

# **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CERRO LARGO**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS**

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA  
PELO ISOLADO BACTERIANO *Bacillus* sp. CL33A**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA**

**CERRO LARGO – RS**

**2015**

**CAROLINE TORRES DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA PELO ISOLADO  
BACTERIANO *Bacillus* sp. CL33A**

Trabalho apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul, como parte das exigências do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, para a obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO - RS

2015

## DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Oliveira, Caroline Torres de  
Caracterização de protease bruta produzida pelo  
isolado bacteriano Bacillus sp. CL33A/ Caroline Torres  
de Oliveira. -- 2015.  
50 f.:il.

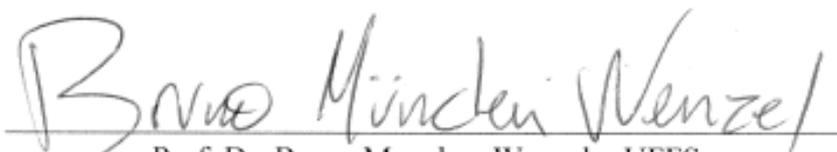
Orientador: Daniel Joner Daroit.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Engenharia Ambiental , Cerro Largo, RS, 2015.

1. Bactéria. 2. Bioconversão. 3. Protease. 4.  
Caracterização de enzimas. I. Daroit, Daniel Joner,  
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.  
Título.

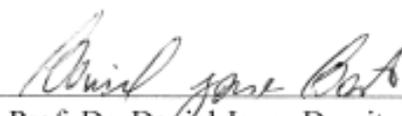
**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA PELO ISOLADO  
BACTERIANO *Bacillus* sp. CL33A**

Trabalho apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul, como parte das exigências do Curso de Graduação em Engenharia Ambiental, para a obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Aprovado em 7 de dezembro de 2015.

  
Prof. Dr. Bruno München Wenzel – UFFS

  
Profª. Dra. Lauren Lúcia Zamin – UFFS

  
Prof. Dr. Daniel Joner Daroit  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor Daniel Joner Daroit pela orientação, apoio, paciência, confiança e compreensão. Obrigada por esses três anos de pesquisa, aprendizado e incentivo.

- Ao colega e amigo Tiago Rieger pelo auxílio inestimável nos trabalhos de laboratório. Obrigada pelas conversas, companheirismo e pela paciência durante as longas horas de trabalho.

- Ao colega Leandro Pellenz pelo auxílio nos trabalhos de iniciação científica.

- Aos professores do Curso de Engenharia Ambiental, principalmente ao Professor Doutor Bruno Munchen Wenzel pelos ensinamentos especialmente nas inesquecíveis disciplinas de reatores e transferência de calor e massa.

- Aos técnicos dos laboratórios, especialmente a Fabiana pelas dicas no início dos trabalhos de pesquisa.

- A FAPERGS e a UFFS pelas bolsas de iniciação científica.

- A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio nos projetos de pesquisa.

- Aos amigos da UFFS pelos momentos de risos e descontração nos intervalos das aulas, pela companhia nos finais de semana de estudos que sempre resultavam em boas conversas e risadas.

- Aos colegas do setor de Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Capão da Canoa. Obrigada pelo companheirismo, ensinamentos e amizade durante todo o período de estágio.

- A minha família, meu alicerce. Obrigada por todo o apoio, carinho e incentivo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	2
2.1 Objetivo geral .....	2
2.2 Objetivos específicos .....	2
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
3.1 Biotecnologia .....	3
3.2 Proteases .....	4
3.3 Proteases microbianas: produção e aplicações .....	5
3.4 Resíduos agroindustriais ricos em queratinas .....	7
3.4.1 Queratinas: aspectos estruturais .....	7
3.4.2 Penas como resíduos e seu manejo .....	8
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
4.1 Microrganismo utilizado .....	11
4.2 Meios de cultura para produção de protease .....	11
4.2.1 Caldo farinha de penas e Caldo pena .....	11
4.2.2 Inoculação e cultivos .....	11
4.3 Ensaio de atividade proteolítica .....	12
4.4 Determinação de proteína solúvel .....	12
4.5 Caracterização da protease produzida em CFP .....	13
4.5.1 Temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática .....	13
4.5.2 Cinética enzimática .....	14
4.5.3 Efeito de reagentes na atividade enzimática .....	14
4.5.4 Estabilidade térmica .....	15
4.5.5 Hidrólise de diferentes substratos .....	15
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	17
5.1 Microrganismo utilizado .....	17
5.2 Meio de cultura mais eficiente para produção de proteases .....	17
5.3 Caracterização da protease bruta produzida em CFP .....	19

5.3.1 Temperatura e pH ótimos da protease bruta.....	19
5.3.2 Cinética Enzimática.....	22
5.3.3 Efeito de sais, reagentes e inibidores sobre a atividade enzimática .....	23
5.3.4 Estabilidade térmica .....	27
5.3.5 Hidrólise de diferentes substratos.....	29
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<i>CFP</i>	caldo farinha de pena
<i>CP</i>	caldo pena
<i>DCCR</i>	delineamento composto central rotacional
<i>DMSO</i>	dimetilsulfóxido
<i>EDTA</i>	ácido etilenodiamino tetracético
<i>FP</i>	farinha de pena
<i>PIS</i>	proteína isolada de soja
<i>PMSF</i>	fenilmetilsulfonil fluoreto
$R^2$	coeficiente de determinação
<i>SDS</i>	dodecil sulfato de sódio
<i>TCA</i>	ácido tricloroacético
<i>TSA</i>	ágar triptona de soja
<i>U</i>	unidade de atividade proteolítica

## RESUMO

Caroline Torres de Oliveira. Caracterização de protease produzida pelo isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL33A.

A crescente preocupação com as questões ambientais tem fomentado a utilização de microrganismos em processos biotecnológicos para a degradação de materiais orgânicos recalcitrantes ricos em proteína, por exemplo, penas de frango e FP, como alternativa para seu manejo e valorização. Entre os produtos de valor agregado estão enzimas proteolíticas, que possuem diversas aplicações comerciais e industriais. Para tanto, esses biocatalisadores devem ser caracterizados quanto aos fatores que podem interferir em sua atividade. Neste contexto, este trabalho visou avaliar a produção de proteases pela bactéria queratinolítica *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos submersos utilizando penas de frango e FP como substratos orgânicos e caracterizar a protease bruta obtida nos cultivos com maior rendimento enzimático. Os resultados obtidos demonstraram que ocorreu maior rendimento em substrato FP. Na caracterização da protease bruta utilizou-se DCCR para determinar as melhores condições de temperatura e pH para atividade da enzima, que foram, respectivamente, 55 °C e pH 8. Nas condições ótimas analisou-se também a velocidade de reação da enzima em diferentes concentrações do substrato azocaseína. Utilizando a equação de Michaelis-Menten, foram obtidos os valores aparentes de  $V_{max}$  (13,39 U mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) e  $K_m$  (0,515 mg mL<sup>-1</sup>). Posteriormente foi avaliada a influência de reagentes sobre a atividade enzimática. A presença de 5 mmol L<sup>-1</sup> dos sais CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> e ZnCl<sub>2</sub> e dos inibidores de protease PMSF, EDTA e 1,10-fenantrolina diminuíram a atividade da protease bruta. O sal MgCl<sub>2</sub> (1 e 5 mmol L<sup>-1</sup>) provocou aumento da atividade e, similarmente, os reagentes etanol, Triton X-100, Tween 20 e DMSO, tenderam a estimular a atividade enzimática. Já SDS e β-mercaptoetanol apresentaram efeito negativo sobre a atividade catalítica. Na avaliação da estabilidade térmica da protease bruta, em temperaturas de 50 a 60 °C, maior inativação foi observada com o aumento da temperatura. A atuação da protease bruta sobre substratos proteicos indicou maior hidrólise dos substratos PIS, caseína e FP.

**Palavras-Chave:** Bioconversão, atividade proteolítica, hidrólise enzimática, farinha de pena.

## ABSTRACT

Caroline Torres de Oliveira. Characterization of the protease produced by the bacterial isolate *Bacillus* sp. CL33A.

The growing concern with environmental issues has fostered the use of microorganisms in biotechnological processes for degrading recalcitrant protein-rich organic materials, such as chicken feathers and feather meal, as an alternative for its management and valorization. Among the value-added products are proteolytic enzymes, which have various commercial and industrial applications. For this purpose, such biocatalysts should be characterized regarding the that may interfere with enzyme activity. In this context, this study aimed to evaluate protease production by the keratinolytic bacterium *Bacillus* sp. CL33A during submerged cultivation using feathers and FP as organic substrates, and to characterize the crude protease obtained in cultivations showing higher enzyme yields. Results showed that higher yields occurred using FP as growth substrate. For crude protease characterization, a DCCR approach was utilized to determine the best temperature and pH conditions for enzyme activity, which were, respectively 55 °C and pH 8. At these optimal conditions, the rate of enzyme activity was analyzed using different concentrations of azocasein substrate. Through the Michaelis-Menten equation, the apparent values for  $V_{\max}$  (13,39 U mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) and  $K_m$  (0,515 mg mL<sup>-1</sup>) were obtained. Subsequently, the influence of reagents towards the enzyme activity was evaluated. The presence of 5 mmol L<sup>-1</sup> of the salts CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, and the protease inhibitors PMSF, EDTA and 1,10-phenanthroline decreased the protease activity. The MgCl<sub>2</sub> salt (1 and 5 mmol L<sup>-1</sup>) increased enzyme activity and, similarly, the reagents ethanol, Triton X-100, Tween 20 and DMSO tended to stimulate the enzyme activity. SDS and β-mercaptoethanol resulted in negative effects on enzyme catalysis. In the evaluation of crude protease thermal stability, at 50 to 60 °C, higher inactivation occurred with increasing temperatures. The performance of the crude protease on protein substrates indicated higher hydrolysis of the substrates PIS, casein and FP.

**Keywords:** Bioconversion, proteolytic activity, enzymatic hydrolysis, feather meal.

## 1. INTRODUÇÃO

Enzimas são naturalmente produzidas por todos os organismos, mas além da função biológica, elas podem ter inúmeras outras aplicações. Novos processos biotecnológicos baseados na utilização de enzimas vêm sendo desenvolvidos, incluindo a possibilidade de aplicação desses catalisadores biológicos em substituição a reagentes químicos em determinados setores industriais, bem como no aumento da eficiência de processos e geração de produtos. Além destes fatores, a crescente preocupação mundial com as questões ambientais demanda a utilização de tecnologias mais limpas e, conseqüentemente, tais abordagens biotecnológicas surgem como alternativas promissoras.

As fontes de enzimas podem variar, sendo possível obtê-las a partir de vegetais, animais, bem como a partir de microrganismos. Dentre as enzimas microbianas, as proteases são bastante estudadas, e suas aplicações variam desde a indústria alimentícia, a indústria de detergentes, além de aplicações em processos de depilação de couro e de bioconversão de resíduos.

A produção de enzimas por microrganismos é um processo relativamente simples, que não exige grandes áreas e também não depende totalmente de condições climáticas. Cultivos submersos são formas interessantes e práticas para produção de proteases microbianas, sendo necessários, basicamente, o microrganismo produtor da enzima de interesse, condições adequadas, e um ou mais substratos como fonte de carbono, nitrogênio e energia para o desenvolvimento microbiano.

Nesse sentido, a utilização de resíduos orgânicos provenientes de agroindústrias como substratos é uma alternativa interessante, tanto como estratégia ambiental para o manejo dos resíduos, quanto por representarem substratos abundantes para a obtenção de produtos com potencial comercial. Particularmente, penas e farinha de penas são materiais recalcitrantes produzidos como resíduos e/ou subprodutos da indústria avícola, apresentando baixo custo e, no caso da farinha de penas, baixo valor nutricional para utilização em rações. Assim, o presente trabalho abordou a produção de proteases microbianas utilizando estes substratos queratinosos e a caracterização das condições de atuação da protease bruta produzida durante os cultivos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de proteases pelo isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos submersos utilizando substratos queratinosos, além da caracterização da protease bruta produzida nos cultivos com maior rendimento.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar a produção de proteases utilizando penas de frango e farinha de penas como substrato e determinar o melhor substrato para a produção de proteases;
- Avaliar a temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática;
- Determinar as constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$  utilizando o substrato azocaseína;
- Averiguar o efeito de sais, reagentes e inibidores sobre a atividade enzimática;
- Determinar a estabilidade térmica da protease bruta;
- Investigar a atuação da protease na hidrólise de diferentes substratos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Biotecnologia

A biotecnologia caracteriza-se como um conjunto de técnicas que utiliza seres vivos, suas células ou suas moléculas, para o desenvolvimento de produtos, processos e serviços (TORRES *et al.*, 2000; FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011). Os processos biotecnológicos vêm sendo aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento, como na agroindústria e meio ambiente. Como os setores produtivos passaram a relacionar a melhoria na produção com processos mais limpos e menor geração de resíduos (ANDRADE; MARINHO; KIPERSTOK, 2001), percebe-se uma ampla aplicabilidade industrial de processos biotecnológicos (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Abordagens biotecnológicas têm sido avaliadas pelo setor industrial como tecnologias-chave que fornecem novas oportunidades para a produção sustentável (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). As indústrias vêm utilizando células vivas e/ou suas enzimas no desenvolvimento de processos para obtenção de produtos químicos, materiais e combustíveis, e tem despertado grande interesse pelo fato de estes processos estarem associados a um consumo reduzido de energia, menor emissão de gases de efeito estufa e diminuição na geração de resíduos (TANG; ZHAO, 2009).

Uma fonte interessante para obtenção de produtos biotecnológicos são os microrganismos uma vez que a diversidade genética e metabólica desses favorece este objetivo (FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011). Conhecimentos sobre a diversidade microbiana auxiliam na compreensão das funções exercidas por essas comunidades nos ambientes terrestres e suas interações com outros componentes. Microrganismos passíveis de utilização em processos biotecnológicos vêm sendo descobertos, o que pode resultar em benefícios econômicos e estratégicos como novos produtos químicos, antibióticos, aplicação em biolixiviação e recuperação de minérios, produção de enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, além de biorremediação de poluentes (CANHOS; MANFIO, 2001).

Na área ambiental, a biotecnologia se faz presente nos processos de decomposição de materiais ou substâncias químicas pela ação dos seres vivos, principalmente quando se trata

da biodegradação pela ação de microrganismos (FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011). Por exemplo, esta estratégia tem sido considerada uma alternativa no tratamento de efluentes têxteis pela existência de microrganismos com potencial para degradar substâncias recalcitrantes (KAMIDA *et al.*, 2005), e também no tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola entre outras aplicações biotecnológicas (ONIFADE *et al.*, 1998).

Tais tecnologias são ambientalmente vantajosas por eliminar certos contaminantes de origem orgânica como fezes, detergentes, penas, hidrocarbonetos de petróleo, entre outros, através da destruição permanente dos resíduos, a mineralização, eliminando os riscos de futuras contaminações (PEDROZO *et al.*, 2002). Assim, microrganismos e/ou suas enzimas podem ser aplicados na recuperação de áreas contaminadas e na degradação de compostos poluentes. Esse processo pode ser influenciado por uma série de fatores que interferem na ação microbiana, dentre eles a presença de metais pesados no contaminante e pH inadequado do meio (FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011).

Incluída nas novas tecnologias para a obtenção de produtos de elevado valor agregado, a biocatálise é um dos campos mais promissores (CARVALHO *et al.*, 2005). É frequente a descoberta de enzimas que se adéquam à utilização em processos industriais, e para isso tem-se a necessidade de projetar e otimizar o desempenho da enzima no que se refere à sua atividade, seletividade, termoestabilidade, tolerância a solventes orgânicos e inibição de substrato/produto, para que o processo enzimático torne-se comercialmente viável (LUETZ; GIVER; LALONDE, 2008). Sendo assim, um maior incentivo à aplicação tecnológica desse tipo de enzima pode trazer inúmeros benefícios econômicos, ambientais e industriais além de aumentar a representatividade comercial e econômica brasileira no cenário internacional (BON; GÍRIO; PEREIRA JÚNIOR, 2008). Dentre as enzimas utilizadas podem ser citadas amilases, celulases, lipases, e proteases (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

### **3.2 Proteases**

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, compondo um grupo complexo de biocatalisadores cujas características físico-químicas e catalíticas podem apresentar variações. Esse grupo enzimático participa de processos metabólicos essenciais, realizando modificações extremamente específicas e seletivas em proteínas (RAO *et al.*, 1998). As enzimas proteolíticas podem ser encontradas

nos mais diversos organismos incluindo plantas, animais e microrganismos já que proteases são fisiologicamente necessárias (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002)

A classificação das proteases fundamenta-se basicamente em três critérios. O primeiro é referente ao tipo de reação catalisada, o segundo está relacionado a natureza química e mecanismo do sítio catalítico e o terceiro contempla a relação evolutiva referente à sequência de aminoácidos. De acordo com o primeiro critério, as enzimas proteolíticas podem ser subdivididas em dois grupos principais: exopeptidases, caracterizadas pela clivagem de ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato; e as endopeptidases, que clivam ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia polipeptídica, distantes das porções terminais das proteínas. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos com base no seu mecanismo catalítico: serino-proteases, aspártico-proteases, cisteíno-proteases e metaloproteases. As proteases também podem ser classificadas, de acordo com o pH de atividade máxima, em ácidas, neutras ou alcalinas e conforme o substrato que degradam em elastase, queratinase, colagenase entre outras (RAO *et al.*, 1998; ELLAIAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2002; SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

### **3.3 Proteases microbianas: produção e aplicações**

A seleção de microrganismos, plantas ou células animais são métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (DEMIRJIAN; SHAH; MORÍS-VARAS, 1999). Microrganismos estão presentes nos mais diversos ambientes e, diante disso podem ser considerados recursos interessantes para o desenvolvimento de produtos e processos sustentáveis (SINGH, 2010). A elevada diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas, além do número de microrganismos na natureza que podem ser testados são virtualmente ilimitados e bastante diferentes entre si (CARVALHO *et al.*, 2005).

Assim, a obtenção de proteases microbianas tem se mostrado mais eficiente em relação à obtenção de enzimas de origem animal e vegetal, além disso o cultivo de microrganismos requer menor tempo, espaço reduzido e proporciona uma produção regular e abundante do produto desejado, sem impedimentos sazonais (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Segundo Sanchez e Demain (2011), 85% das enzimas utilizadas

comercialmente são obtidas a partir de microrganismos, e por serem facilmente produzidas em larga escala são de grande interesse industrial (HAKI e RAKSHIT, 2003).

A produção de enzimas microbianas é realizada principalmente em cultivos submersos já que esta técnica permite um controle maior dos parâmetros operacionais do sistema (BON; GÍRIO; PEREIRA JÚNIOR, 2008). Esta produção envolve custos, principalmente no que se refere à matéria-prima (substrato) para a produção, um dos componentes mais importantes e que representa de 30-40% dos gastos (JOO; CHANG, 2005; BON; GÍRIO; PEREIRA JÚNIOR, 2008). A adição de componentes alternativos ao meio de cultivo mostra-se interessante, representando uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos de agroindústrias (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000). Portanto, considerando a abundância destes resíduos e seu baixo custo, bem como a diversidade biológica de organismos produtores de enzimas, observa-se um grande potencial para produção desses biocatalisadores com aplicação industrial (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

Proteases de origem microbiana podem ser intracelulares ou extracelulares. As intracelulares são de grande importância em vários processos metabólicos e celulares, pois exercem papel vital na regulação do metabolismo; já as extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores no meio externo e permitem a absorção dos nutrientes pelos microrganismos (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). No setor industrial, proteases microbianas extracelulares têm recebido atenção especial, exatamente devido às amplas possibilidades de aplicação (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011), na produção de detergentes, alimentos, na indústria do couro, entre outras (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; NIELSEN; OXENBOLL, 1998). Ainda, proteases bacterianas podem apresentar um tempo de prateleira mais prolongado, podendo ficar estocadas em condições inferiores às normais por semanas mantendo sua atividade (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Tendo em vista o desenvolvimento de tecnologias ambientais, as proteases podem ser utilizadas na depilação do couro com o intuito de minimizar os problemas ambientais resultantes da utilização de produtos químicos (DAYANANDAN *et al.*, 2003). Nas etapas de tratamento do couro o processo de depilação normalmente envolve a adição de produtos que tornam os resíduos de curtume um dos grandes responsáveis pela poluição, além de causar riscos à saúde dos trabalhadores dessa área (THANIKAIVELAN *et al.*, 2004). Com o intuito de diminuir esses riscos bem como os impactos ambientais existem estudos para aplicação de um processo biotecnológico na etapa da depilação utilizando enzimas (DAYANANDAN *et*

*al.*, 2003). Além disso, existem aplicações para proteases na indústria de detergentes, pois essas enzimas são um dos ingredientes que podem ser adicionados a estes produtos, desde os utilizados para lavagens de uso doméstico até os usados na limpeza de lentes de contato. No caso de detergentes para roupas, a utilização de proteases corresponde a aproximadamente 25 % do total de vendas mundiais de enzimas (RAO *et al.*, 1998).

Dentre as classes particulares de enzimas proteolíticas, classificadas de acordo com o substrato que degradam, encontram-se as queratinases, que são geralmente serino ou metaloproteases com potencial de degradação de proteínas denominadas queratinas (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). Estas enzimas podem ser produzidas tanto por fungos quanto bactérias e são enquadradas no grupo das endopeptidases (KAUL; SUMBALI, 1997; RIFFEL; BRANDELLI, 2006). Visando a aplicação biotecnológica, microrganismos queratinolíticos e suas proteases têm sido investigados quanto ao seu potencial industrial em processos no setor de couros, produção de rações, degradação e aproveitamento de resíduos da indústria avícola, entre outras (ONIFADE *et al.*, 1998). Os microrganismos produtores de queratinases podem ser obtidos a partir de diferentes locais, inclusive a partir de amostras de solo, e testados quanto à capacidade de utilização da queratina como substrato (GUPTA; RAMNANI, 2006). De fato, tem-se encontrado uma diversidade de microrganismos capazes de produzir proteases queratinolíticas e, conseqüentemente, capazes de degradar resíduos queratinosos para o crescimento microbiano (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

Proteases alcalinas estão entre aquelas de maior importância comercial devido, principalmente, à alta capacidade de produção e atividade catalítica (JISHA *et al.*, 2013). No entanto, outras proteases microbianas também podem ser aplicadas em diversos processos e, neste sentido, a caracterização da atividade enzimática é fundamental para propor potenciais aplicações.

### **3.4 Resíduos agroindustriais ricos em queratinas**

#### **3.4.1 Queratinas: aspectos estruturais**

As proteínas são de grande importância nos processos biológicos e indispensáveis aos seres vivos (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008). Dentre os tipos de proteínas têm-se as

queratinas, que possuem característica fibrosa e insolúvel, sendo encontrada principalmente em peles, pelos, unhas, cascos, escamas e penas, e tem como função principal dar estrutura e proteger os organismos. Devido ao forte empacotamento da cadeia de proteína em  $\alpha$ -hélice ou estrutura  $\beta$ -pregueada, uma cadeia polipeptídica superenrolada, a queratina é caracterizada pela estabilidade mecânica e resistência à digestão proteolítica. A presença de cisteína na estrutura das queratinas possibilita a formação de pontes dissulfeto que, por sua vez, conferem um alto índice de ligações intercadeias a esse tipo de proteína. Além disso, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio colaboram para a força, estabilidade e resistência proteolítica da queratina (ONIFADE *et al.*, 1998; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

As queratinas onde predominam formações em  $\alpha$ -hélice são denominadas  $\alpha$ -queratinas, já aquelas que possuem estruturas secundárias em  $\beta$ -folha são as chamadas  $\beta$ -queratinas. Considerando-se as propriedades físico-químicas dessas proteínas as mesmas podem ser subdivididas em “leves” ou “rígidas”. As “leves” são compostas por aminoácidos como glicina, alanina e serina, com cadeias laterais pequenas, e contém baixa quantidade de cisteína; queratinas “rígidas” ao contrário das leves são compostas por grandes quantidades de cisteína, e são formadas por muitas ligações dissulfeto e contém a maioria dos aminoácidos na sua composição. As  $\alpha$ -queratinas “rígidas” estão presentes em maior quantidade nos cabelos e lãs, as  $\alpha$ -queratinas “leves” na epiderme, enquanto que as  $\beta$ -queratinas são encontradas em quantidades mais significantes nas penas (ONIFADE *et al.*, 1998; ROUSE; VAN DYKE, 2010; DAROIT; BRANDELLI, 2014), sendo mais comum a ocorrência de hidrólise microbiana da  $\beta$ -queratina em relação à  $\alpha$ -queratina, devido à estrutura menos compacta da primeira e menor quantidade de pontes dissulfeto (BRANDELLI, 2005; PILLAI; ARCHANA, 2008).

### **3.4.2 Penas como resíduos e seu manejo**

A economia brasileira é baseada nas atividades agroindustriais (UENOJO; PASTORE, 2007) e, como há produção significativa nesse setor, também são geradas grandes quantidades de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), sendo necessário buscar alternativas para tornar mais interessante e eficiente sua utilização. Nesse sentido a inovação biotecnológica na área da fermentação e tecnologia de enzimas trazem novas perspectivas (BRAND *et al.*, 2000).

As penas de aves são constituídas por 90 % ou mais de queratina (SANGALI; BRANDELLI, 2000) e devido à grande produção mundial de frangos pode ocorrer o acúmulo desses resíduos queratinosos. No ano de 2014 foram produzidos a nível mundial em torno de 86,3 milhões de toneladas de frangos (USDA, 2015). Considerando que as penas representam entre 5 % e 10 % do peso dessas aves (BRANDELLI, 2008), a geração de penas como resíduo do seu processamento chegou a aproximadamente 4,3-8,6 milhões de toneladas. No Brasil a produção de frangos no ano de 2014 foi de cerca de 12,5 milhões de toneladas, chegando a 1,6 milhões de frangos apenas no estado do Rio Grande do Sul (RS) (IBGE, 2015) o que significa que foram geradas em torno de 80-160 mil toneladas de penas somente no RS.

Pelo fato das penas serem resíduos abundantes e de difícil degradação devido à sua composição, observa-se a importância do desenvolvimento de métodos alternativos, eficientes e economicamente viáveis, para disposição e manejo desses resíduos queratinosos, o que poderia reduzir significativamente problemas ambientais e até mesmo de saúde pública (VASILEVA-TONKOVA; GOUSTEROVA; NESHEV, 2009).

Os resíduos de penas geralmente são incinerados, porém tal processo envolve alto custo além de resultar em elevadas emissões de  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{S}$ , e desperdício de energia (MARCONDES *et al.*, 2008; MATSUI *et al.*, 2009). Ainda, o acúmulo desses resíduos queratinosos acaba dificultando o processo de degradação e quando esse processo ocorre de forma anaeróbia formam-se substâncias tóxicas como  $\text{NH}_3$  e  $\text{H}_2\text{S}$  (SINGH, 2002).

Outra utilização convencional desse resíduo é a conversão em farinha de penas. Nesse sentido normalmente os subprodutos rejeitados em abatedouros são enviados as indústrias de processamento de subprodutos frigoríficos ou fábrica de farinha e óleo de origem animal onde os resíduos de aves como penas, vísceras, cabeças, pés, sangue, entre outros são processados (PICCHI, 1994). O processamento das penas por cocção sob alta pressão e moagem provoca a destruição de aminoácidos essenciais, e o produto obtido é de baixa digestibilidade e baixa qualidade nutricional, limitando a sua utilização como ingrediente em rações animais (ONIFADE *et al.*, 1998; KARTHIKEYAN; BALAJI; SEHGAL, 2007).

Contudo, microrganismos são capazes de crescer diretamente em função de uma única fonte complexa de carbono e energia, atuando na degradação deste material (PEDROZO *et al.*, 2002). Geralmente, o tipo de material presente no meio de cultura pode induzir a produção de enzimas específicas. Assim, uma potencial aplicação dos resíduos pode ser a utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de

maior valor agregado, como enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2000).

Assim, investigações têm focado na biodegradação das penas e obtenção de produtos úteis, como proteases microbianas (BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). Embora a farinha de penas seja produto de uso limitado em rações, seu processo de produção provoca a desnaturação da queratina através do tratamento térmico, diminuindo a resistência da mesma ao ataque microbiano. Tendo em vista que a produção de proteases microbianas usando farinha de pena como substrato em meios de cultura vem sendo descrita, tem-se uma possibilidade de aplicação da farinha de penas como substrato na produção biotecnológica de proteases (DAROIT; BRANDELLI, 2014).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo utilizado

No presente estudo utilizou-se a bactéria CL33A, isolada a partir de amostras de pena de galinha em decomposição (PELLENZ; MEDEIROS; DAROIT, 2013). Esta bactéria demonstrou potencial para degradação de resíduos queratinosos conforme investigação prévia (OLIVEIRA; DAROIT, 2015). O isolado CL33A foi identificado no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como sendo representante do gênero *Bacillus*, sendo então denominado *Bacillus* sp. CL33A. Durante os estudos o isolado foi periodicamente repicado em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) e mantido sob refrigeração.

### 4.2 Meios de cultura para produção de protease

#### 4.2.1 Caldo farinha de penas e Caldo pena

O meio de cultura Caldo Farinha de Pena (CFP) foi composto por meio mineral (0,3 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g L<sup>-1</sup> NaCl) e o substrato orgânico farinha de penas (FP; 10 g L<sup>-1</sup>), enquanto que o meio Caldo Pena (CP) foi composto por meio mineral e o substrato orgânico pena (10 g L<sup>-1</sup>). Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de CFP ou CP, o pH inicial foi ajustado para 7,0 utilizando NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) e, em seguida, os meios foram esterilizados em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 15 min).

#### 4.2.2 Inoculação e cultivos

Para inoculação dos meios foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina estéril (8,5 g L<sup>-1</sup> NaCl) com aproximadamente 1,0 unidade de absorvância mensurada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm. Cada meio de cultura foi inoculado com 1 mL da suspensão. Os meios inoculados foram incubados em estufa com agitação

orbital (*shaker*; 30 °C, 125 rpm) por até 11 dias. Amostras foram retiradas a cada 24 horas, centrifugadas (10.000 g por 5 min), e o sobrenadante (protease bruta) utilizado para avaliação da atividade proteolítica.

### **4.3 Ensaio de atividade proteolítica**

Sobrenadantes dos cultivos em CFP e CP foram avaliados quanto à produção de proteases em função do tempo de cultivo. Nos ensaios foram utilizados 100 µL de tampão Tris-HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 8,0), 300 µL do substrato enzimático azocaseína (1 %, m v<sup>-1</sup>) e 100 µL do sobrenadante do cultivo convenientemente diluído em tampão Tris-HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>; pH 8,0). Esta mistura foi incubada a 40 °C durante 15 minutos e, ao fim do período de incubação, a reação foi interrompida através da adição de 600 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA; 10 %, m v<sup>-1</sup>). Esse meio reacional foi centrifugado (10.000 g por 5 min), foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionados a 200 µL de NaOH (1,8 N). A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Cada ensaio foi realizado em duplicata mais um controle no qual o TCA foi adicionado antes do sobrenadante para impedir a ocorrência da reação enzimática. Os resultados foram convertidos em unidade de atividade proteolítica (U) por mL, definida como a quantidade de enzima que provocou aumento de 0,1 unidades de absorbância.

### **4.4 Determinação de proteína solúvel**

Foi determinada a concentração de proteína solúvel pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951). Para tanto foram utilizados dois reagentes (A e B). O reagente A foi preparado com 50 mL de solução de NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 g L<sup>-1</sup>) e 1 mL de solução de sulfato de cobre (5 g L<sup>-1</sup>) e tartarato de sódio e potássio (10 g L<sup>-1</sup>). No preparo do reagente B foi utilizado reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de 1:1.

No ensaio foram utilizados 2,5 mL do reagente A e 100 µL de sobrenadante convenientemente diluído em água destilada. Esta mistura foi incubada por 10 min no escuro e, após, 300 µL do reagente B foram adicionados. A mistura foi mantida em local escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi mensurada a absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 750 nm. Os dados de absorbância foram

interpretados utilizando curva padrão de albumina sérica bovina. Estes resultados de proteína solúvel foram utilizados para os cálculos da cinética da enzimática.

#### 4.5 Caracterização da protease produzida em CFP

A protease bruta foi obtida a partir do sobrenadante centrifugado (10.000 g por 5 min) dos cultivos de *Bacillus* sp. CL33A em CFP, realizados por 3 dias (30 °C, 125 rpm).

##### 4.5.1 Temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática

Para determinação das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>. Foram feitas quatro repetições para o ponto central (0 e 0) do experimento, estabelecendo-se dois níveis para cada variável (lineares; +1 e -1), e ainda pontos axiais para cada variável (quadráticos; +1,41 e -1,41). As combinações utilizadas e os valores codificados e reais das variáveis independentes pH e temperatura estão apresentados na Tabela 1 para os doze experimentos.

**Tabela 1:** Combinações e valores reais e codificados para o DCCR 2<sup>2</sup> utilizados na determinação das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática.

Ensaio	T (cod)	T (°C)	pH (cod)	pH real
1	1	65,6	1	9,4
2	1	65,6	-1	6,6
3	-1	44,4	-1	6,6
4	-1	44,4	1	9,4
5	1,41	70,0	0	8,0
6	-1,41	40,0	0	8,0
7	0	55,0	1,41	10,0
8	0	55,0	-1,41	6,0
9	0	55,0	0	8,0
10	0	55,0	0	8,0
11	0	55,0	0	8,0
12	0	55,0	0	8,0

A variável dependente estudada foi a atividade proteolítica ( $\text{U mL}^{-1}$ ). Utilizou-se o *software* Statistica 5.0 para análise dos resultados e obteve-se coeficientes de regressão ( $p < 0,05$ ) que foram empregados na obtenção de um modelo matemático para explicação dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade da enzima. Avaliou-se o ajuste do modelo através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e análise de variância (ANOVA). Considerando os graus de liberdade (5 para os ensaios; e 6 para o erro + falta de ajuste) as variâncias das regressões dos experimentos foram comparadas com a variação dos erros experimentais. Então, em caso de significância do modelo, foi gerada superfície de contorno.

#### **4.5.2 Cinética enzimática**

Foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de substrato enzimático azocaseína sobre a atividade enzimática ( $0,06\text{-}6,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em temperatura e pH ótimos. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$  aparentes para a protease bruta através de regressão não linear fazendo uso da equação de Michaelis-Menten e do *software* Statistica 5.0.

#### **4.5.3 Efeito de reagentes na atividade enzimática**

Foram avaliados os efeitos de alguns sais, reagentes e inibidores sobre a atividade da protease bruta em condições ótimas de pH e temperatura utilizando o substrato azocaseína. Os sais avaliados foram  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  nas concentrações de 1 e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Também foram testados os reagentes etanol (0,5% e 1,0%,  $\text{v v}^{-1}$ ), Triton X-100 (0,5 % e 1,0 %,  $\text{v v}^{-1}$ ), Tween 20 (0,5% e 1,0%,  $\text{v v}^{-1}$ ), dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,05 % e 0,10 %,  $\text{m v}^{-1}$ ), dimetilsulfóxido (DMSO; 0,5% e 1,0%,  $\text{v v}^{-1}$ ) e  $\beta$ -mercaptoetanol (0,1 %, 0,5 % e 1,0 %,  $\text{v v}^{-1}$ ). Os ensaios foram realizados em duplicata e foram confeccionados controles adequados com a substância a ser testada e adição de TCA antes da protease bruta.

Nas concentrações de 1 e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  também foram avaliados os inibidores de protease ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), 1-10 fenantrolina e fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF). Porém, no caso dos inibidores, a protease bruta foi pré-incubada durante 20 minutos na ausência de substrato e presença do inibidor. Em seguida foi verificada a atividade

proteolítica com substrato azocaseína. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Resultados desses ensaios foram apresentados na forma de atividade relativa/residual (%), considerando-se o controle (sem adição da substância testada) como 100 %.

#### **4.5.4 Estabilidade térmica**

Avaliou-se a estabilidade térmica da protease bruta pela pré-incubação da enzima (em tampão Tris-HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0) nas temperaturas de 50 a 60 °C em diferentes intervalos de tempo:

- 50 °C (0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos);
- 52,5 °C (0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos);
- 55 °C (0, 4, 8, 12, 16 e 20 minutos);
- 57,5 °C (0, 3, 6, 9, 12 e 15 minutos);
- 60 °C (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 minutos).

A pré-incubação nas respectivas temperaturas foi realizada em banho-maria. Após o período estipulado, microtubos com a protease bruta foram retirados do banho-maria e conduzidos ao banho de gelo com intuito de parar o processo de inativação térmica. Em seguida foi realizado o ensaio enzimático nas condições ótimas com a protease pré-incubada. Os ensaios foram feitos em duplicata e considerou-se a atividade enzimática no tempo zero como 100%, sendo que os demais resultados foram apresentados como atividade residual (%).

#### **4.5.5 Hidrólise de diferentes substratos**

O desempenho da protease bruta produzida pelo isolado *Bacillus* sp. CL33A em CFP foi avaliado na hidrólise de diferentes substratos orgânicos. Utilizou-se nessa avaliação a farinha de penas, cabelos, penas, proteína isolada de soja (PIS) e caseína, na concentração de 10 g L<sup>-1</sup>. Os frascos contendo 25 mL da solução de substrato foram pré-incubados a 50 °C por 10 min em banho-maria com agitação recíproca, no intuito de estabilizar a temperatura do meio. Em seguida, adicionou-se 500 µL da protease bruta nos frascos e a incubação ocorreu a 50 °C sob agitação, por até 4 horas.

Foram coletadas amostras de 500 µL nos tempos de incubação 0, 1, 2, 3 e 4 horas e

adicionados 500  $\mu\text{L}$  de TCA (10%,  $\text{m v}^{-1}$ ) para finalizar a reação. Em seguida, a mistura foi centrifugada (10.000  $g$  por 5 min) e o sobrenadante convenientemente diluído em água destilada, realizando-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 280 nm. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em unidades de absorvância.

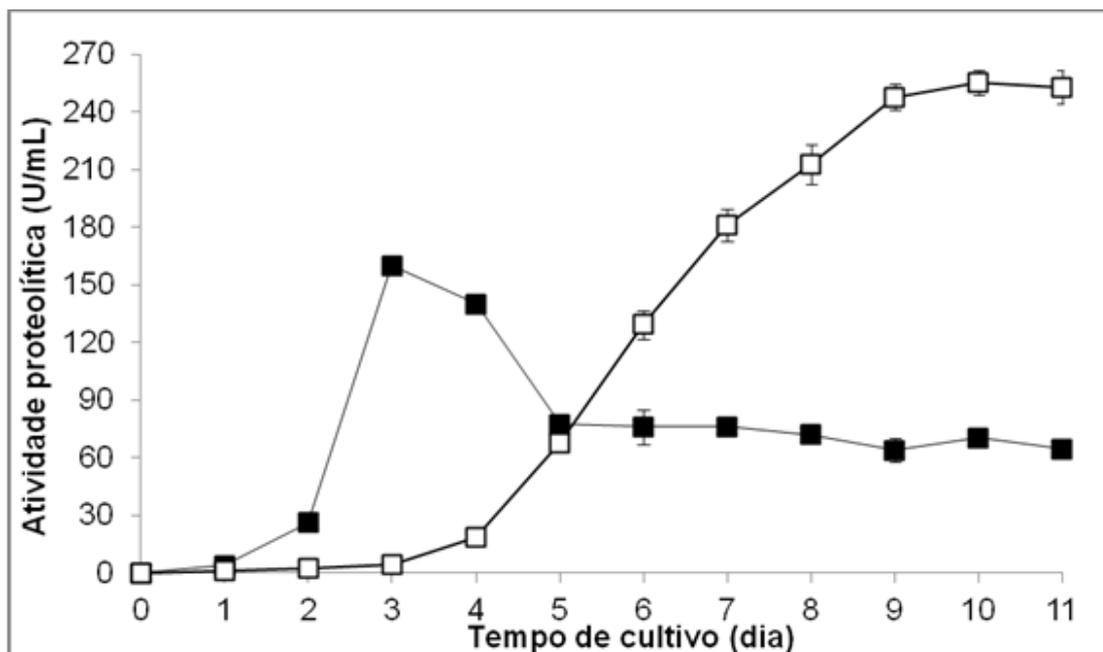
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Microrganismo utilizado

O isolado *Bacillus* sp. CL33A foi obtido a partir de uma composteira e mostrou-se capaz de produzir proteases extracelulares em Ágar Leite. Nos testes realizados em ágar farinha de penas (AFP) o isolado apresentou capacidade de desenvolvimento em uma faixa de pH de 6-10 e em temperaturas de 30-45 °C (PELLENZ, MEDEIROS; DAROIT, 2014). Foi avaliado também o potencial de degradação de penas por este microrganismo em cultivos submersos, observando-se solubilização de 95% da massa seca das penas após 216 h (OLIVEIRA; DAROIT, 2015). Diante dos resultados obtidos nesses estudos anteriores é interessante uma avaliação mais aprofundada no que se refere às características das enzimas produzidas.

### 5.2 Meio de cultura mais eficiente para produção de proteases

Foram testados os substratos FP e pena para produção de proteases em cultivos submersos, sendo que o substrato FP mostrou-se mais eficiente. Conforme apresentado na Figura 1, a atividade proteolítica máxima foi atingida já no terceiro dia de cultivo em CFP; já no CP foram necessários em torno de 8-10 dias de cultivo. Embora a atividade proteolítica máxima em CP tenha sido maior quando comparada ao observado em CFP, optou-se pela produção de proteases em menor tempo de cultivo. Comparando a produção de proteases em ambos os meios, enquanto que no meio CP o rendimento aos 8 dias de cultivo foi de 31 U mL<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, o rendimento no meio CFP aos 3 dias de cultivo foi de 53 U mL<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>. Logo, o meio CFP foi escolhido como mais adequado para a produção de proteases.



**Figura 1:** Produção de proteases pelo isolado CL33A em CP (□) e CFP (■).

A produção mais acelerada de protease em CFP justifica-se pelo fato desse substrato possuir uma menor resistência, já que o tratamento térmico ao qual foi submetido é capaz de desnaturar a queratina que o compõe (BRANDELLI; RIFFEL, 2005), tornando o mesmo mais acessível e homogêneo se comparado com as penas inteiras (CORRÊA, 2009). A farinha de penas vem sendo utilizada como substrato para produção de proteases microbianas (CASARIN; CLADERA; BRANDELLI, 2008; KHARDENAVIS; KAPLEY; PUROHIT, 2009). Em estudos similares com *Bacillus sp.* P7 (CORRÊA, 2009) e *Bacillus sp.* P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009), também optou-se pela utilização de farinha de pena como melhor substrato para produção de enzimas proteolíticas. Portanto, a conversão microbiana da farinha de penas, um substrato queratinoso abundante e de baixo custo, representa, ao mesmo tempo, uma forma de manejo ecologicamente adequada e uma estratégia de agregação de valor a este substrato através da obtenção de proteases microbianas com potencial aplicação industrial (GUPTA; RAMNANI, 2006; BRANDELLI, 2008).

## 5.3 Caracterização da protease bruta produzida em CFP

### 5.3.1 Temperatura e pH ótimos da protease bruta

Processos enzimáticos envolvem uma série de fatores e, nesse sentido, a temperatura pode ser uma variável crítica causando um decréscimo na atividade enzimática por inativar a enzima (ILLANES; WILSON; TOMASELLO, 2000). Além disso, o pH do meio reacional também pode causar variações na atividade enzimática. Considerando que existe uma faixa de pH que resulta em atividade máxima, valores fora dessa faixa podem provocar mudanças na conformação da enzima e na capacidade de ligação com o substrato, na atividade de grupos que compõe o sítio catalítico. Tais variações podem influenciar na velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ ), na estabilidade da enzima, e na afinidade da mesma pelo substrato ( $K_m$ ) (WISEMAN, 1991).

Portanto o controle dos parâmetros temperatura e pH é de grande importância na produção de hidrolisados protéicos a partir de proteases microbianas (SURÓWKA *et al.*, 2004), bem como para aplicação em outros processos como os da indústria de detergentes que exige enzimas ativas e estáveis em temperatura e valores de pH elevados, na indústria do couro que necessita de enzimas ativas em pH alcalino, e na indústria alimentícia que, dependendo da aplicação, pode exigir temperaturas mais elevadas e valores de pH variados (RAO *et al.*, 1998). Sendo assim, é interessante o planejamento de experimentos para avaliar os efeitos das variáveis e suas interações no desempenho do processo. Ainda, se comparada com as abordagens tradicionais, que geralmente modificam variáveis por tentativa, as técnicas de planejamento resultam em um número menor de experimentos para obtenção dos resultados necessários (MYERS; MONTGOMERY, 2002). Diante disso, a determinação da temperatura e pH ótimos para a atividade da protease bruta foi realizada através de um DCCR  $2^2$ , totalizando um conjunto de 12 experimentos cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Com base nos dados obtidos foi possível observar variações significativas nos resultados, indicando uma atividade enzimática máxima nos pontos centrais do experimento (55 °C e pH 8; Tabela 2). Quanto ao efeito das variáveis, temperatura e pH lineares (-1 a +1) resultaram em efeitos positivos, indicando que o aumento da temperatura de 44,4 °C para 65,6 °C foram aparentemente benéficos para a atividade enzimática. Já os efeitos quadráticos foram negativos, indicando que temperaturas de 30 °C e 70 °C, e valores de pH 6,0 e 10,0, não são propícios à atividade enzimática (Tabela 3).

**Tabela 2:** Atividade proteolítica obtida através do DCCR.

Ensaio	T (cod)	T (°C)	pH (cod)	pH real	Atividade proteolítica (U mL <sup>-1</sup> )
1	1	65,6	1	9,4	74
2	1	65,6	-1	6,6	119
3	-1	44,4	-1	6,6	82
4	-1	44,4	1	9,4	123
5	1,41	70,0	0	8,0	187
6	-1,41	40,0	0	8,0	134
7	0	55,0	1,41	10,0	226
8	0	55,0	-1,41	6,0	111
9	0	55,0	0	8,0	325
10	0	55,0	0	8,0	320
11	0	55,0	0	8,0	319
12	0	55,0	0	8,0	323

**Tabela 3:** Análise de efeitos principais e interações das variáveis independentes sobre a atividade da protease bruta de CL33A.

Variável	Efeito (U mL <sup>-1</sup> )
Média	321,9405*
T (linear)	15,7292*
T x T	-194,6268*
pH (linear)	39,6554*
pH x pH	-186,5789*
T x pH	-43,0000*

\* Efeito significativo ( $p < 0,05$ ).

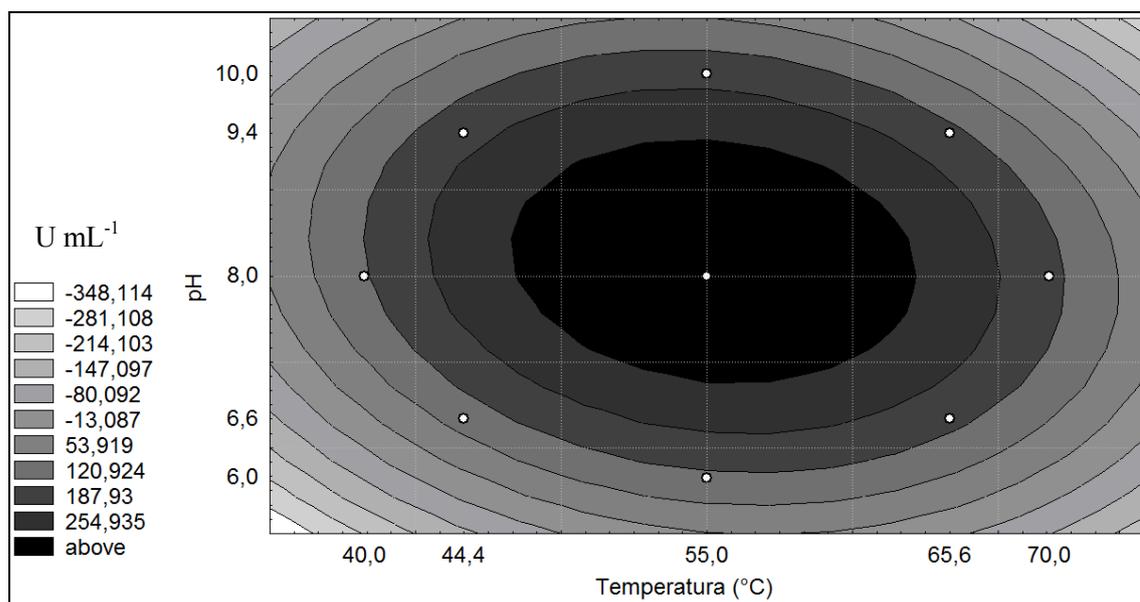
Todas as variáveis avaliadas foram significativas ( $p < 0,05$ ) e os dados foram utilizados para o cálculo dos coeficientes de regressão, gerando o modelo matemático:

$$Y = 321,94 + 7,864.T - 97,3134.T^2 + 19,8277.pH - 93,2895.pH^2 - 21,5.T.pH$$

Equação (1)

onde Y é a atividade proteolítica (U mL<sup>-1</sup>), T é a temperatura e pH é o pH, ambos em valores codificados.

Os coeficientes de regressão obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) sendo obtido um valor de F-calculado 2,6 vezes maior que o valor de F-tabelado ( $0,95;5df,6df$ ), indicando a possibilidade de utilização do modelo matemático (Equação (1)), que explicou 89 % da variabilidade observada nos ensaios. A superfície de contorno gerada a partir deste modelo é apresentada na Figura 2. A partir dela observa-se que a atividade máxima da enzima ocorre na área central abrangendo uma ampla faixa de temperaturas e valores de pH.



**Figura 2:** Superfície de contorno gerada a partir da Equação (1).

No que se refere ao pH ótimo de atuação da enzima percebe-se que o mesmo variou em uma faixa que vai do neutro a levemente alcalino (7-9). Quanto à temperatura, observou-se faixa ótima de 45 a 65 °C. Sendo assim, foram adotadas como condições ótimas a temperatura 55 °C e pH 8,0. Entre as vantagens do DCCR, está justamente a possibilidade de estabelecer faixas de operação, dentro das quais a atividade é ótima. Assim, esta metodologia é significativamente vantajosa em relação aos métodos tradicionais, que modificam uma variável por vez (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011). Além da otimização da atividade enzimática, esta metodologia vem sendo utilizada em diversos outros bioprocessos, como a própria produção de proteases (PURI; BEG; GUPTA, 2002; BEG; SAHAI; GUPTA, 2003).

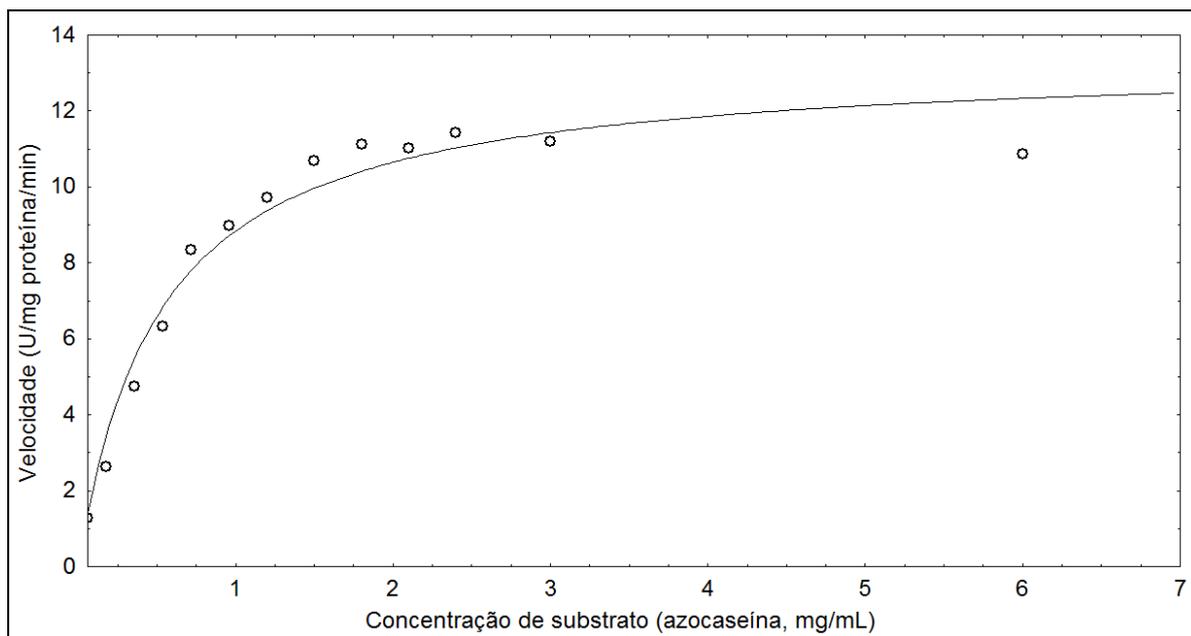
Em estudos realizados por Bach *et al.* (2011), a protease de *Chryseobacterium indologenes* A22 apresentou atividade ótima em uma faixa de pH de 7 a 8, e temperatura de 45 °C. De forma similar ao observado no presente estudo, a protease bruta de *Bacillus* sp. BL16 apresentou atividade máxima em pH 9 e 55 °C (GIONGO, 2006), e a protease de *Bacillus cereus* BG1 apresentou atividade ótima a 50 °C e pH 8,0 (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). Por outro lado, protease de *Bacillus licheniformis* NH1 demonstrou atividade ótima a 65-70 °C e pH 10-11 (EL HADJ-ALI *et al.*, 2007). De fato, geralmente, proteases produzidas por espécies de *Bacillus* sp. atuam em uma faixa de pH de 7 a 11, e em temperaturas de 40-70 °C (ELLAIHAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2002; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

### 5.3.2 Cinética Enzimática

Processos que utilizam enzimas requerem algumas informações prévias sobre parâmetros cinéticos. Nesse sentido a determinação da  $V_{\max}$  e do  $K_m$  são essenciais para o desenvolvimento de reatores enzimáticos ou para quantificar as aplicações sob diferentes condições (GUPTA *et al.*, 2002). A  $V_{\max}$  descreve a quantidade máxima de produto formado em um determinado tempo de reação, onde todo o sítio ativo das enzimas está ocupado por substrato (complexo enzima-substrato), já a constante de Michaelis,  $K_m$ , representa a concentração de substrato em que metade da  $V_{\max}$  é alcançada (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Logo, considerando enzimas como insumos de elevado valor agregado, sua aplicação deve ser o mais ajustada possível, visando não subutilizar o potencial catalítico enzimático, por exemplo, pelo uso de baixas concentrações de substrato. Na Figura 3 são apresentadas as velocidades de reação da protease bruta em função da concentração do substrato azocaseína, que aparentemente seguiu a cinética de Michaelis-Menten.

A partir destes resultados, a protease bruta apresentou  $V_{\max}$  aparente de 13,39 U mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, e  $K_m$  aparente de 0,515 mg mL<sup>-1</sup>. Na faixa de concentração avaliada, percebe-se que nos últimos pontos testados existe uma tendência de estabilização da velocidade de reação o que indica a saturação da enzima diante de altas concentrações de substrato.



**Figura 3:** Catálise da protease bruta em função da concentração de substrato (○). A curva representa o ajuste dos pontos utilizando equação de Michaelis-Menten ( $R^2 = 0,96$ ).

### 5.3.3 Efeito de sais, reagentes e inibidores sobre a atividade enzimática

A presença de sais no meio reacional pode influenciar na atividade proteolítica e, diante disso, foram testados os efeitos de vários sais em concentrações diferentes. Conforme a Tabela 4, a presença de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  dos sais  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  e  $\text{ZnCl}_2$  reduziram a atividade enzimática. No entanto,  $\text{MgCl}_2$  ( $1$  e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e  $\text{MnCl}_2$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) tenderam a estimular a atividade, enquanto que a presença de  $\text{CaCl}_2$  aparentemente não apresentou influência.

Em estudos anteriores, perfil similar quanto ao efeito de sais foi observado para a protease bruta de *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Comparativamente, embora a protease de *Bacillus cereus* BG1 tenha sido inibida por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , incrementos significativos na atividade enzimática foram observados na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (GHORBEL; SELAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). A protease de *Bacillus licheniformis* KBDL4 não foi significativamente afetada pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (PATHAK; DESHMUKH, 2012). A presença  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  é frequentemente um fator negativo para a atividade de proteases (MOALLAEI *et al.*, 2006). Especialmente, o efeito de inibição do íon  $\text{Zn}^{2+}$  já foi observado para metaloproteases devido a formação de

pontes entre hidróxido de zinco (ZnOH) e íons de zinco catalítico no sítio ativo (RIFFEL *et al.*, 2007).

**Tabela 4:** Efeito de sais sobre a atividade enzimática da protease bruta.

Sais	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,00 ± 3,6
CaCl <sub>2</sub>	1	108,19 ± 2,0
	5	96,41 ± 4,0
CoCl <sub>2</sub>	1	81,89 ± 5,4
	5	59,62 ± 8,9
CuSO <sub>4</sub>	1	82,47 ± 4,9
	5	52,29 ± 6,9
FeSO <sub>4</sub>	1	87,78 ± 2,0
	5	21,41 ± 7,3
MgCl <sub>2</sub>	1	109,34 ± 8,5
	5	117,96 ± 9,8
MnCl <sub>2</sub>	1	130,74 ± 0,3
	5	39,51 ± 8,0
ZnCl <sub>2</sub>	1	94,82 ± 9,4
	5	25,14 ± 8,2

Os íons metálicos Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> podem estimular a atividade da enzima por proporcionar estabilidade na sua conformação ativa e proteger contra a desnaturação térmica (KUMAR; TAKAGI 1999; CORRÊA; DAROIT; BRANDELLI, 2010). Considerando as peculiaridades de cada enzima, torna-se importante avaliar os efeitos de diferentes sais. Neste sentido, a adição de sais específicos ao meio reacional, principalmente cátions, pode auxiliar na estabilização da protease microbiana por meio de ligações a sítios específicos na estrutura da enzima (SILVEIRA *et al.*, 2010), e assim contribuir para a catálise enzimática em bioprocessos.

Dentre os reagentes testados, Tween 20 (0,5%, v v<sup>-1</sup>) e DMSO (0,5 e 1%, v v<sup>-1</sup>) tenderam a estimular a atividade enzimática, enquanto SDS e β-mercaptoetanol apresentaram efeito negativo sobre a catálise (Tabela 5).

**Tabela 5:** Efeito de reagentes na atividade enzimática.

Reagente	Concentração	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,00 ± 0,5
SDS	0,05 (% m v <sup>-1</sup> )	55,39 ± 7,5
	0,10 (% m v <sup>-1</sup> )	53,77 ± 4,4
Triton X-100	0,50 (% v v <sup>-1</sup> )	91,00 ± 3,9
	1,00 (% v v <sup>-1</sup> )	101,26 ± 2,2
Tween 20	0,50 (% v v <sup>-1</sup> )	140,46 ± 8,5
	1,00 (% v v <sup>-1</sup> )	110,97 ± 9,2
Etanol	1,00 (% v v <sup>-1</sup> )	116,72 ± 10,0
	3,00 (% v v <sup>-1</sup> )	102,33 ± 7,2
DMSO	0,50 (% v v <sup>-1</sup> )	112,23 ± 4,0
	1,00 (% v v <sup>-1</sup> )	113,84 ± 2,4
β-mercaptoetanol	0,05 (% v v <sup>-1</sup> )	77,15 ± 0,3
	0,10 (% v v <sup>-1</sup> )	76,79 ± 3,6
	0,50 (% v v <sup>-1</sup> )	70,14 ± 1,4
	1,00 (% v v <sup>-1</sup> )	70,50 ± 5,7

O efeito de reagentes sobre a atividade enzimática é bastante diverso, dependendo do microrganismo avaliado. O solvente orgânico DMSO, que nas concentrações utilizadas tendeu a manter ou aumentar a atividade da enzima, em estudo anterior não influenciou na atividade de protease queratinolítica do isolado *Nocardiosis* sp. TOA-1 (MITSUIKI *et al.*, 2004). Já no caso das proteases de *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3, o solvente DMSO provocou aumento, diminuição e manutenção da atividade enzimática, respectivamente (BACH *et al.*, 2011).

O detergente não-iônico Triton X-100, na maior concentração testada, praticamente manteve a atividade da protease bruta (Tabela 5), similarmente ao reportado em protease de

*Bacillus licheniformis* NH1 (EL HADJ-ALI *et al.*, 2007), e diferentemente dos resultados obtidos para a protease de *Bacillus* sp. P45 (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). Protease de *Bacillus licheniformis* RP1 não foi afetada pela presença de Triton X-100 e Tween 20 (SELLAMI-KAMOUN *et al.*, 2008).

A diminuição da atividade enzimática relativa na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, um agente redutor de pontes dissulfeto, também foi observada em estudos realizados por Daroit; Corrêa; Brandelli (2011), e perfil de redução da atividade proteolítica com o aumento da concentração deste reagente ocorreu para proteases de *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010). A influência negativa do  $\beta$ -mercaptoetanol sobre a atividade pode indicar que pontes dissulfeto sejam necessárias à atuação de proteases. Do ponto de vista da aplicação da protease, tal resultado é potencialmente negativo, visto que o  $\beta$ -mercaptoetanol poderia ser utilizado para desestabilizar pontes dissulfeto em substratos queratinosos, como penas e cabelos, facilitando a degradação (MITSUIKI *et al.*, 2004).

O SDS é detergente aniônico que usualmente provoca a desnaturação de proteínas, incluindo diversas proteases microbianas (RIFFEL *et al.*, 2007). Da mesma forma que nos ensaios realizados (Tabela 5), este detergente também diminuiu a atividade de proteases de *Chryseobacterium indologenes* A22, *Serratia marcescens* P3, mas aumentou a atividade da protease bruta de *Aeromonas hydrophila* K12 (BACH *et al.*, 2011). Contudo, na concentração de 0,1% ( $m v^{-1}$ ), o SDS não afetou protease de *Bacillus licheniformis* NH1 (EL HADJ-ALI *et al.*, 2007) e *Bacillus licheniformis* KBDL4 (PATAK; DESHMUKH, 2012).

Os inibidores de proteases fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF), ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) e fenantrolina, diminuíram a atividade da protease bruta, conforme dados da Tabela 6.

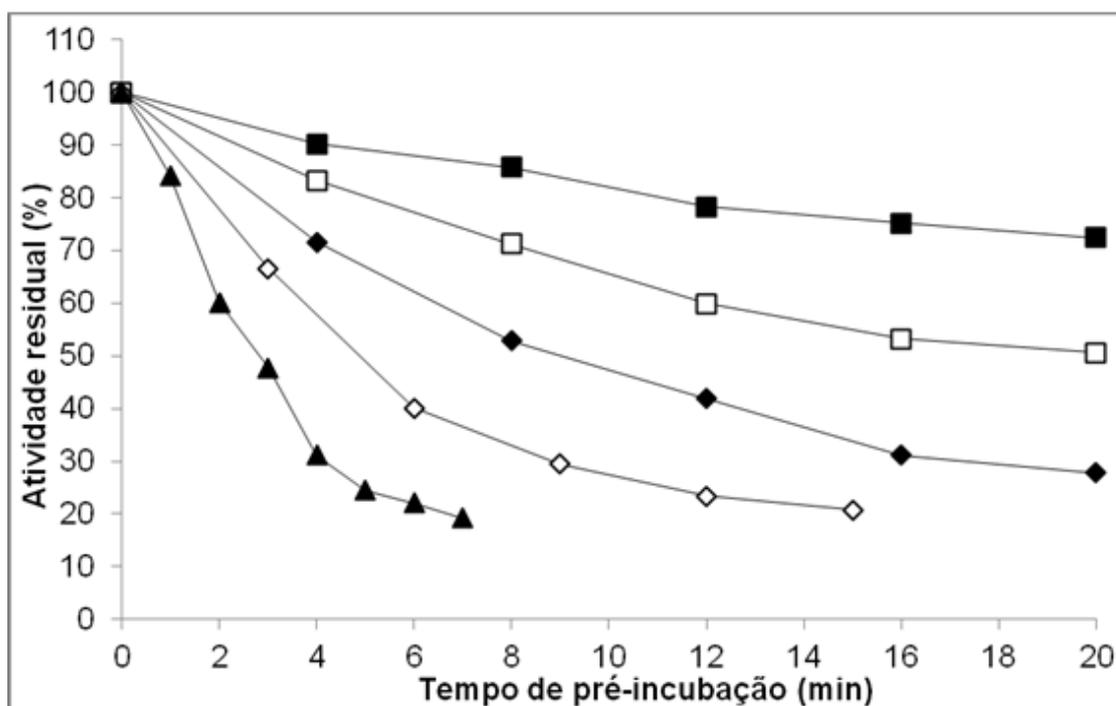
Como foi observada diminuição da atividade proteolítica na presença dos inibidores de metaloproteases (EDTA e 1,10-fenantrolina), possivelmente a protease bruta contenha enzimas deste grupo (GHORBEL; SELLAMI-KAMOUN; NASRI, 2003). A inibição provocada por PMSF, um inibidor de serino proteases, sugere a possível presença de serino proteases (GENCKAL; TARI, 2006). Alguns estudos relatam a inibição parcial de serino proteases por EDTA, indicando a importância de íons metálicos na estabilização da conformação ativa destas enzimas (BOECKLE; GALUNSKY; MUELLER, 1995; NAM *et al.* 2002).

**Tabela 6:** Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática.

Inibidor	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,00 ± 3,2
PMSF	1	75,93 ± 6,7
	5	74,36 ± 8,5
EDTA	1	65,52 ± 3,5
	5	64,76 ± 6,5
1,10-fenantrolina	1	69,66 ± 6,5
	5	69,06 ± 8,1

### 5.3.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi avaliada através da pré-incubação da protease bruta em diferentes temperaturas, de 50 a 60 °C. Os resultados podem ser observados na Figura 4.



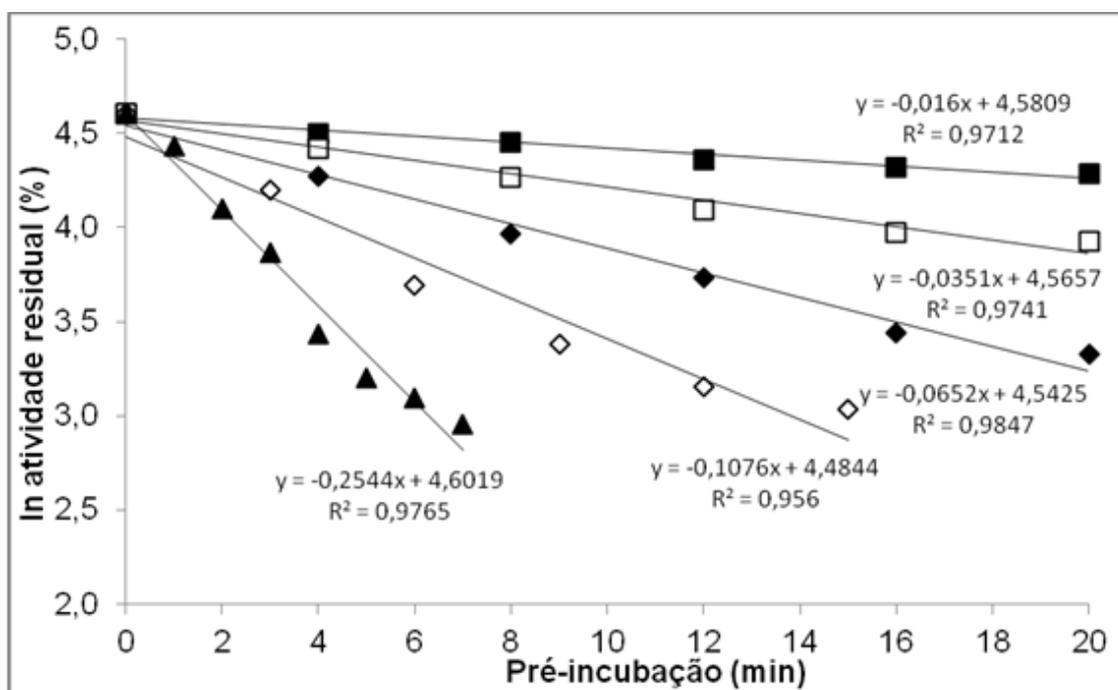
**Figura 4:** Atividade residual (%) da protease bruta após pré-incubação nas temperaturas de 50 °C (■); 52,5 °C (□); 55 °C (◆); 57,5 °C (◇) e 60 °C (▲).

Após 20 minutos de pré-incubação a 50 °C já foi observada diminuição de aproximadamente 25% da atividade enzimática, enquanto que para as temperaturas de 52,5 e

55 °C, no mesmo tempo de pré-incubação, a atividade diminuiu em aproximadamente 45 e 70%, respectivamente. Para a temperatura de 57,5°C, em apenas 15 minutos a atividade já havia diminuído em torno de 80% e, a 60 °C foram necessários apenas 7 minutos para redução de mais de 80% da atividade enzimática.

A protease utilizada no presente estudo mostrou-se mais estável em relação a protease produzida pelo fungo *Endothia parasítica* (KALISZ, 1998) que foi inativada em apenas 5 minutos a 60 °C. Tal como ocorreu com os isolados BL16 e BL20 (GIONGO, 2006) após 20 minutos a 55 °C a atividade residual foi menos de 50 % da atividade inicial, característica que pode resultar em menor gasto com energia no caso de aplicação em processos indústrias já que tais enzimas atuam em temperaturas moderadas (GUPTA *et al.*, 2002).

A partir dos dados obtidos (Figura 5) elaborou-se a Figura 5, um gráfico semilogarítmico da atividade residual da protease bruta em função do tempo. Foram obtidas as constantes de inativação ( $k_d$ ), dadas pelo coeficiente angular das retas, considerando uma cinética de primeira ordem.



**Figura 5:** Gráfico semilogarítmico da atividade residual e tempo de pré-incubação da protease bruta a 50 °C (■); 52,5 °C (□); 55 °C (◆); 57,5 °C (◇) e 60 °C (▲).

Então, a partir da Equação 2, foram calculados os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para as temperaturas testadas, conforme a Tabela 7.

$$t_{1/2} = \ln(2)/k_d \quad \text{Equação (2)}$$

**Tabela 7:** Tempo de meia-vida da protease bruta em diferentes temperaturas.

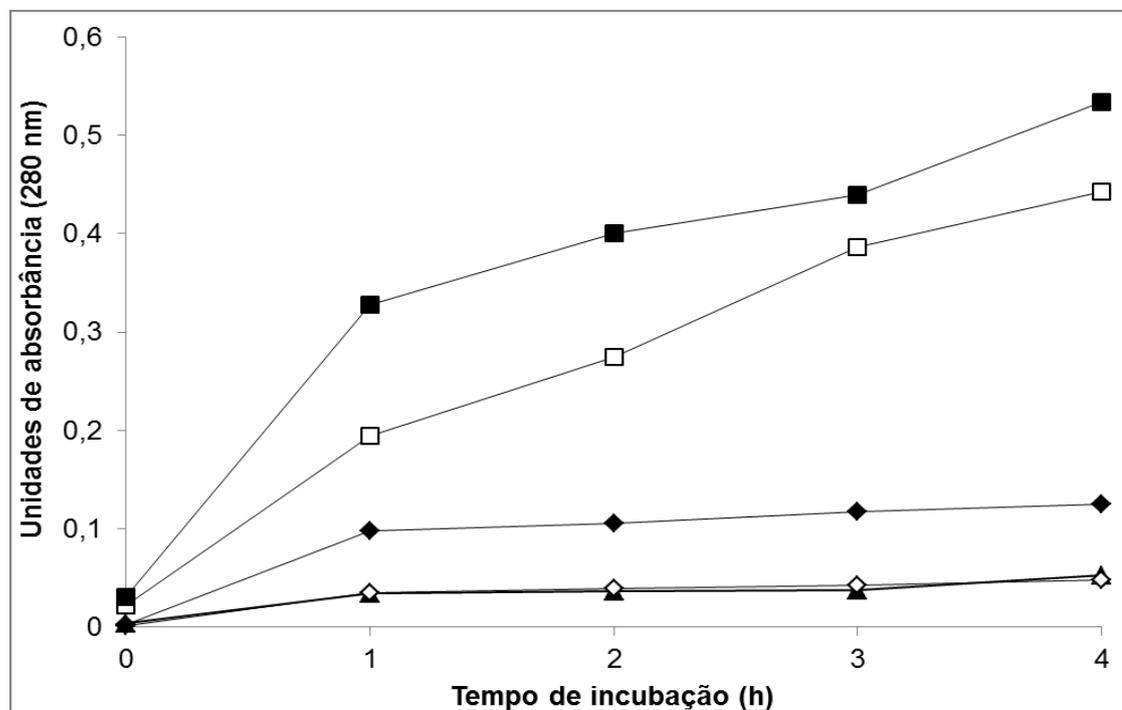
Temperatura (°C)	- $k_d$	$t_{1/2}$ (minutos)
50	0,0160	43,3
52,5	0,0351	19,7
55	0,0652	10,6
57,5	0,1076	6,4
60	0,2544	2,7

Os valores de  $t_{1/2}$  diminuíram progressivamente com o aumento da temperatura e a taxa de inativação térmica ( $k_d$ ) aumentou, indicando que a desnaturação irreversível tornou-se cada vez mais significativa. Em estudo realizado por Hernández-Martínez *et al.* (2011) a protease produzida pelo fungo *Aspergillus awamori* apresentou  $t_{1/2}$  de 64,8 minutos a 50 °C. Considerando os valores de  $t_{1/2}$  obtidos para a protease bruta do isolado bacteriano CL33A, observa-se menor termoestabilidade em relação à protease fúngica avaliada por Hernández-Martínez *et al.* (2011). Já em comparação as proteases de *S. clavuligerus* 3585 e 644 (MOREIRA *et al.*, 2001) que obtiveram  $t_{1/2}$  de 8,66 minutos e 10,66 minutos a 50 °C respectivamente, o isolado bacteriano *Bacillus* sp. demonstrou ser mais termoestável.

### 5.3.5 Hidrólise de diferentes substratos

A protease bruta também foi avaliada quanto à hidrólise dos substratos pena, FP, caseína, PIS e cabelo, sendo observado que os substratos caseína e PIS foram os mais hidrolisados (Figura 6). Em 1 h de incubação para hidrólise do substrato PIS, observou-se uma absorbância superior a 0,3 unidades, que continuou aumentando até as 4 h, atingindo 0,5 unidades. Desempenho levemente inferior foi detectado para a hidrólise do substrato caseína e

FP. No entanto, os substratos penas e cabelo foram pouco atacados pela protease bruta, de acordo com o método utilizado.



**Figura 6:** Hidrólise dos substratos pena (◇), FP (◆), caseína (□), PIS (■) e cabelo (▲), pela protease bruta de CL33A.

A dificuldade de hidrólise do substrato cabelo pode ser justificada pela presença de  $\alpha$ -queratinas “rígidas” na composição do cabelo (ONIFADE *et al.*, 1998; ROUSE; VAN DYKE, 2010; DAROIT; BRANDELLI, 2014) o que torna menos comum a hidrólise microbiana desse substrato (BRANDELLI, 2005; PILLAI; ARCHANA, 2008). Já os baixos resultados na hidrólise do substrato penas podem ter ocorrido pela pouca acessibilidade da enzima ao substrato e a falta de homogeneidade. De fato, o substrato farinha de penas é mais acessível e homogêneo, o que resulta em uma menor resistência (BRANDELLI; RIFFEL, 2005; CORRÊA, 2009).

A utilização da hidrólise enzimática na obtenção de peptídeos bioativos é uma aplicação comum (MOLLER *et al.*, 2008), além disso a hidrólise pode melhorar as propriedades funcionais, como poder emulsificante, textura, propriedades funcionais das proteínas e solubilidade potencializando a aplicação na indústria alimentícia (SUROWKA *et*

*al.*, 2004). É importante considerar ainda que a hidrólise proteica realizada a por enzimas usualmente produz hidrolisados com perfil de peptídeos bem definidos e os substratos caseína e proteína de soja são bastante utilizados nesse processo (MARTINS; GALEAZZI, 1996).

## 6. CONCLUSÕES

A partir da bioconversão de penas e FP, substratos recalcitrantes, abundantes e de baixo custo, *Bacillus* sp. CL33A foi capaz de produzir enzimas proteolíticas. Pelo maior rendimento de proteases, o substrato FP foi selecionado.

A protease bruta obtida nos cultivos em CFP atuou de forma ótima em amplas faixas de temperatura e pH, o que indica versatilidade em processos enzimáticos. A atividade enzimática foi potencializada pela adição do sal  $MgCl_2$ , que pode ter atuado na estabilização de enzimas. A ação de inibidores de protease sugere que a protease bruta de *Bacillus* sp. CL33A contenha mais de uma protease, possivelmente de grupos diferentes. Quanto à estabilidade térmica, a inativação em temperaturas moderadas pode indicar maior possibilidade de controle de processos enzimáticos.

As características da protease bruta e sua capacidade de hidrolisar caseína e PIS sugerem a potencial utilização em bioprocessos de modificação e hidrólise de substratos proteicos, indicando perspectivas promissoras para pesquisas futuras.

Desta forma, o processo de bioconversão de FP pode representar interessante estratégia para obtenção de proteases com potencial tecnológico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. C. S.; MARINHO, M. M. O.; KIPERSTOK, A. Uma política nacional de meio ambiente focada na produção limpa: elementos para discussão. **Bahia Análise & Dados**, v. 10, n. 4, p. 326-32, 2001.

BACH, E. *et al.* Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. **Biodegradation**, v. 22, n. 6, p. 1191-1201, 2011.

BEG, Q. K.; SAHAI, V.; GUPTA, R.. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 203-209, 2003.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1114 p.

BOECKLE, B.; GALUNSKY, B.; MUELLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3705-3710, 1995.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JÚNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. v. 1, p. 241-271, 2008.

BRAND, D. *et al.* Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 127-133, 2000.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 2, p. 105-116, 2008

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1735-1750, 2010.

BRANDELLI, A. Hydrolysis of native proteins by a keratinolytic protease of *Chryseobacterium* sp. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 47-50, 2005.

BRANDELLI, A.; RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2005.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**. 2001. Disponível em: [https://www.faecpr.edu.br/site/documentos/recursos\\_microbiologicos\\_biotecnologia.pdf](https://www.faecpr.edu.br/site/documentos/recursos_microbiologicos_biotecnologia.pdf)

CARVALHO, P. O. *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CASARIN, F.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 3, p. 301-305, 2008.

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

CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e de Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

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

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology** 34, 372-384, 2014.

DAYANANDAN, A. *et al.* Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 11, n. 5, p. 533-536, 2003.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORÍS-VARAS, F. Screening for novel enzymes. In: FESNER, W. D. **Biocatalysis - From discovery to application**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 1-29.

EL HADJ-ALI, M. *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 515-523, 2007.

ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. A review on microbial alkaline proteases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 61, n. 9, p. 690-704, 2002.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 721 p.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 7, p. 471-499, 2005.

GENCKAL, H.; TARI, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 703-710, 2006.

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

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e de Meio Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381-395, 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. *et al.* Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELLO, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3, p. 270-278, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE - Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, março de 2015.

JISHA, V. N. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**. n. 3, v. 1, 39-51, 2013.

JOO, H.; CHANG, C. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 1263-1270, 2005

KAMIDA, H. M. *et al.* Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629, 2005.

KARTHIKEYAN, R.; BALAJI, S.; SEHGAL, P. K. Industrial applications of keratins – a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v.66, p. 710-715, 2007.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262-276, 2011.

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

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

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, Hiroshi. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUETZ, S.; GIVER, L.; LALONDE, J.. Engineered enzymes for chemical production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 647-653, 2008.

MARCONDES, N. R. *et al.* New feather-degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p. 13-17, 2008.

MARTINS, M. T. S.; GALEAZZI, M. A. M. Alergia alimentar: considerações sobre o uso de proteínas modificadas enzimaticamente. **Revista Cadernos de Debate**, p. 1-24, 1996.

MATSUI, T. *et al.* Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 941-950, 2009.

MEDEIROS, A. B. P. *et al.* Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 2000.

MITSUIKI, S. *et al.* Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 482-489, 2004.

MOALLAEI, H. *et al.* Partial purification and characterization of a 37 kDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 369-375, 2006.

MÖLLER, N. P. *et al.* Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, K. A. *et al.* Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 215-220, 2001.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 242, p. 28, 2007.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiment**. New York: John Wiley and Sons, p. 343-350, 2002.

NAM, G. *et al.* Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 6, p. 538-547, 2002.

NIELSEN, R. I.; OXENBØLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, v. 12, n. 2, p. 69-71, 1998.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Production and some properties of crude alkaline proteases of indigenous Central Amazonian rhizobia strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1185-1195, 2010.

OLIVEIRA, C. T.; DAROIT, D. J. Potencial queratinolítico do isolado bacteriano CL33A. In: **Anais do SEPE - Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 5, n. 1, 2015.

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

PATHAK, A. P.; DESHMUKH, K.; Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: a Lonar soda lake isolate. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 50, p. 569-576, 2012.

PELLENZ, L.; MEDEIROS, F. O.; DAROIT, D. J. Bioprospecção funcional de bactérias produtoras de enzimas proteolíticas. In: **Anais do SEPE - Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 3, n. 1, 2013.

PELLENZ, L.; MEDEIROS, F. O.; DAROIT, D. j. Efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento bacteriano em ágar farinha de penas. In: **Anais do SEPE - Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFFS**, v. 4, n. 1, 2014.

PEDROZO, M. F. M. *et al.* **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246 p.

PICCHI, V.. Graxaria: Estrutura e Operacionalização. In: **Abate e Processamento de Frangos**. Campinas: Ed. FACTA, 1994.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 4, p. 643-650, 2008.

PURI, S.; BEG, Q. K.; GUPTA, R.. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by response surface methodology. **Current Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 286-290, 2002.

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

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 395-399, 2006.

RIFFEL, A. *et al.* Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 3, p. 693-703, 2007.

ROUSE, J. G.; VAN DYKE, M. E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. **Materials**, v. 3, n. 2, p. 999-1014, 2010.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224-230, 2010.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, p. 735-743, 2000.

SILVEIRA, S. T. *et al.* Thermodynamics and kinetics of heat inactivation of a novel keratinase from *Chryseobacterium* sp. strain kr6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 548-560, 2010.

SINGH, B. K.. Exploring microbial diversity for biotechnology: The way forward. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 111-116, 2010.

SINGH, C. J.. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. **Mycopathologia**, v. 156, n. 3, p. 151-156, 2002.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

SURÓWKA, K. *et al.* New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 2, p. 225-234, 2004.

TANG, W. L.; ZHAO, H. Industrial biotechnology: tools and applications. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1725-1739, 2009.

THANIKAIVELAN, P. *et al.* Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 181-188, 2004.

TORRES, A. C. *et al.* **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Foreign Agricultural Service – Livestock and poultry**: world markets and trade. Washington: USDA, abril de 2015.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GOUSTEROVA, A.; NESHEV, G.. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 1008-1012, 2009.

VILLAS BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 38-42, 2000.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnología de las enzimas**, s.n. Espanha. 1991.