa (ALLPRESS et al, 2002; BERNAL et al, 2003), sendo a última isolada a partir do solo.

Kytococcus e *Stenotrophomonas* foram isoladas, respectivamente, a partir de calos humanos e pele de cervos (LONGSHAW et al, 2002; YAMAMURA et al, 2002), sendo que a última produzia duas enzimas, uma proteolítica e outra dissulfeto redutase, que, isoladamente, não apresentavam atividade queratinolítica mas apenas em conjunto.

As proteases extracelulares de microrganismos procarióticos estão envolvidas principalmente na hidrólise de grandes substratos polipeptídicos a pequenos fragmentos que podem posteriormente serem absorvidas pelas células (BRESSOLLIER et al, 1999).

Esses microrganismos, ao atacarem materiais queratinosos com suas queratinases, utilizam-nos como fonte de carbono, enxofre e energia para o crescimento e manutenção (LIN et al, 1992; ZERDANI et al, 2004).

Vale ressaltar que além de serem encontradas no solo, fontes geotermiais, e em resíduos de fábricas de processamento de aves domésticas, microrganismos com enzimas queratinolíticas também estão presentes na plumagem de pássaros vivos. Em seu trabalho, Burt e Ichida (1999) isolaram bactérias da plumagem de pássaros selvagens, principalmente *Bacillus licheniformis*, sugerindo que a presença dessas bactérias seja amplamente presente entre as aves.

Um fato curioso é que, como as queratinases degradam penas, os pássaros se defendem das bactérias produtoras dessas enzimas através da atividade antimicrobiana do óleo de sua glândula uropigiana (SHAWKEY et al, 2003). Outro fato interessante é que recentemente foram encontradas cepas de *Streptomyces flavis* e *Microbispora aerata*, presentes em penas de pingüins antárticos, com atividade queratinolítica (GUSHTEROVA et al, 2005).

Nitisinprasert et al (1999) estudando duas cepas isoladas de resíduos de aves domésticas e solo, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus* observou que ambos exercem uma ação sinérgica na degradação das penas. Comparando com o sistema da

celulase, enquanto a queratinase de *Bacillus licheniformis* realizava uma rápida degradação das penas apresentando uma ação endo, a enzima de *Bacillus pumilus* apresentava uma degradação mais lenta das penas mas com alta liberação de aminoácidos, possuindo, dessa forma, uma ação exo.

Na Tabela 1 são apresentados outros microrganismos produtores de queratinases, evidenciando a diversidade de suas condições de cultivo bem como o tempo de produção da enzima.

TABELA 1: Microrganismos produtores de queratinases.

Microrganismo	pH de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Fonte de C, N e S	Tempo de produção da enzima	Referência
<i>Streptomyces fradiae</i>	-	26	Penas moídas	6 dias	YOUNG e SMITH, 1975
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> SD8	8,0	55	Glicose / penas	24h	CHITTE et al, 1999
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	7,6	40	Glicose / penas	48h	SZABO et al, 2000
<i>Chryseobacterium</i> sp KR6	6,0 – 8,0	30	Farinha de penas	24h	BRANDELLI e RIFFEL, 2005
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7,8	30	Penas	5 semanas	ANBU et al, 2005
<i>Bacillus pumillus</i>	7,5	37	Penas	24h	EL-REFAI et al, 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,5 – 7,5	42	Penas moídas	48h	SANTOS et al, 1996
<i>Microsporium gypseum</i>	6,5	28	Pêlos de porcos	15 dias	KUNERT, 1992
<i>Chrysosporium georgiae</i>	7,0	30	Penas	10 dias	EL-NAGHY et al, 1998

3.3 O Gênero *Streptomyces*

Os membros do gênero *Streptomyces* são bactérias que apresentam hifas vegetativas e produzem um extenso micélio. O micélio aéreo na maturidade forma cadeias de três a vários esporos. A forma da colônia pode ser descontínua e liquenóide, coriácea ou butírica. Inicialmente as colônias apresentam superfície relativamente lisa. É Gram-positiva e aeróbia. Elas utilizam uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia para o crescimento. A sua temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 – 35°C embora algumas espécies cresçam em temperaturas psicrófilas ou termófilas. Seu pH ótimo de crescimento está na faixa de 6,5 – 8,0. As espécies são amplamente distribuídas e abundantes no solo. Poucas espécies são patogênicas para animais e humanos, enquanto outras são fitopatogênicas (HOLT et al,1994). O odor característico de terra é decorrente da produção de uma série de metabólitos, denominados geosminas. A maioria produz enzimas hidrolíticas extracelulares que permitem a utilização de polissacarídeos, proteínas e gorduras, enquanto algumas linhagens podem utilizar hidrocarbonetos, lignina, tanino e até mesmo borracha. O crescimento em culturas líquidas é intensamente estimulado pela aeração forçada. A propriedade mais notável dessas bactérias consiste na produção de antibióticos. Tal produção corresponderia a um mecanismo visando inibir o crescimento de outros microrganismos, os quais competiriam pelos nutrientes limitados (MADIGAN et al, 2004).

3.4 Queratina

A queratina é uma proteína fibrosa e, como tal, apresenta propriedades que conferem resistência e/ou flexibilidade às estruturas nas quais aparecem (NELSON ; COX, 2002).

Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina e papaína (FARAG ; HASSAN, 2004; WILLIAMS et al, 1990). Essa resistência decorre não só da composição e configuração molecular dos aminoácidos constituintes responsáveis pela sua rigidez estrutural (no caso da α - queratina), como também do fato da cadeia de queratina ser firmemente enovelada em α -hélice (α -queratina) ou β -folha (β -queratina) dentro de uma cadeia superenovelada (RIFFEL et al, 2003). Além dos motivos já citados, o fato da queratina apresentar um alto grau de ligações cruzadas de dissulfeto (cistina), ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas também contribuem para a sua resistência à degradação (LIN et al, 1992). As ligações dissulfeto da lã (e outras queratinas) estabilizam as configurações estereoquímicas que são responsáveis pela resistência dessas substâncias aos ataques químicos e enzimáticos. Com a destruição das ligações dissulfeto, a queratina desnatura-se facilmente e perde então a sua insolubilidade natural e a sua resistência às proteases (NOVAL ; NICKERSON , 1959).

A cisteína é o aminoácido majoritário nas queratinas (BOCKLE ; MULLER, 1997).

A queratina é a mais abundante proteína estrutural da pele, chifre, cabelo, lã e penas (RIESSEN ; ANTRANIKIAN, 2001). Dessa forma, ela é o componente estrutural do tegumento de muitos pássaros, mamíferos, répteis e anfíbios (SINGH, 1999). As α - queratinas evoluíram no sentido de serem resistentes e fazem parte de uma família de proteínas denominada proteínas de filamento intermediário, caracterizadas por apresentarem função estrutural (NELSON ; COX, 2002). As α – queratinas presentes nas células epiteliais, cabelos, unhas e lã de mamíferos distinguem-se das β – queratinas presentes em aves e répteis, grupos evolutivamente relacionados (SAID ; PIETRO, 2004). Na conformação β presente nas penas, a cadeia polipeptídica é mais facilmente hidrolisada comparada com a α – queratina (RAMNANI ; GUPTA, 2004).

Dos dois tipos de queratina, a β - queratina é rica em glicina, alanina, serina e, especificamente lisina, sendo que, dessa forma, com a ajuda da queratinase, pêlos, lã e penas podem ser utilizados como fonte de aminoácidos valiosos (CHITTE et al, 1999).

3.5 Queratinases e mecanismo de ação

As queratinases (E.C. n. 3.4.99.11) constituem um grupo de proteases 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 ; HASSAN, 2004). Na medicina, a enzima é utilizada na eliminação da queratina nos casos de acne ou psoríase, na eliminação de calos humanos ou na preparação de vacina para terapia contra dermatofitoses (VIGNARDET et al, 2001). As queratinases também desempenham papel importante no desenvolvimento de fungos dermatófitos, não apenas garantindo um estoque de nutrientes protéicos, mas também permitindo a invasão do tecido hospedeiro pelo fungo parasita (SINGH, 1997).

Entretanto, o segmento industrial que mais utiliza a biotecnologia das queratinases é a indústria do couro, a qual utiliza as enzimas para depilar a pele durante o processamento do couro, em substituição ao sulfeto de sódio, um composto extremamente tóxico e que gera gás sulfídrico. Inclusive, a enzima de uma cepa de *Bacillus* sp já está sendo testada a nível industrial (SAID ; PIETRO, 2004).

Segundo Suntornsuk e Suntornsuk (2003) observa-se que no caldo de fermentação acumula-se um alto conteúdo de proteínas e aminoácidos como resultado da degradação das penas pela atividade microbiana. Deste modo, após concentração, o caldo seria aplicado como uma fonte de proteínas para animais.

Como enzima com atividade queratinolítica comercialmente disponível, existe a proteinase K, uma protease alcalina do tipo serina, bem conhecida por sua alta atividade hidrolizante de queratina, e que é produzida pelo fungo *Tritirachium album* capaz de crescer em queratina de lã (YAMAMURA et al, 2002). Entretanto, ela não é classificada como queratinase (LONGSHAW et al, 2002).

A maioria dos microrganismos produtores requerem a presença de queratina como indutor da produção das queratinases. Várias atividades queratinolíticas

microbianas e especificidades enzimáticas por substratos são descritas na literatura (SANGALI ; 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 à 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).

Os autores Suntornsuk e Suntornsuk (2003) observaram que concentrações maiores de penas podem causar inibição ou repressão da queratinase pelo substrato, resultando em uma baixa porcentagem na degradação das penas.

As queratinases descritas na literatura são, em sua maioria, serina-proteases, moderadamente termofílicas (45-90°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, sulfitolise 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).

Bockle e Muller (1997) fazem uma distinção entre a desintegração inicial do complexo queratinoso dos órgãos, tais como penas de galinhas, até pequenas subestruturas e a dissolução completa da queratina molecular. Segundo o autor, a desintegração inicial pode ser causada por proteases agindo na matriz entre a 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.

Williams et al (1990) constataram um aumento de compostos solúveis de sulfidril (- SH) durante a degradação das penas pelo *Bacillus licheniformis* PWD-1 e descobriram nesse fato a evidência de que a bactéria possuía uma protease capaz de reduzir as ligações dissulfeto da queratina. Redução de ligações dissulfeto também foram observadas em *Streptomyces pactum* crescendo em penas e em *Streptomyces fradiae* crescendo em lã (YAMAMURA 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 na queratina são atacadas primeiro por uma proteína semelhante a uma dissulfeto redutase, produzindo uma proteína parcialmente fragmentada, que é um bom substrato para a protease.

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

Ainda existe necessidade de se encontrar uma enzima queratinolítica mais específica e termoestável que possa ser aplicada em indústrias têxteis (modificação das fibras de lã), de alimentos (hidrólise de proteínas derivadas de animais) e farmacêuticas (produção de peptídios bioativos) (RIESSEN ; ANTRANIKIAN, 2001).

A Tabela 2 mostra as características de algumas queratinases estudadas.

TABELA 2: Queratinases de alguns microorganismos e algumas de suas características.

Microrganismo Produtor	pH ótimo da queratinase	temperatura ótima de atividade (°C)	Tipo	Referências
<i>Bacillus pumilus</i>	9,0	55	-	EL – REFAI et al, 2005
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	8,0	40	serina	ANBU et al, 2005
<i>Bacillus sp</i> FK46	9,0	37	-	SUNTORSUK e SUNTORNSUK, 2003
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	7,5	60	serina	BRESSOLLIER et al, 1999
<i>Kocuria rosea</i>	10,0	40	serina	BERNAL et al, 2003
<i>Chryseobacterium sp</i> kr6	7,5	55	-	RIFFEL et al, 2003
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,5	50	-	LIN et al, 1992
<i>Microbacterium sp</i>	7,0	55	metalo	THYS et al, 2004
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5,5	50	-	MUHSIN e AUBAID, 2000
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9,0	45	-	SANTOS et al, 1996

3.6 Penas de galinhas: características e aproveitamento

Penas, o material queratinoso mais abundante da natureza, são importantes para o isolamento, locomoção (vôo) e conformação estrutural para os pássaros. Todavia, são subaproveitadas para possíveis aplicações biotecnológicas (ONIFADE et al, 1998).

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

Zerdani et al (2004) caracterizando a composição química dos resíduos de penas descobriram 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 são 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 sua utilização como proteína alimentar (LIN et al, 1992). Afinal, 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 de liberação lenta de nitrogênio ou ainda como filmes biodegradáveis (THYS et al, 2004). A biodegradação das penas também permite que as mesmas sejam convertidas em colas (RIFFEL et al, 2003).

As penas constituem até 10% do peso total de frangos, alcançando valores superiores a $7,7 \times 10^8$ kg/ano como um 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 é 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 por microrganismos que degradam queratina oferece uma possível tecnologia microbiana para a obtenção de enzimas proteolíticas (BERNAL et al, 2003).

Entretanto, a utilização de resíduos de penas como um suplemento alimentar é limitada (NITISINPRASERT et al, 1999). Isso decorre do fato das penas serem deficientes em aminoácidos essenciais na nutrição tais como metionina, lisina, histidina e triptofano (ONIFADE et al, 1998). Sabe-se que a composição em aminoácidos da queratina de diferentes espécies de aves é muito similar como foi observado em diversas penas de galinhas (SANGALI ; BRANDELLI, 2000). Dados obtidos por Suntornsuk e Suntornsuk (2003) mostram que a digestibilidade de penas inoculadas por pepsina foi significativamente maior do que aquelas não-inoculadas, mostrando que a estrutura das penas de galinhas foi alterada pela atividade bacteriana, permitindo assim uma fonte de proteínas digerível para animais.

Estudos mostram que o uso do extrato bruto da queratinase aumentou significativamente a digestibilidade dos aminoácidos tanto das penas como da farinha de penas (SANGALI ; BRANDELLI, 2000). Em seu trabalho, Nam et al (2002) verificaram, através do microscópio, que a bactéria *Fervidobacterium islandicum* AW-1 não apenas degradou as penas como também modificou a estrutura das mesmas. Isso poderia favorecer a degradação da queratina pela exposição de uma superfície maior à ação da enzima, aumentando assim a digestibilidade das penas.

Williams et al (1991) verificaram em seus experimentos que o caldo de penas tratadas com *Bacillus licheniformis* PWD – 1 era equivalente à proteína de soja e superior à farinha de penas comerciais em 23 e 37,5% respectivamente da proteína total na dieta.

Estudos prévios usando a queratinase da cepa PWD-1 de *Bacillus licheniformis* mostraram melhoras significativas no crescimento de frangos com 21 e 26 dias de idade

(ODETALLAH et al, 2005). Em seu trabalho, Odetallah et al (2005) mostraram que a suplementação da dieta de frangos com versazyme, um aditivo alimentar comercial que contém queratinase, resultou em melhora no crescimento dos mesmos.

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.

Por tudo que foi exposto, observa-se que a reciclagem de penas é um assunto de interesse entre os nutricionistas devido ao seu potencial como uma fonte alimentar protéica alternativa e barata (ONIFADE et al, 1998).

O processo atual para obter farinha de penas, que utiliza vapor pressurizado resultante do cozimento das penas, é caro, já que requer uma quantidade significativa de energia, e além disso transforma certos aminoácidos essenciais nutricionalmente importantes como metionina, lisina e triptofano formando outros não-nutritivos como lisinoalanina e lantionina, resultando em um produto de baixa digestibilidade e nutrientes de qualidade variável (WILLIAMS et al, 1990; SANGALI ; BRANDELLI, 2000; NITISINPRASERT et al, 1999; NAM et al, 2002). Já a proteólise da queratina por microrganismos com atividade queratinolítica representa um método alternativo para melhorar o valor nutricional de restos de penas, pelo enriquecimento protéico das penas pela própria biomassa microbiana, além de evitar a destruição de certos aminoácidos essenciais tais como metionina, lisina, histidina que, nas penas, os quais já se encontram em níveis não muito elevados. A biodegradação das penas apresenta ainda a vantagem de não formar aminoácidos derivados não-assimiláveis (MANCZINGER et al, 2003; SAID ; PIETRO, 2004; WILLIAMS et al, 1991).

Por outro lado, 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).

Nos meios de cultura, as penas funcionam como fonte de carbono, enxofre e energia para o crescimento do microrganismo. As penas adicionadas ao meio de cultivo podem ser tanto inteiras (RIFFEL et al, 2003; SANGALI ; BRANDELLI, 2000; RIFFEL ; BRANDELLI, 2002; THYS et al, 2004; BOCKLE et al, 1995; RAMNANI ; 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 ; 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 e proteinase K (LONGSHAW et al, 2002). Szabo et al (2000) entretanto, comparando a sua cepa de *Streptomyces graminofaciens* a outras utilizadas anteriormente observaram que a queratinase dessa bactéria parece ser mais eficiente na digestão de penas não-móidas.

Em seu trabalho, Farag e Hassan (2004) sugerem a utilização de um biorreator com queratinase imobilizada capaz de converter penas móidas a peptídeos e aminoácidos, os quais poderiam ser separados por cromatografia de troca iônica ou filtração em gel. Existem trabalhos realizados com queratinases imobilizadas (LIN et al, 1996; WANG et al, 2003). Geralmente a imobilização provoca uma estabilidade da queratinase ao calor, aumenta sua estabilidade a variações de pH além de melhorar a sua estabilidade. Entretanto, WANG et al (2003) constataram taxas de reação mais baixas do que aquelas com a enzima livre.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Microrganismo e meio de manutenção

Neste trabalho utilizou-se uma cepa de *Streptomyces* sp LMI-1 que degrada penas isolada de uma fábrica de processamento de aves domésticas. O microrganismo foi identificado através do sequenciamento do RNAr 16S e sua comparação com sequencias relacionadas depositadas no GenBank. A bactéria isolada de água residuária de abatedouro de frango (Fricock), foi mantida no meio de cultivo, proposto por Williams et al (1990):

Ingredientes	Concentração (g/L)
Cloreto de amônio	0,5
Cloreto de sódio	0,5
Fosfato de potássio dibásico	0,3
Fosfato de potássio monobásico	0,4
Cloreto de magnésio	0,1
Extrato de levedura	0,1
Farinha de penas (Agrocere)	10
Ágar	20

O pH do meio foi ajustado para 7,5 e esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 min.

O microrganismo também foi armazenado em tubos criogênicos, contendo um agente crioprotetor (glicerol), à temperatura de -20°C.

4.1.2 Obtenção do inóculo e determinação da curva de crescimento

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 (preparado segundo SILVA et al, 2001) no qual são colocadas duas alçadas a partir de uma cultura pura presente em placa do meio de Williams. O caldo nutriente foi incubado a 30°C, 150 rpm por não mais do que 24h. Nessas condições, o caldo apresentou uma turbidez adequada para comparação com a escala de McFarland (tubo 10^5 ou 10^4). Em seguida, 1mL do caldo nutriente foi transferido para um frasco contendo 100 mL do meio proposto por Letourneau et al (1998) contendo penas naturais inteiras e incubado em shaker a 150 rpm a 30°C.

Alíquotas de 1mL deste meio foram retiradas de 24 em 24h para diluição em solução salina 0,85%, onde foram realizadas as diluições até 10^{-8} , com o plaqueamento sendo realizado em ágar nutriente. As placas foram incubadas por 24h a 30°C e as contagens foram realizadas entre 25 a 250 colônias, as quais foram utilizadas para a construção do gráfico de log UFC/mL, em função do tempo (Fig.2, item 5.2).

A seguir são mostrados a composição e o preparo dos meios de acordo com Silva et al, 2001.

Preparo dos meios

Caldo nutriente:

Extrato de carne 3g/L

Peptona 5g/L

Água destilada 1L

Autoclavar por 15 minutos.

Agar nutriente

As mesmas quantidades utilizadas para o preparo do caldo nutriente, adicionando-se 15g de agar por litro.

4.1.3. Meio de fermentação e condições de crescimento

A cepa de *Streptomyces* sp foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio descrito por Letourneau et al (1998). Para tanto utilizou-se um inóculo de 1 mL do caldo nutriente cuja turbidez era do tubo 10^4 ou 10^5 da escala de McFarland. Em “shaker”, as condições foram as seguintes: agitação de 150 rpm, temperatura de 30 °C e 120 h de fermentação. O meio apresentou a seguinte composição:

Ingredientes	Concentração (g / L)
Cloreto de amônio.....	0,5
Cloreto de cálcio.....	0,22
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O).....	0,2
Fosfato de potássio monobásico.....	0,3
Fosfato de potássio dibásico.....	0,4
Extrato de levedura.....	0,2
Penas inteiras.....	10

O pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de NaOH 0,5N. As penas brancas (fornecidas pela Kori) foram lavadas com água de torneira, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5% e secas em estufa antes de serem adicionadas e autoclavadas a 121°C

durante 15 min junto com o meio citado. Alíquotas do caldo de fermentação foram amostradas para a análise do crescimento microbiano, pH, atividade queratinolítica, concentração de proteínas e porcentagem de degradação das penas. O microrganismo foi cultivado durante 72h para a determinação da atividade queratinolítica.

4.2. Determinações Analíticas

4.2.1 Atividade Queratinolítica

Para a determinação da atividade queratinolítica isolada das células foi adotada uma metodologia modificada de Bressollier et al (1999). A mistura de reação continha 800 µL do caldo sobrenadante e 3,2 mL de uma solução 0,4% (m/v) de *keratin azure* (Sigma) em tampão Tris HCl 50 mM em pH 8,5. A mistura foi incubada a 50 °C durante 1h, sob agitação a 100 rpm. Após filtração em peneira TYLER 200 (abertura 0,074 mm), a absorbância do sobrenadante foi determinada a 595 nm em comparação com o branco (não utilizou-se curva padrão). Uma unidade de atividade queratinolítica correspondia à quantidade da enzima que causa um aumento na absorbância de 0,01 nessas condições. Como branco foi utilizado 1,2 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v), 1,2 mL de solução enzimática e 4,8 mL de tampão Tris- HCl pH 8,5.

4.2.2 Determinação da Concentração de Proteínas

O sobrenadante, livre de células após a centrifugação a 10000 g por 10 min, de cada cultura foi utilizado para a determinação de proteína solúvel pelo método de Lowry et al (1951), utilizando-se como padrão soroalbumina bovina.

4.2.3 Efeito do pH na atividade da queratinase

O efeito do pH foi analisado com *keratin azure* (Sigma) como substrato. A atividade enzimática determinada conforme o item 4.2.1 foi estudada na faixa de pH de 4 a 10 na temperatura de 50°C, utilizando os seguintes tampões: McIvane (pH 4,0 e 5,0), KH₂PO₄ / NaOH (pH 7,0), Tris -HCl (pH 8,5 e 9), NaHCO₃ / NaOH (pH 10). Os

resultados foram expressos em atividade relativa, com o valor da atividade obtido em pH 8,5 definido como 100% (LETOURNEAU et al, 1998).

4.2.4 Efeito da temperatura na atividade enzimática e verificação da estabilidade térmica da queratinase

A temperatura de maior atividade queratinolítica foi determinada pela variação da temperatura de incubação no intervalo de 30 a 60°C. Neste caso, os resultados foram expressos como atividade relativa, sendo o valor da atividade em 60°C considerado como 100%. Para a determinação da estabilidade térmica, a solução enzimática foi incubada durante 7h e 30 min nas temperaturas de 40 a 60°C, sendo a atividade enzimática determinada em 50°C em intervalos de tempo dobrados a partir de 30min (a atividade enzimática era determinada a 50°C, após a enzima permanecer incubada na temperatura teste por 30 min, 1h, 2h, 4h e assim por diante). As atividades residuais foram comparadas com a atividade da enzima não-incubada considerada como 100%. Ambas as determinações foram realizadas em tampão Tris – HCl pH 8,5 50 mM e utilizando *keratin azure* como substrato.

4.2.5 Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade queratinolítica

A solução enzimática foi pré-incubada em temperatura ambiente durante 15 min com o inibidor de protease EDTA (2 e 10mM) antes da medida da atividade da mesma. O efeito de íons metálicos na atividade queratinolítica foi testado nas concentrações de 2 e 10mM. A atividade residual foi então expressa como porcentagem de atividade da enzima controle (não-incubada com substâncias químicas). Foram utilizadas as seguintes substâncias: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnCl_2$, $HgCl$, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, EDTA, $MgCl_2$, $CaCl_2$.

4.2.6. Porcentagem de degradação das penas

Seguiu-se a metodologia de Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Após 120h de fermentação, o caldo foi filtrado em papel de filtro, previamente seco em estufa a 105°C

durante a noite e tarado até peso constante. A porcentagem de degradação das penas foi calculada através da diferença no peso seco residual entre um controle (meio com penas não-inoculadas) e a amostra tratada

4.2.7. Estudo in vitro

O caldo da fermentação após centrifugação por 10000g a 10 min foi utilizado para degradar penas não-autoclavadas em tubos de ensaio previamente esterilizados em autoclave. As penas foram expostas à luz UV por 30min antes da adição do caldo da fermentação. Este teste foi realizado com o objetivo de verificar a degradação das penas sem que as mesmas tenham sofrido tratamento pelo calor úmido. Isso porque o uso de substratos esterilizados através do calor em análises queratinolíticas vêm sendo criticado, pois sabe-se que o aquecimento causa a desnaturação da queratina (LONGSHAW et al, 2002). Os testes foram realizados em estufa nas temperaturas de 30 a 80°C.

A desintegração da estrutura da pena foi estimada qualitativamente.

4.2.8 . Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com o objetivo de verificar os aminoácidos presentes no caldo da fermentação. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase-móvel uma mistura de: n-butanol / ácido acético / água (4:5:1). O agente revelador utilizado foi a ninidrina 0,2% (m/v) em acetona com adição de 5 gotas de piridina. As amostras consistiram de caldo de fermentação centrifugados de diferentes dias de fermentação (24, 48, 72, 96 e 120h) além dos padrões de aminoácidos serina, prolina, tirosina, metionina e leucina (COLLINS et al, 1993).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Produção da queratinase

Na fermentação, foram utilizadas penas inteiras para induzir a produção da queratinase. O pH do meio aumentou de 7,5 para 8,7 durante os 5 dias de cultivo. Constatou-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 resulta da produção de amônia por meio da desaminação 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 ; BRANDELLI, 2000). Cerca de 87% das penas tinham sido degradadas após 5 dias de cultivo (valor determinado conforme item 4.2.6). Esse resultado foi bem próximo ao obtido por Suntornsuk e Suntornsuk (2003) com a bactéria *Bacillus* sp FK46, que foi de 85% nesse mesmo intervalo de tempo. Com relação às diferenças encontradas em outros trabalhos, essas podem ser atribuídas a diferenças na cepa do microrganismo ou na estrutura química do substrato utilizado.

Os resultados de atividade queratinolítica e concentração de proteínas obtidos nas fermentações (item 4.1.3) são apresentados na **Fig 1**.

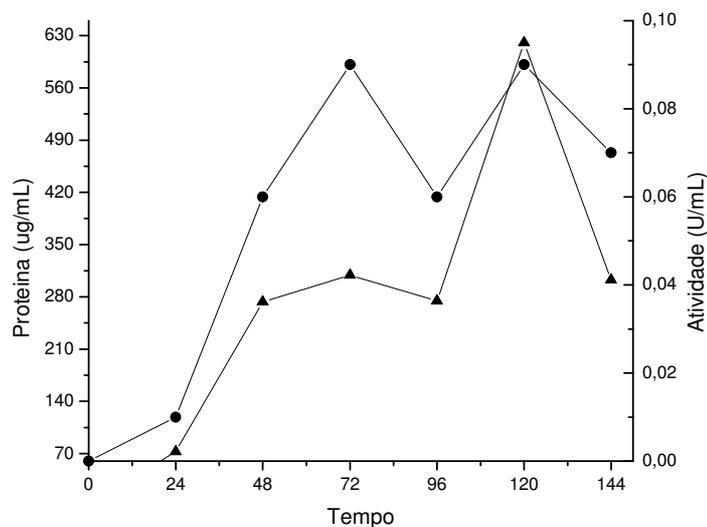


Figura 1: Fermentação realizada a 30°C pH 7,5 em meio contendo penas inteiras e com atividade queratinolítica determinada a 50°C pH 8,5. Atividade queratinolítica (●) e proteína solúvel (▲).

Na Figura 1, observa-se que ocorreram dois picos de produção da enzima, um após 72h e outro após 120h. Estes resultados foram observados em várias fermentações lembrando que, em cada uma delas, as atividades queratinolíticas e as análises de proteína eram realizados em duplicata. Conforme observa-se na Figura 2, neste intervalo de tempo, a bactéria estava em sua fase de declínio.

Como mostrado na Figura 1, a cepa de *Streptomyces* sp produziu uma queratinase extracelular sendo que os níveis de produção da mesma variaram durante o cultivo. Esse padrão de produção sugere a hipótese de que a enzima é induzível e que os níveis de substrato e metabólitos no ambiente regulam a sua secreção (RIFFEL et al, 2003).

O microrganismo mesofílico utilizado no experimento degradou as penas de forma satisfatória. Tais microrganismos requerem menos energia do que as cepas termofílicas normalmente utilizadas no processamento das penas, já que as mesmas necessitam que o meio seja aquecido até as temperaturas ótimas de crescimento e produção da enzima ao contrário de microrganismos mesofílicos.

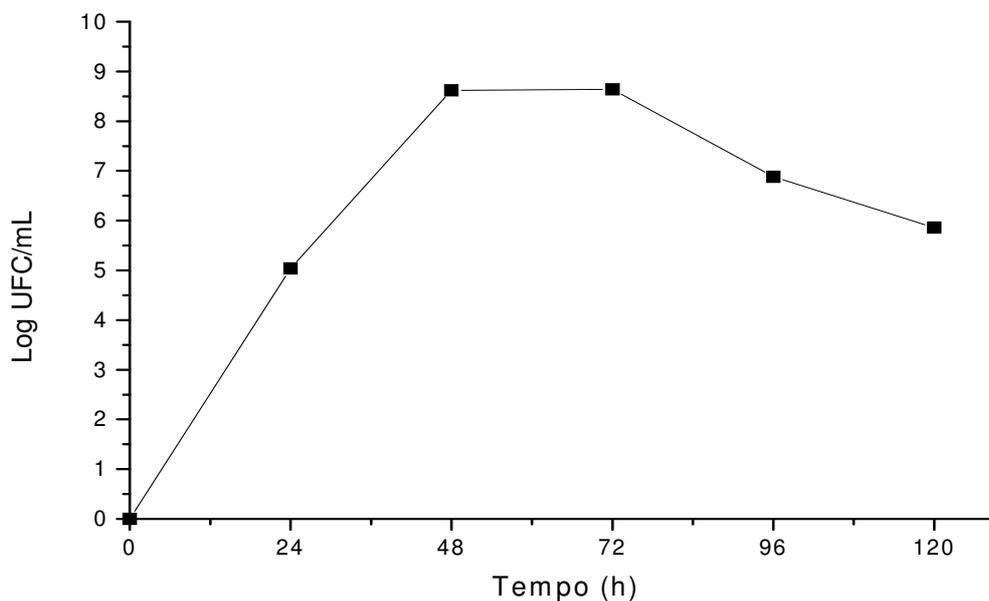


Figura 2: Curva de crescimento da cepa de *Streptomyces* sp isolada de um abatedouro de aves (cultivada em 30°C, 150 rpm, meio contendo penas inteiras, pH inicial de 7,5).

5.2 Estudo in vitro

Na Figura 3 são apresentadas as fotos comparativas de penas tratadas com caldo da fermentação com aquelas não-tratadas, em várias temperaturas.

Penas não-autoclavadas foram quase que completamente degradadas em 72h, utilizando-se apenas o caldo de cultura livre de células. Este resultado contrasta com o observado por Williams et al (1990), os quais, em seu trabalho, constataram que a hidrólise das penas pelo microrganismo utilizado era dependente de um tempo de autoclavagem mínimo, a fim de tornar a queratina da pena mais acessível à ação da bactéria. Dessa forma, o efeito térmico facilitaria a degradação das penas.

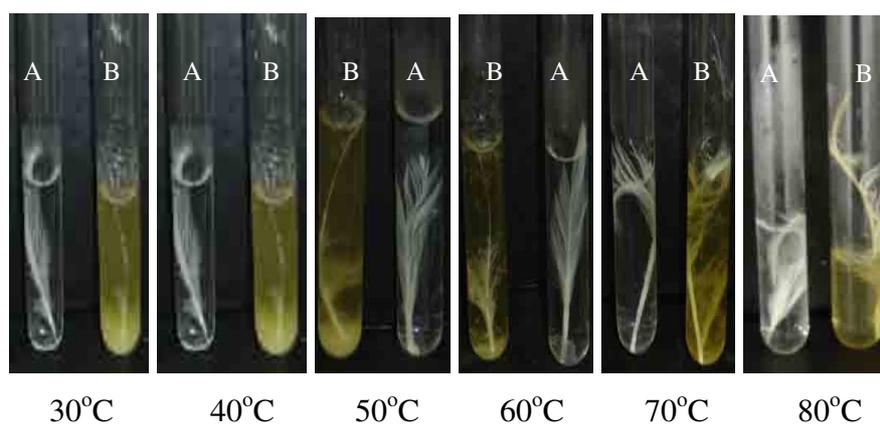


Figura 3: Estudo in vitro realizado em diferentes temperaturas onde A-) controle e B-) amostra. Resultados obtidos após 72h de incubação.

Outra diferença observada foi com relação ao ocorrido no trabalho de Szabo et al (2000) no qual o caldo da fermentação livre de células era deficiente na atividade queratinolítica. No presente estudo, o caldo da cultura livre de células mostrou atividade, uma vez que, como se nota através da Figura 3, nas temperaturas de 30°C a 60°C ocorreu degradação das penas. Já nas temperaturas de 70°C e 80°C praticamente não houve degradação, provavelmente devido à inativação térmica da enzima.

5.3 Efeitos de íons metálicos e EDTA

Os resultados da atividade enzimática relativa obtidos com a incubação da enzima em diferentes soluções de íons metálicos e EDTA são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3: Atividades relativas da queratinase de *Streptomyces* sp quando incubada com as substâncias acima nas concentrações de 2 e 10 mM durante 15 min. (*) Fonte: Weast, 1989.

SUBSTÂNCIA	Raio iônico (pm)*	Atividade Relativa na Concentração 2mM	Atividade Relativa na Concentração 10mM
CuSO ₄	72	93,3%	86,7%
BaCl ₂	134	138,5%	46,1%
CaCl ₂	99	85,7%	32,1%
HgCl	127	88,5%	53,8%
MnCl ₂	80	93,7%	12,5%
ZnCl ₂	74	78,6%	28,6%
MgCl ₂	66	105,9%	94,1%
EDTA	-	100%	52,9%

A enzima foi estimulada por BaCl₂ na concentração 2 mM, sendo que o mesmo apresentou efeito inverso na concentração de 10 mM. Esse resultado sugere que o íon Ba⁺² seja necessário para a atividade da enzima dependendo da concentração. Nesse caso, o fato do raio iônico do Ba⁺² ser o maior dentre os íons metálicos utilizados (134pm), sugere que ele seja o mais apropriado para se encaixar no sítio ativo da enzima, ajudando, dessa forma, a manter a formação do complexo enzima – substrato. Ela foi inibida fortemente por EDTA, CaCl₂, MnCl₂, ZnCl₂ e HgCl na concentração 10mM. O MgCl₂ não mostrou grande influência sobre a atividade. A inibição por CaCl₂, ZnCl₂ e por EDTA também foi observada por Letourneau et al (1998) em seu estudo da queratinase de *Streptomyces* S.K₁₋₀₂. Vale ressaltar que a inibição por EDTA sugere que a enzima seja uma metaloprotease, uma vez que o EDTA estaria sequestrando algum íon metálico importante para a atividade da queratinase.

Riffel et al 2003 obteve os seguintes resultados com sua queratinase: ela foi inibida por EDTA e Cu^{+2} e sua atividade aumentou na presença de Ca^{+2} . Neste mesmo trabalho, os pesquisadores afirmam que várias peptidases são inibidas pelo excesso de zinco, particularmente em meio neutro a alcalino, e que algumas metaloproteases são inibidas pelo excesso de zinco.

Vale lembrar que o íon metálico provavelmente age como um sal ou como uma espécie de “ponte” para manter a estrutura da conformação da enzima ou para estabilizar a ligação do substrato ao complexo enzimático. O íon metálico também exerce um papel importante na estabilidade de proteases térmicas (SUNTORN SUK et al, 2005).

A inibição da enzima por agentes quelantes fornece um método potencial para a sua inativação temporária durante o armazenamento, reduzindo a autólise associada com enzimas proteolíticas. Neste caso, a natureza metaloenzimática dessa queratinase representa um método potencial para a sua imobilização, a qual tem sido apontada como capaz de aumentar a estabilidade devido à redução da autólise enzimática (ALPRESS et al, 2002).

5.4 Efeito do pH na atividade

Os resultados de atividade enzimática relativa em função do pH são apresentados na Figura 4.

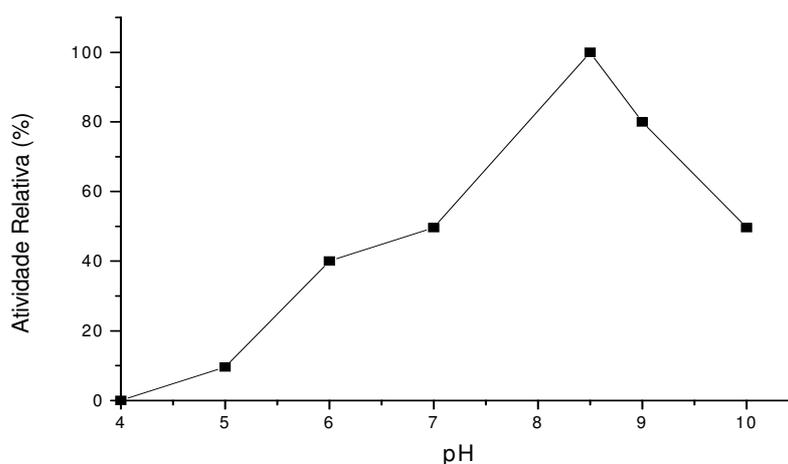


Figura 4: Atividade queratinolítica em diferentes valores de pH na temperatura de 50°C utilizando *keratin azure* como substrato.

Nela, observa-se que a enzima apresentou boa atividade queratinolítica no intervalo de pH entre 7 e 10. O fato dessa enzima ser ativa neste intervalo de pH permite a sua utilização em processos que requerem valores extremos de pH, como na indústria do couro. Tal resultado foi bem próximo ao observado para *Streptomyces thermoviolaceus* (CHITTE et al, 1999).

Com relação aos baixos valores de atividade em pH 4 e 5 vale lembrar que valores extremos de pH geralmente inativam as enzimas, através de protonação ou desprotonação de aminoácidos que estão presentes no sítio catalítico da enzima (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

O pH ótimo de atividade da enzima foi 8,5. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Suntornsuk et al (2005) mas difere com o obtido por Bernal et al, 2003 cujo pH ótimo foi entre 9 e 10. Outras enzimas queratinolíticas mostraram-se ativas em meio alcalino, como aquelas secretadas por *Streptomyces albidoflavus* (BRESSOLLIER et al, 1999).

5.5 Efeito da temperatura na atividade

Os resultados de atividade enzimática obtidos em diferentes temperaturas são apresentados na Figura 5.

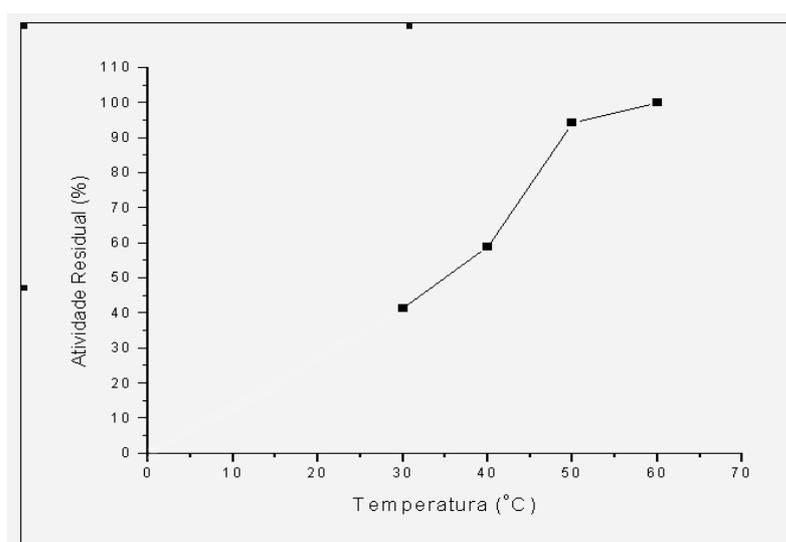


Figura 5: Atividade queratinolítica em diferentes temperaturas realizadas em pH 8,5 utilizando *keratin azure* como substrato.

Na Figura 5, nota-se que a atividade da enzima foi baixa quando realizada a 30°C, ou seja, a mesma temperatura utilizada para a incubação da cepa pesquisada. Esse resultado também foi observado por Bockle et al (1995), os quais verificaram que, na temperatura ótima de crescimento de *Streptomyces pactum* (32°C), os níveis de atividade proteolítica e desintegração das penas inteiras eram muito baixos quando a atividade era realizada nessa mesma temperatura. Estudos preliminares (desses mesmos autores) de atividade enzimática têm mostrado que uma taxa consideravelmente mais alta de atividade queratinolítica pode ser alcançada pelo aumento na temperatura de incubação e posterior uso de aditivos, como agentes redutores ou detergentes. Isso pode ser constatado no gráfico (Figura 5), uma vez que o aumento na temperatura provocou um aumento concomitante na atividade queratinolítica.

Na Figura 5, observa-se inicialmente que, com o acréscimo da temperatura, a atividade enzimática aumenta, aumentando assim a formação do complexo enzimático. Tal fato era esperado pois, de maneira geral, as proteases, bem como outras enzimas, são mais ativas em temperaturas mais elevadas (SCOPEES, 1993). Sabe-se que o aumento contínuo da temperatura, entretanto, pode causar uma inativação gradativa da enzima, até a inativação total, causada pela desnaturação da proteína pelo calor, o que foi comprovado pelo estudo in vitro (item 5.2). De modo geral, as enzimas reagem lentamente nas temperaturas de subcongelamento e sua atividade aumenta com o aumento da temperatura até atingir uma atividade ótima em temperaturas ao redor de 45°C, além das quais começa a sua inativação (BOBBIO e BOBBIO, 1995). Além disso, o aquecimento, muito provavelmente, torna as fibras de queratina mais acessíveis para as enzimas proteolíticas pela ruptura das ligações de hidrogênio da queratina (SZABO et al, 2000).

A temperatura testada que apresentou maior atividade da enzima foi 60°C, sendo que, para temperaturas maiores, a *keratin azure* mostrou-se pouco confiável, uma vez que em experimentos realizados sem a adição da solução enzimática e apenas com o tampão, ocorria a liberação do corante. Como no estudo in vitro (item 5.2) a degradação das penas ocorria até 60°C decidiu-se encerrar os testes nessa temperatura. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Suntornsuk et al (2005), em seu trabalho com a queratinase purificada de *Bacillus licheniformis*, e também ao encontrado por Bressollier et al (1999) com a queratinase de *Streptomyces albidoflavus*. A temperatura

ótima da queratinase obtida por Riffel et al (2003) com o *Chryseobacterium* sp kr6 foi de 75°C.

Com base nos valores médios de atividade queratinolítica obtido nas temperaturas testadas, foi calculado o valor da energia de ativação (E_a) da reação de hidrólise da queratina, a partir da equação de Arrhenius, cujo resultado foi de 33 J / mol. Lembrando que uma energia de ativação alta implica numa reação lenta.

5.6 Estabilidade térmica da enzima

Os resultados de atividade enzimática quanto à estabilidade térmica da queratinase (conforme item 4.2.4) nas temperaturas de 30°C, 40°C e 60°C são apresentados na Figura 6.

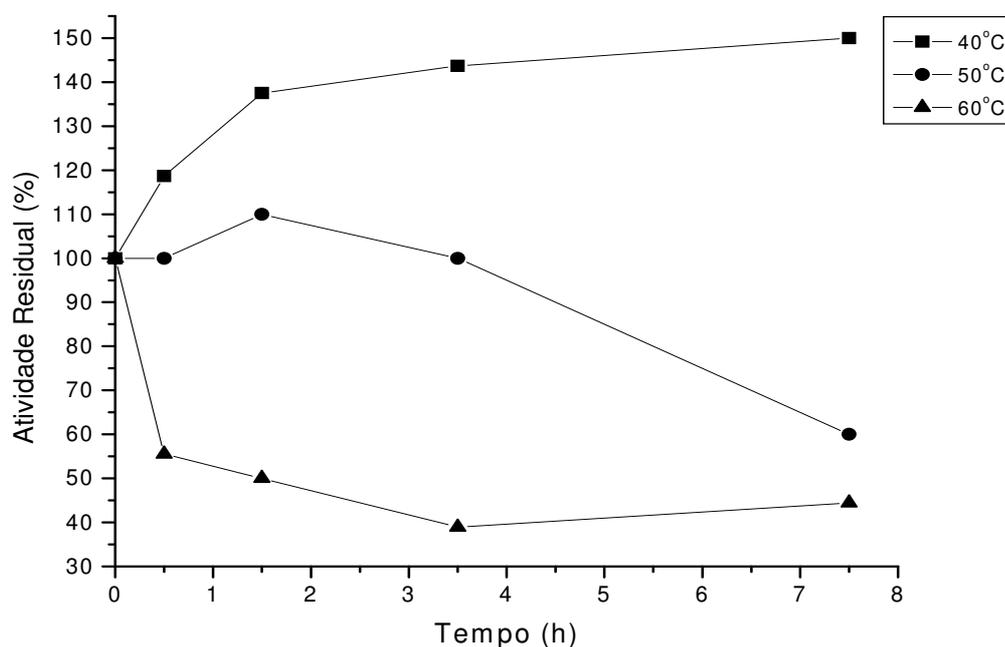


Figura 6: Estabilidade térmica da queratinase nas temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C em pH 8,5, utilizando *keratin azure* como substrato.

Na Figura 6, nota-se que quando incubada a 40°C a enzima exibiu um aumento em sua atividade. Incubada a 50°C, após um ligeiro aumento de sua atividade, ocorreu

uma leve diminuição após 2h, a qual se acentuou nas próximas 4h. Entretanto, é importante ressaltar que a atividade da enzima foi maior que 50% após 7 e meia de incubação a 50°C. Quando incubada a 60°C, a enzima teve sua atividade reduzida acentuadamente, sendo esta queda constatada após 30 min de incubação, tempo em que a sua atividade residual caiu pela metade. Esses resultados mostram que a enzima apresenta uma boa estabilidade em temperaturas elevadas, o que permite a sua utilização em processos industriais, os quais costumam empregar altas temperaturas com o objetivo de minimizar o risco de contaminação microbiana.

Young e Smith (1975) observaram em seu trabalho, que a queratinase de *Streptomyces fradiae* era mais viável a 50°C do que a 60°C, apesar da sua rápida taxa de reação em temperaturas mais elevadas. No presente trabalho, os resultados encontrados com relação à estabilidade térmica parecem conduzir à mesma conclusão, já que a queratinase da cepa pesquisada mostrou ser estável por mais tempo a 50°C.

Segundo Lin et al (1996), a perda da atividade enzimática é em grande parte devido à autólise enzimática e desnaturação.

Os resultados obtidos com relação à estabilidade a 40°C são parecidos aos obtidos com a queratinase estudada por Santos et al (1996). Esses autores constataram um leve aumento na atividade da enzima quando incubada a 50°C e sugeriram que o mesmo pode ser resultado da dissociação, em alta temperatura, de um inibidor enzimático interagindo com a protease, ou devido à transição da proteína ativa para uma conformação mais apropriada para formar o complexo enzima-substrato.

5.7. Cromatografia em camada delgada

Com o objetivo de avaliar a presença de aminoácidos no caldo de fermentação, foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada. Os resultados dessa cromatografia são mostrados na Figura 7.

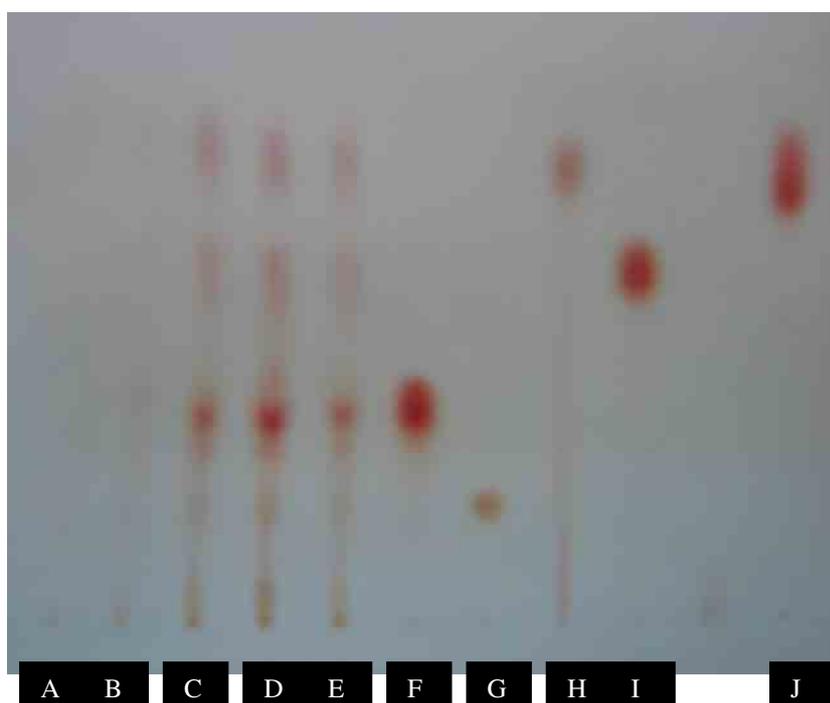


Figura 7: Cromatografia em camada delgada onde as letras correspondem a A-) caldo de 24h; B-) caldo de 48h; C-) caldo de 72h; D-) caldo de 96h; E-) caldo de 120h; F-) serina; G-) prolina; H-) tirosina; I-) metionina; J-) leucina.

Na Figura 7, nota-se que as amostras de 24 e 48h não formaram manchas. Já as amostras de 72, 96 e 120h, levando-se em conta os valores de RF (fator de retenção) da tabela 4, mostraram a presença dos aminoácidos serina (b), metionina (c), prolina (a), tirosina (d) e leucina (d). Os valores de RF encontrados são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Valores de RF (fator de retenção) encontrados na cromatografia em camada delgada, onde (a) é a primeira mancha de baixo para cima, (b) a segunda, (c) a terceira e (d) a quarta.

Amostra ou Padrão	RF
72h (a)	0,13
96 (a)	0,13
120 (a)	0,13
72h (b)	0,24
96h (b)	0,24
120h (b)	0,24
72h (c)	0,42
96h (c)	0,42
120h (c)	0,42
72h (d)	0,56
96h (d)	0,56
120h (d)	0,55
Serina	0,24
Prolina	0,14
Tirosina	0,53
Metionina	0,41
Leucina	0,52

O valor de Rf (fator de retenção) é definido da seguinte forma (COLLINS et al, 1993):

$$Rf = \frac{\text{distância (cm ou mm) percorrida pela substância}}{\text{distância (cm ou mm) percorrida pela frente da fase móvel}}$$

Tais resultados evidenciam que a liberação dos aminoácidos ocorre a partir de 72h. A serina é um aminoácido presente em β – queratina. Além desse, o caldo mostrou a presença de prolina, o qual da mesma forma que a serina, é um aminoácido raro presente nas penas.

A metionina 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.

Os aminoácidos leucina e tirosina também foram encontrados no caldo da cultura de *Streptomyces thermoviolaceus* através da cromatografia em papel por Chitte et al (1999).

Os resultados obtidos mostram que a produção dos aminoácidos evidenciados pela cromatografia em camada delgada no caldo da cultura de *Streptomyces* sp pode permitir a sua utilização no aproveitamento das penas nas indústrias de ração animal.

6. CONCLUSÕES

A enzima apresentou um pH ótimo de atividade igual a 8,5 e a temperatura em que ocorreu a maior atividade foi de 60°C, sendo estável na faixa de temperatura 40 a 60°C e com boa atividade em pH 7 - 10 . O pH ótimo e a faixa de pH dentro do qual a enzima apresenta boa atividade colocam-na no grupo das proteases alcalinas. Dessa forma, observa-se que a queratinase é ativa em uma ampla faixa de valores de pH e temperatura, além de ser relativamente estável ao calor. Seu caldo de cultura apresentou os aminoácidos serina, metionina, prolina, tirosina e leucina. Tais propriedades tornam interessante e viável a utilização industrial dessa enzima uma vez que a mesma seria produzida a partir de um substrato de fácil obtenção e de baixo custo para a produção de um bem com maior valor agregado.

7. LITERATURA CITADA

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

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; PRIYA, T.L.; ANNADURAI, G. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.36, p. 639 – 647, 2005.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**, v.244, p. 1 – 15, 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Estructural Biology**, v. 134, p. 95 – 102, 2001.

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

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A . **Introdução à química de alimentos**. 2^a.ed. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

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

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

BRANDELLI, A.; RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.8,n.1, 2005.

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

BURTT, E.H.Jr.; ICHIDA, J. M. Occurrence of feather-degrading bacilli in the plumage of birds. **The Auk**, Albuquerque, v.116, n.2, p.364-372, 1999.

CHENG, S.; HU, H.; SHEN, S.; TAKAGI, H.; ASANO, M.; TSAI, Y. Production and characterization of keratinase of a feather – degrading *Bacillus licheniformis* PWD – 1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, p. 2239 – 2243, 1995.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 5^a ed. In: cap 2. BRAGA, G. L. UNICAMP. Campinas, 1993.

EL-NAGHY, M.A.; EL-KTATNY, M.S.; FADL-ALLAH, E.M.; NAZEER, W.W. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. **Mycopathologia**. Den Haag, v. 143, p. 77-84, 1998.

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 a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 85 – 93, 2004.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J. P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 127 – 130, 1999.

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.

GOLDSTEIN, G.; FLORY, K.R.; BROWNE, B.A.; MAJID, S.; ICHIDA, J.M.; BURTT, E.H. Bacterial degradation of black and white feathers. **The Auk**, Albuquerque, v.121, n.3, p.656-659, 2004.

GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F.A.; JONG, E. V.; BRANDELLI, A. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, p. 1- 10, 2005.

GUSHTEROVA, A.; TONKOVA, E.; DIMOVA, E.; NEDKOV, P.; HAERTLE, T. Keratinase production by newly isolated Antarctic actinomycete strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 831 – 834, 2005.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Genus *Streptomyces***. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th. Williams e Wilkins.p.675, 1994.

ICHIDA, J.M.; KRIZOVA, L.; LeFEVRE, C. A.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT Jr, E. H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiological Methods**, Delaware, v.47, p.199 – 208, 2001.

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

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, 1999.

KUNERT, J. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. **Mycoses**. Berlin, v.35, p.343 – 348, 1992.

LETOURNEAU, F.; SOUSSOTTE, V.; BRESSOLLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNEUIL, B. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K₁₋₀₂: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 26, p. 77-80, 1998.

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

LIN, X.; INGLIS, G.D.; YANKE, L.J.; CHENG, K.J. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.23, p. 149 – 153, 1999.

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

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265 – 275, 1951.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Bactérias gram-positivas filamentosas, com alto conteúdo de GC: *Streptomyces* e outros actinomicetos. Cap 12. In: **Microbiologia de Brock**. Ed Pearson. 10^a Ed Prentice Hall, p.394 – 398 São Paulo, 2004.

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

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis of *Candida lipolytica*. **Mycologia**, New York, v. 69, p. 646 – 651, 1977.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 150, p. 121 – 125, 2000.

NAM, G.; LEE, D.; LEE, H.; LEE, N.; KIM, B.; CHOE, E.; HWANG, J.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y. Native – feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase – producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, p. 538 – 547, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Estrutura Tridimensional de Proteínas. In: **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3rd ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 2002. p. 132 – 133.

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 fradiae*. **Journal of Bacteriology**, v.77, p. 251 – 263, March, 1959.

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science**, Champaign, v.84, p. 858-864, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

SANTOS, R. M. D. B.; FIRMINO, A. A. P.; SÁ, C. M.; FELIX, C. R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**, New York, v.33, p. 364-370, 1996.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: principles and practice**. 3rd . New York: Springer, 1993.

SHAWKEY, M. D.; PILLAI, S. R.; HILL, G. E. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather – degrading bacteria. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen v. 34, p. 345 – 349, 2003.

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

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

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

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

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

SUNTORNUSUK, W.; TONGJUN, J.; ONNIM, P.; OYAMA, H.; RATANAKANOKCHAI, K.; KUSAMRAN, T.; ODA, K. Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather – degrading bacterium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1111 – 1117, 2005.

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

THYS,R.C.S.; LUCAS,F.S.; RIFFEL,A.; HEEB,P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.39, p. 181-186, 2004.

VIGNARDET, C.; GUILLAUME, Y.C.; MICHEL, L.; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 115 – 122, 2001.

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

WEAST, R. C. **Handbook of Chemistry and Physics**. 70th edition. CRC Press, 1989 – 1990.

WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; McKENZIE, J. M.; SHIH, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a feather – degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1509 – 1515, jun. 1990.

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

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

YOUNG, R.A.; SMITH, R.E. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.21, n.5, p. 583 – 586, 1975.

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

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