

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CERRO LARGO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS

**DEGRADAÇÃO DE PENAS POR *Bacillus* sp. CL18:
PROPRIEDADES DA PROTEASE BRUTA
PRODUZIDA DURANTE CULTIVOS SUBMERSOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TIAGO JOEL RIEGER

CERRO LARGO – RS

2015

TIAGO JOEL RIEGER

**DEGRADAÇÃO DE PENAS POR *Bacillus* sp. CL18: PROPRIEDADES DA
PROTEASE BRUTA PRODUZIDA DURANTE CULTIVOS SUBMERSOS**

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

Rieger, Tiago Joel

Degradação de penas por Bacillus sp. CL18:
propriedades da protease bruta produzida durante
cultivos submersos/ Tiago Joel Rieger. -- 2015.
56 f.:il.

Orientador: Daniel Joner Daroit.

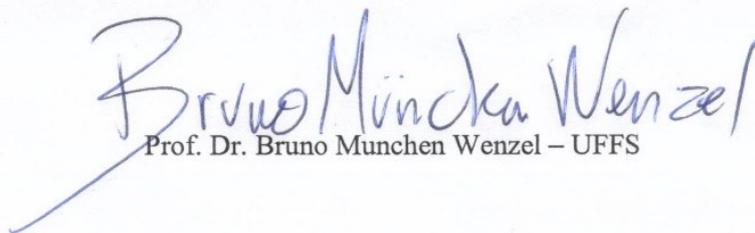
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia Ambiental , Cerro Largo, RS, 2015.

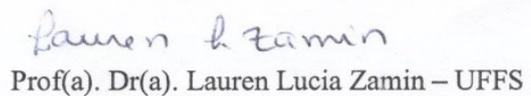
1. Bactéria. 2. Bioconversão de penas. 3. Protease.
4. Caracterização de enzimas. I. Daroit, Daniel Joner,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

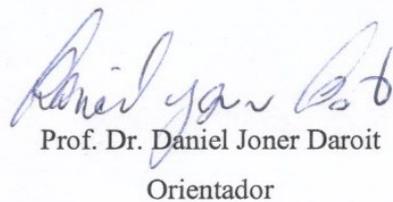
**DEGRADAÇÃO DE PENAS POR *Bacillus* sp. CL18: PROPRIEDADES DA
PROTEASE BRUTA PRODUZIDA DURANTE CULTIVOS SUBMERSOS**

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 01 de Dezembro de 2015


Prof. Dr. Bruno München Wenzel – UFFS


Prof(a). Dr(a). Lauren Lucia Zamin – UFFS


Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Orientador

CERRO LARGO – RS

2015

Aos meus pais, irmão e professor Daniel,
com muito carinho e apoio, não mediram
esforços para que eu chegasse até esta
etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Prof. Dr. Daniel Joner Daroit, pela excelente orientação, sabedoria, ensinamentos, amizade e apoio durante a graduação em projetos de pesquisa e o trabalho final do curso.

À amiga, colega e companheira de laboratório Caroline Torres de Oliveira pelo auxílio na realização dos ensaios e por ter compartilhado as publicações dela para ser a sequência do Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao CNPQ pela bolsa de Iniciação Científica durante a Graduação.

Aos meus familiares, pai, mãe e irmão, pelo apoio, compreensão e incentivo.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas	iii
Resumo	iv
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REFERENCIAL TEÓRICO	3
3.1. Resíduos da indústria avícola: o caso das penas de frango.....	3
3.2. Biotecnologia e degradação de penas	4
3.2.1. Queratinas e microrganismos queratinolíticos	5
3.3. Proteases	7
3.3.1. Produção e uso de proteases microbianas	7
3.4. Gênero <i>Bacillus</i>	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. Microrganismo.....	12
4.2. Degradação de penas pelo isolado CL18	12
4.2.1. Meio de cultura, inoculação e cultivos.....	12
4.2.2. Determinação da massa seca das penas.....	12
4.2.3. Ensaio de atividade enzimática	13
4.2.4. Determinação de proteína solúvel	13
4.3. Caracterização da protease bruta produzida pelo isolado CL18 em CP	14
4.3.1. Determinação de pH e temperatura ótimos	14
4.3.2. Cinética de atividade em azocaseína.....	15
4.3.3. Efeito de sais, reagentes e inibidores sobre a atividade da protease bruta.....	16
4.3.4. Estabilidade térmica	16
4.3.5. Atuação da protease bruta na hidrólise de diferentes substratos proteicos	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1. Degradação de penas por <i>Bacillus</i> sp. CL18	18
5.2. Produção de protease durante cultivos em Caldo Pena	19

5.3. Caracterização da protease bruta produzida por <i>Bacillus</i> sp. CL18	21
5.3.1. Temperatura e pH ótimos	21
5.3.2. Estabilidade Térmica.....	26
5.3.3. Cinética de atividade em azocaseína.....	29
5.3.4. Efeito de sais sobre a atividade proteolítica	30
5.3.5. Efeito de reagentes e inibidores sobre a atividade proteolítica	32
5.3.6. Atuação da protease bruta na hidrólise de diferentes substratos proteicos	35
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AFP	Ágar Farinha de Penas
CP	Caldo Pena
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
kd	constante de inativação
K_m	constante de <i>Michaelis-Menten</i>
MM	Meio Mineral
p	nível descritivo do teste
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
R^2	coeficiente de determinação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
$t_{1/2}$	tempo de meia vida da enzima
TCA	Ácido tricloroacético
TSA	Ágar Triptona de Soja
V_{max}	velocidade máxima da reação

RESUMO

Tiago Joel Rieger. Degradação de penas por *Bacillus* sp. CL18: propriedades da protease bruta produzida durante cultivos submersos.

Resíduos ricos em queratinas são gerados em grande quantidade por atividades agroindustriais, como o caso das penas provenientes do abate de aves, que necessitam de destinação adequada. Com isso, a biotecnologia surge como estratégia de manejo e agregação de valor a estes resíduos. O presente estudo visou avaliar o potencial de degradação de penas do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18, caracterizar a protease bruta produzida em Caldo Pena, e verificar o seu potencial na hidrólise de diferentes substratos proteicos. Esta linhagem degradou 95% das penas presentes no meio após 4 dias de cultivo, o que resultou em aumento da concentração de proteínas solúveis no meio. A bactéria produziu proteases extracelulares para este processo, que atingiram valores máximos no 4º dia de cultivo. Esta protease bruta apresentou temperatura e pH ótimos para atividade a 55 °C e 8,0, respectivamente. A estabilidade térmica da enzima não foi afetada a 45,0 °C, enquanto que a pré-incubação a 50-60 °C resultou em decréscimo da atividade residual, com o tempo de meia vida diminuindo com o aumento da temperatura. A cinética enzimática seguiu a equação de Michaelis-Menten. Sais de cobalto, cobre, ferro e zinco, SDS, e o agente redutor β -mercaptoetanol resultaram em diminuição da atividade enzimática, enquanto que sais de cálcio e magnésio, e os detergentes não-iônicos Triton X-100 e Tween 20, favoreceram a atividade da protease. Manganês e etanol no meio reacional não aparentaram efeito sobre a atividade enzimática. Os inibidores de protease PMSF e EDTA diminuíram fortemente a atividade da protease bruta, indicando a presença de serino e metaloproteases. A protease bruta hidrolisou, preferencialmente, caseína e proteína isolada de soja. Considerando estes resultados, *Bacillus* sp. CL18 pode ser utilizado na degradação de penas, e a protease bruta produzida durante os cultivos pode ser potencialmente aplicada na hidrólise de proteínas para obtenção de produtos úteis.

Palavras-Chave: *Bacillus* sp., penas, protease, caracterização.

ABSTRACT

Tiago Joel Rieger. Feather degradation by *Bacillus* sp. CL18: properties of the crude protease produced during submerged cultivations.

Keratin-rich wastes are generated in large quantities by agro-industrial activities, such as feathers from the poultry slaughterhouses, that need to be adequately disposed. In this sense, biotechnology emerges as a management and value-adding strategy for these wastes. This study aimed to evaluate the feather-degrading potential of the bacterial isolate *Bacillus* sp. CL18, to characterize the crude protease produced during cultivations on Feather Broth, and to verify its potential for the hydrolysis of various protein substrates. This strain degraded 95% of the feathers in the medium after 4 days of cultivation, resulting in increased soluble protein concentrations. The bacterium produced extracellular proteases for this process, reaching maximal values at the 4th day of cultivation. This crude protease showed temperature and pH optima at 55 °C and 8.0, respectively. Enzyme thermal stability was not affected at 45 °C, while pre-incubations at 50-60 °C resulted in diminished residual activities, with half-life values decreasing as the temperature increased. The enzyme kinetics followed Michaelis-Menten equation. Cobalt, copper, iron and zinc salts, and the reducing agent β -mercaptoethanol resulted in decreased enzymatic activity, whereas calcium and magnesium salts, and the non-ionic detergents Triton X-100 and Tween 20, favored protease activity. Manganese salt and ethanol in the reaction media had no apparent effects on enzyme activity. Protease inhibitors PMSF and EDTA strongly decreased the crude protease activity, indicating the presence of serine and metalloproteases. The crude protease preferentially hydrolyzed casein and soy protein isolate. From these results, *Bacillus* sp. CL18 could be employed in feather degradation, and the crude protease produced during the cultures might be potentially applied in protein hydrolysis, aiming to obtain useful products.

Keywords: *Bacillus* sp., feathers, protease, characterization.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção agroindustrial para atender a demanda de consumo gera também grande quantidade de resíduos. Estes resíduos podem se tornar um problema econômico para as empresas, que devem investir na sua correta destinação, para evitar possíveis impactos ambientais. Como possível alternativa surge a reciclagem desses resíduos.

Entre esses resíduos, as penas geradas a partir do processamento de aves, que correspondem a aproximadamente 5 a 7% do peso total de frangos adultos, têm usualmente como destino final a incineração ou a utilização na alimentação de outros animais na forma de farinha de penas. Contudo, estes processos requerem alto aporte energético, e no caso da farinha de penas, gera-se um produto de baixa digestibilidade. Assim, são necessárias estratégias adequadas para o reaproveitamento das penas.

Neste sentido, microrganismos proteolíticos e proteases vêm sendo explorados quanto à sua aplicação na bioconversão de materiais queratinosos através de abordagens biotecnológicas. No caso das penas, o uso do potencial microbiano pode resultar tanto no manejo quanto dos resíduos quanto na agregação, representando uma estratégia eficiente, de baixo custo e ecologicamente segura. Dessa forma, as penas passam a ser consideradas matérias-primas e não mais como um resíduo.

Proteases são enzimas que atuam na hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, liberando aminoácidos e peptídeos, e apresentam potencial biotecnológico para aplicação em diversas áreas industriais. Além do manejo dos resíduos queratinosos, proteases microbianas podem ser empregadas na indústria de alimentos, como suplementos de rações, entre outras aplicações. Normalmente, o custo elevado do substrato utilizado no meio de cultura para a produção comercial de enzimas é um fator limitante. Portanto, a busca por substratos alternativos pode contribuir para diminuir o custo final da produção de enzimas e, conseqüentemente, reduzir os custos dos processos em que as enzimas são empregadas. Resíduos queratinosos de atividades agroindustriais podem ser utilizados como potenciais substratos, por sua ampla disponibilidade e baixo custo.

Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar a degradação de penas por um isolado bacteriano, bem como caracterizar a protease bruta produzida durante o bioprocessamento das penas, investigando as condições ideais que maximizam sua atividade a fim de postular potenciais aplicações.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar quantitativamente o potencial do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18 em degradar penas de frango e investigar as propriedades da protease bruta produzida durante esse processo.

2.2 Específicos

- Investigar a degradação de penas de frango por *Bacillus* sp. CL18;
- Avaliar a produção de proteases durante cultivos desta bactéria em Caldo Pena (CP);
- Investigar as condições ótimas de temperatura e pH para a protease bruta produzida;
- Avaliar a estabilidade térmica da protease produzida;
- Determinar as constantes cinéticas K_m e V_{max} da equação de Michaelis Menten da protease bruta;
- Investigar o efeito de diferentes substâncias sobre a atividade enzimática;
- Avaliar a hidrólise de diferentes substratos proteicos pela protease bruta.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Resíduos da indústria avícola: o caso das penas de frango

A Lei 12.305, de 02 de agosto de 2010, que instituiu a Política Nacional dos Resíduos Sólidos (BRASIL, 2010), indica que a gestão e gerenciamento de resíduos sólidos devem obedecer a seguinte ordem de prioridades: não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos. Ainda, esta Lei classifica os resíduos sólidos em diferentes grupos quanto à origem, incluindo os resíduos agrossilvopastoris. Neste contexto, abatedouros e matadouros são considerados como atividades agroindustriais, e os resíduos gerados de tais atividades integram os resíduos agrossilvopastoris (RIO GRANDE DO SUL, 2014).

O aumento do consumo mundial da carne de aves tem impulsionado a indústria avícola mundial. No entanto, diretamente atrelada a estas atividades, toneladas de subprodutos orgânicos são geradas durante o processo de abate, na forma de vísceras, pés, cabeça, ossos, sangue e penas. As vísceras constituem cerca de 30% destes resíduos, enquanto as penas aproximadamente 10% (LASEKAN *et al.*, 2013). O Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), em compilação de dados da literatura, indica que uma unidade industrial com capacidade de abate médio de 165 mil aves/dia, gera aproximadamente 18,5 toneladas de penas como resíduo sólido (IPEA, 2012). O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, sendo que em 2014 foram abatidos 5,4 bilhões de frangos em estabelecimentos inspecionados, totalizando 12,5 milhões de toneladas de carcaças; no mesmo ano, foram abatidos 783 milhões de frangos no Rio Grande do Sul (RS), atingindo 1,6 milhões de toneladas de carcaças (IBGE, 2015). Considerando que aproximadamente % do peso corpóreo dos frangos equivalem às penas (BRANDELLI, 2008), é possível estimar que, no país e no RS, 620 mil toneladas e 81 mil toneladas de penas foram produzidas como resíduo em 2014, respectivamente. Mundialmente, estima-se que 5 milhões de toneladas de penas sejam produzidas anualmente como resíduo do abate de frangos (POOLE *et al.*, 2009).

Portanto, penas são resíduos sólidos abundantes que necessitam de destino adequado. Embora as penas possam ser incineradas e mesmo destinadas a aterros sanitários, estas estratégias podem resultar em contaminação ambiental, liberação de gases tóxicos (amônia e

sulfeto de hidrogênio) e, no caso de aterros, demandar grandes áreas para sua deposição (LASEKAN *et al.*, 2013). Mais comumente, as penas são convertidas em farinha de penas através de processo de cocção sob pressão e moagem, e a farinha resultante é utilizada como ingrediente de rações para alimentação animal (ONIFADE *et al.*, 1998). Neste sentido, a Instrução Normativa 34/2008, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em seu Anexo I, considera como resíduos animais as “carcaças ou partes de carcaças de animais, não destinados ao consumo humano, ossos, penas, sangue e vísceras permitidos para uso em farinhas e produtos gordurosos” (MAPA, 2008). A Comissão de Regulação da Comunidade Europeia agrupa os subprodutos de origem animal em três categorias, de acordo com seu nível de risco para a transmissão de patógenos e substâncias tóxicas. Na terceira categoria (menor risco) se enquadram as penas que, sendo derivadas de animais saudáveis, podem ser utilizadas, por exemplo, na produção de rações animais (LASEKAN *et al.*, 2013).

Tal destino para as penas é quase exclusivo, devido ao baixo interesse de outras áreas por esse resíduo do processamento de aves (HOLANDA, 2009). No entanto, o tratamento hidrotérmico das penas demanda elevado aporte energético, tornando-se um processo caro que, além de provocar a destruição de aminoácidos essenciais, como a metionina, lisina e triptofano, resulta em um produto de baixa digestibilidade e qualidade nutricional questionável (BRANDELLI, 2008).

3.2. Biotecnologia e degradação de penas

A Biotecnologia pode ser definida como a integração das ciências naturais e engenharia, a fim de realizar a aplicação de organismos, células, suas partes e moléculas análogas para obtenção de produtos e realização de serviços. A biotecnologia é versátil, e tem sido avaliada em áreas-chave que muito têm impactado diversas tecnologias com base na aplicação de processos biológicos na indústria transformadora, na agropecuária, processamento de alimentos, medicina, proteção do meio ambiente e conservação dos recursos naturais (GAVRILESCU, 2010).

Microrganismos apresentam elevada diversidade fisiológica/metabólica, sendo encontrados em virtualmente todas as condições ecológicas, participando ativamente na realização e manutenção de funções ecossistêmicas. Então, a biotecnologia pode ser em parte

entendida como a utilização, em locais controlados, de processos microbianos que ocorrem naturalmente nos ambientes. Como exemplos podem ser citados a produção de biocombustíveis e o tratamento de efluentes/resíduos (EVANS & FURLONG, 2003).

Neste sentido, tecnologias mais adequadas de destinação das penas compreendem a biodigestão anaeróbia e a compostagem, tecnologias tradicionais que têm por base a atuação de microrganismos. Na primeira, o principal produto é o biogás; no entanto, níveis elevados de amônia podem ser originados durante a hidrólise das penas, que é tóxica para as bactérias metanogênicas. Na segunda, o produto estável (composto) pode ser utilizado como condicionante de solos e fertilizante nitrogenado (KORNILLOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

Dentre as alternativas biotecnológicas que vêm sendo pesquisadas para o manejo de penas, e outros resíduos agroindustriais, destaca-se a tecnologia de fermentações, incluída como parte da microbiologia industrial. Por esta abordagem, microrganismos podem ser utilizados no bioprocessamento das penas, resultando tanto no manejo quanto na agregação de valor a estes resíduos. Tais tecnologias representam estratégias eficientes, de baixo custo e ecologicamente seguras (BRANDELLI *et al.*, 2010; KORNILLOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

3.2.1. Queratinas e microrganismos queratinolíticos

As queratinas são proteínas recalcitrantes presentes em grande quantidade na epiderme, pelos, penas, chifres, cascos, unhas, entre outros apêndices epidérmicos. Particularmente, as penas são compostas por aproximadamente 90% de queratina (m/m, em base seca). Estas proteínas são química e mecanicamente estáveis, insolúveis em água, ácidos e bases fracas, além de serem insensíveis ao ataque de enzimas proteolíticas comuns, tais como tripsina ou pepsina, devido à presença de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e, especialmente, a reticulação das cadeias polipeptídicas por grande número de ligações dissulfeto (DAROIT & BRANDELLI, 2014). Tanto um elevado teor de cisteína, bem como um elevado teor de glicina, prolina, serina e aminoácidos ácidos, e com um teor baixo de lisina, histidina e metionina (ou a sua falta), bem como a ausência de triptofano são também característicos de queratina (KORNILLOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

Conforme suas propriedades físico-químicas, as queratinas podem ser classificadas em

“leves” ou “rígidas”, principalmente quanto ao seu conteúdo de cisteína. Quando são ricas em cisteína são subentendidas como “rígidas”, pois contém muitas ligações dissulfeto e a maioria dos aminoácidos em sua estrutura, como exemplo dessa classe são as penas e pelos, com aproximadamente 5-14 % de cisteína. Já as queratinas consideradas “leves” apresentam baixo teor de cisteína e com aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina, tendo de exemplo as queratinas presentes na pele. Além da classificação com base ao conteúdo de cisteína, pode-se classificar a queratina de acordo com a sua estrutura secundária, podendo ser α -queratina ou β -queratina. A primeira é encontrada na lã, pelos e cabelos, enquanto a β -queratina é encontrada em maior quantidade nas penas, sendo mais acessível à hidrólise quando comparada à α -queratina (DAROIT & BRANDELLI, 2014).

A resistência das queratinas, somada à sua elevada produção como resíduo, por exemplo na forma de penas, vem despertando intenso interesse na investigação da capacidade de microrganismos em degradar materiais ricos em queratina. A atenção no aproveitamento desse potencial queratinolítico de microrganismos é voltada às bactérias, uma vez que muitos fungos são patogênicos e, por isso, têm sua utilização limitada. A maioria das bactérias queratinolíticas descritas na literatura quanto a sua potencial aplicação relacionam-se ao gênero *Bacillus* (GUPTA & RAMNANI, 2006; CORRÊA, 2009).

O processo de degradação microbiana da queratina segue a mesma sequência de degradação de qualquer outro substrato sólido, ou seja, a adesão, colonização, elaboração de enzimas hidrolíticas específicas, seguida de desintegração e degradação do substrato, com a subsequente absorção dos produtos pelos microrganismos para uso como fonte de carbonos, nitrogênio, enxofre e energia. Entretanto, estudos detalhados não foram desenvolvidos para a degradação de penas, como a expressão diferencial de genes durante o processo. Porém com base na complexidade e natureza bioquímica de queratina, pode-se entender que a degradação da queratina deve incluir dois eventos principais: a sulfitólise, ou seja, a quebra de pontes dissulfeto; e a proteólise, realizada por proteases extracelulares (GUPTA *et al.*, 2013a).

Portanto, os produtos da bioconversão das penas incluem os hidrolisados proteicos derivados da degradação deste resíduo, a biomassa microbiana, e as proteases produzidas para a hidrólise das penas, que podem ser recuperados e utilizados para outras finalidades (BRANDELLI *et al.*, 2010). Particularmente, entre os produtos de elevado valor agregado obtidos a partir do bioprocessamento das penas estão as enzimas proteolíticas, que possuem ampla aplicação em diversos setores industriais tais como comerciais (KASANA *et al.*, 2011).

3.3. Proteases

As proteases foram uma classe de enzimas cuja função é a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas, liberando aminoácidos e peptídeos. Em geral, estão classificadas em dois tipos principais, que dependem do sítio de ação das enzimas nas proteínas. O primeiro tipo engloba as exopeptidases, que produzem pequenos peptídeos ou até mesmo aminoácidos iniciando o seu processo de degradação a partir das extremidades amino- (N) e/ou carboxi-terminal (C); e o segundo tipo principal é o das endopeptidases, capazes de gerar peptídeos maiores a partir da clivagem da proteína alvo em regiões distantes das extremidades amino-e/ou carboxi-terminal (BARBOSA, 2011). As endopeptidases ainda são classificadas, quanto ao tipo de sítio catalítico, em serino, cisteíno, aspartil, e metaloproteases. Já as exopeptidases são classificadas apenas em aminopeptidases ou carboxipeptidases. As aminopeptidases atuam na extremidade N-terminal livre da cadeia polipeptídica e liberam um resíduo único aminoácido, um dipeptídeo, ou um tripeptídeo, enquanto que as carboxipeptidases atuam nos terminais C da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou dipeptídeo (RAO *et al.*, 1998).

Além da classificação dependendo do sítio de ação, as proteases, possuem ainda outras classificações, dependendo das condições de pH no qual possuem atividade, sendo pH ácido, neutro ou básico; de acordo com relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em clãs, de acordo com a divergência ou convergência com um ancestral comum; e conforme o substrato que elas degradam, como colágeno (colagenase), elastina (elastase), queratina (queratinase), entre outras (RAO *et al.*, 1998). Um tipo específico de proteases são as queratinases, que possuem a capacidade de degradar substratos insolúveis ricos em queratina como, por exemplo, penas e lã, que apresentam alta estabilidade e difícil degradação (BRANDELLI, 2008).

3.3.1. Produção e uso de proteases microbianas

Proteases são produzidas por vegetais, animais e microrganismos. Nas plantas, a obtenção de proteases requer um maior tempo e disponibilidade de área para cultivo. Já nos animais, depende-se da disponibilidade de rebanho para abate e, ainda, o processo de

obtenção das proteases torna-se dispendioso. Assim, preferem-se os microrganismos como fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento e o pequeno espaço para cultivo. Os microrganismos responsáveis pela produção de proteases em nível industrial são os fungos e as bactérias (CORRÊA, 2009).

Proteases microbianas podem ser extracelulares ou intracelulares, sendo as primeiras as principais do ponto de vista de sua aplicação, pois são facilmente recuperadas após os cultivos microbianos. A produção destas enzimas é fortemente influenciada pela concentração do inóculo, nutrientes e fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido. Para detecção das proteases existem vários métodos usando diferentes substratos, naturais ou sintéticos, sendo os mais comuns caseína e azocaseína (KASANA *et al.*, 2011).

As proteases microbianas vêm sendo estudadas desde meados do século XX, quando passaram a ser utilizadas da indústria de detergentes e estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas. Assim, além do reconhecimento de que desempenham papel importante nos processos metabólicos celulares, as proteases também ganharam atenção considerável na comunidade industrial (GUPTA *et al.*, 2002). As proteases fúngicas despertam interesse devido à alta diversidade, ampla especificidade a substratos e estabilidade em condições extremas, além de oferecer a vantagem de separação de micélio por filtração simples. Estas enzimas podem ser convenientemente produzidas em processo de fermentação em estado sólido, sendo utilizadas comumente para modificar proteínas em alimentos. As proteases bacterianas têm maior importância comercial em indústrias de detergentes, alimentos, couro e seda devido à sua alta capacidade de produção e atividade catalítica. Proteases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, por serem majoritariamente extracelulares e por sua versatilidade, possuem grande potencial tecnológico e relevância comercial (JISHA *et al.*, 2013).

Processos agroindustriais, como em abatedouros de aves e bovinos, geram muitos resíduos que contêm proteínas fibrosas, como chifre, penas, cabelos e couro. No caso das penas, como já mencionado, a principal destinação é a conversão em farinha de penas, que destrói aminoácidos e requer aporte significativo de energia. Como alternativas, diversas investigações têm avaliado o melhoramento nutricional das penas e farinha de penas através de sua bioconversão por microrganismos queratinolíticos, que pode aumentar significativamente a digestibilidade e o valor nutricional destes materiais. Ainda, a adição de

proteases em rações animais vem sendo estudada para auxiliar na digestão de proteínas e, com isso, aumento de produtividade de carne, ganho de peso dos animais e carcaças (BRANDELLI *et al.*, 2010).

Além disso, enzimas proteolíticas também são cada vez mais vistas como alternativas na etapa de depilação de couros em curtumes, para evitar problemas ambientais criados pelo método tradicional. Os métodos convencionais de processamento de couro podem causar poluição e riscos ambientais, devido a utilização de grandes quantidades de água e produtos tóxicos, como sulfato básico de cromo e sulfeto de sódio gerando um volume considerável de efluente com elevada carga orgânica e considerável volume de resíduos sólidos que se não destinados adequadamente vão parar no meio ambiente. Além disso, os sulfetos podem gerar gases tóxicos e anions, como H_2S , HS^- e S^{2-} o que pode causar irritação dos olhos (DETTMER, 2012).

O potencial para a aplicação de enzimas na depilação para produção de couro é considerável, por causa das propriedades de enzimas como catalisadores altamente eficientes e seletivos, o que reduz o teor em sulfureto do efluente, permitindo a recuperação de pelos íntegros (GIONGO, 2006). Assim, por razões ambientais, o biotratamento de couro utilizando abordagem enzimática vem ganhando mercado, em que o uso proteases acelera o processo de depilação. Condições alcalinas permitem o inchaço do bulbo capilar e facilitam o ataque subsequente das proteases sobre as proteínas foliculo piloso, permitindo a fácil remoção dos pelos (GUPTA *et al.*, 2002), além de que a utilização de enzimas tem como outra grande vantagem a redução nos níveis de demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio do efluente final do processo convencional de depilação de couro usando sulfetos (DETTMER, 2012). Entretanto, apesar da depilação de couro por enzima bacteriana ser bastante pesquisada e já utilizada em alguns países, aqui no Brasil, em específico o Rio Grande do Sul, uma pesquisa feita por Aquim *et al.* (2010) nos curtumes, verificaram que nos dez curtumes pesquisados, nenhum deles utilizava enzimas na etapa de depilação, sendo que 78 % usam sulfetos nesta etapa, enquanto que 22 % fazem uso conjunto de sulfetos e auxiliares, que contribuem para a redução do uso de sulfetos.

Outra aplicação biotecnológica é na indústria têxtil, em que são utilizados produtos perigosos ao meio ambiente, para controlar o encolhimento de fibras de lã. Ainda, outros processos envolvidos no acabamento, incluindo a limpeza (lavagem), branqueamento ou tingimento, também causam a descarga de uma variedade de produtos químicos tóxicos.

Assim a utilização de enzimas é considerada como alternativa ecologicamente segura que vem sendo explorada em vários processos de acabamentos têxteis (GUPTA *et al.*, 2013b).

Proteases derivadas de *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Conidiobolus coronatus*, *avermectinus* também vêm sendo usadas na recuperação da prata de filmes de raios-X após descarte. A quantidade de prata nesses filmes varia entre 1,5 a 2,0 %, e os métodos tradicionais para a recuperação de prata são a queima direta, a oxidação da prata metálica seguida de eletrólise, e a remoção da camada de gelatina-prata utilizando soluções químicas. Portanto, a hidrólise enzimática de gelatina é uma opção para minimizar potenciais impactos ambientais (SINGHAL *et al.*, 2012).

Em laticínios, a principal aplicação de proteases microbianas é a coagulação do leite na fabricação de queijos, substituindo o tradicional coalho que é retirado do rúmen de bezerros. As proteases utilizadas podem ser obtidas de bactérias do gênero *Bacillus*, mas é mais comum o uso de proteases fúngicas (SANCHEZ & DEMAIN, 2010). Na produção de alimentos que passam por algum processamento tem-se a redução de algumas características das proteínas, como a capacidade de retenção de água e gordura, da solubilidade e da capacidade emulsificante. Por isso, a indústria alimentícia tem recorrido à hidrólise enzimática de proteínas, tanto para não reduzir o valor nutricional, quanto para modular a funcionalidade das proteínas. Uma destas aplicações, por exemplo, é o uso de proteases para a hidrólise de proteína de soja, tomando-a solúvel para a utilização em bebidas (GIONGO, 2006). Mais recentemente, proteases têm sido avaliadas na hidrólise de proteínas para obtenção de peptídeos bioativos (capacidade antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, antidiabética) (PHELAN *et al.*, 2009).

Neste contexto, as proteases são insumos altamente valorizados para aplicações comerciais e industriais, por apresentarem ação rápida e eficiente, normalmente em concentrações baixas, em pH próximos à neutralidade e em temperaturas moderadas, o que requer pouco aporte energético e conseqüentemente menores custos. Além disso, apresentam alta especificidade em relação ao substrato e a reação catalisada, baixa toxicidade e facilidade de controle da taxa e finalização da reação (BHUNIA *et al.*, 2012). Assim, por estas características, as proteases microbianas representam grande parcela do total de enzimas utilizadas em processos industriais (SANCHEZ & DEMAIN, 2010).

Com vista à produção de proteases em escala industrial, a opção por subprodutos como substratos é uma alternativa econômica que torna o processo mais barato. Com isso

podem ser usados os resíduos ricos em queratina, uma proteína de baixo valor nutricional, mas que muitas vezes fornecem fontes aceitáveis de nutrientes para o desenvolvimento da cultura bacteriana. Além disso, é importante caracterizar a protease bruta, para verificar quais são as melhores condições de pH, temperatura, efeitos de agentes químicos para maximizar a sua atividade de reação (WEIJERS & RIET, 1992; ILLANES, 1999).

3.4. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é um dos maiores em microbiologia e compreende bactérias Gram-positivas em forma de bastonete, formadoras de esporo, aeróbias ou anaeróbias facultativas. Bactérias deste gênero são agrupadas conforme suas exigências físico-químicas, nutricionais, genéticas e, embora sejam fenotipicamente similares entre si, podem ser facilmente identificadas e diferenciadas por estudos de DNA. *Bacillus* são organismos com grande interesse industrial por possuírem diversas características especiais, como sua alta taxa de crescimento e a capacidade de secretar grande quantidade de proteínas para o meio extracelular. Algumas vantagens de cultivar *Bacillus* aos demais gêneros podem ser citadas, como a sua não patogenicidade, fácil manipulação pelas técnicas atuais, cultivada mais facilmente e com maiores taxas de síntese de proteínas do que muitos sistemas eucarióticos, além de que é capaz de secretar uma grande variedade de proteínas muito além de sua concorrente, a *Escherichia coli* (SCHAMLLMEY *et al.*, 2004; GIONGO, 2006; CORRÊA, 2009).

A produção de proteases por *Bacillus* é fortemente influenciada por fatores físicos tais como o pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos, sendo sugerido que a produção de proteases extracelulares seja uma manifestação da limitação de nutrientes e seu rendimento de biomassa é exponencial. O meio de cultivo no caso desse microrganismo deve conter uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e mais alguns fatores para otimizar o desenvolvimento da linhagem, por isso deve-se optar por um substrato como algum subproduto de algum processo industrial, pois o aproveitamento de um resíduo torna o processo mais barato e fornece na maioria das vezes as fontes aceitáveis para a cultura bacteriana (BHUNIA *et al.*, 2012; DAROIT & BRANDELLI, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A bactéria utilizada neste estudo, denominada CL18, foi isolada a partir de amostra de solo (OLIVEIRA & DAROIT, 2013) e o potencial proteolítico foi previamente avaliado (OLIVEIRA & DAROIT, 2014). Este isolado foi identificado, no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como espécie do gênero *Bacillus*, sendo então denominado *Bacillus* sp. CL18. O isolado foi mantido em placas de Ágar Triptona de Soja (TSA), sob refrigeração, e repicado periodicamente no mesmo meio de cultura.

4.2. Degradação de penas pelo isolado CL18

4.2.1. Meio de cultura, inoculação e cultivos

O meio de cultura Caldo Pena (CP), utilizado para cultivar o isolado CL18 foi composto por Meio Mineral (MM; 0,3 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,4 g L⁻¹ KH₂PO₄; e 0,5 g L⁻¹ NaCl) e penas de frango (10 g L⁻¹). Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio CP, com pH inicial ajustado para 7 utilizando NaOH (1 mol L⁻¹), foram esterilizados utilizando autoclave (121 °C, 1,1 atm de pressão, 15 min). Os meios de cultura foram inoculados com 1 mL de uma suspensão bacteriana preparada em solução salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl), com absorbância de 0,5-0,6 unidades, mensurada a 600 nm em espectrofotômetro.

Após inoculação, os meios foram incubados em estufa com agitação orbital (30 °C, 125 rpm) por até 7 dias. A cada 24 h de cultivo, Erlenmeyers foram retirados (amostras de sacrifício) para avaliação da degradação de penas (massa seca), atividade enzimática, e determinação de proteína solúvel.

4.2.2. Determinação da massa seca das penas

Para esta determinação, os meios de cultura retirados diariamente foram filtrados através de filtro de papel com massa determinada previamente. Após a filtração, o material

retido foi levado a estufa (60 °C) até atingir massa constante. Calculou-se, então, a diferença entre a massa do filtro antes da filtração e depois da filtração com o material retido, comparando-se com a massa inicial das penas (100 %).

Os filtrados foram centrifugados (10.000 g por 5 min) e alíquotas dos sobrenadantes foram utilizadas nos ensaios da atividade enzimática e proteína solúvel.

4.2.3. Ensaio de atividade enzimática

Neste ensaio foi verificada a produção de proteases com o passar do tempo de cultivo do isolado CL18 em CP. Para tal ensaio, 100 µL do sobrenadante do cultivo, convenientemente diluído em tampão Tris-HCl (0,1 mol L⁻¹; pH 8,0), foram adicionados a 300 µL do substrato enzimático azocaseína (1 %, m v⁻¹) e 100 µL de tampão Tris-HCl (0,1 mol L⁻¹; pH 8,0), sendo então esta mistura incubada em banho-maria a 40 °C por 15 minutos. Após este período, foram adicionados 600 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA; 10 %, m v⁻¹) para finalizar a reação. Na sequência, o meio reacional foi centrifugado (10.000 g por 5 min), e 800 µL do sobrenadante foram coletados e adicionados a 200 µL de NaOH (1,8 N). Então, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 420 nm. Para cada ensaio foi confeccionado um controle, onde a adição do TCA ocorreu antes da adição do sobrenadante para evitar a reação enzimática.

Os resultados foram expressos em unidade de atividade proteolítica (U), que foi definida como sendo a quantidade de enzima que provocou aumento de 0,1 unidade de absorbância nas condições do ensaio.

4.2.4. Determinação de proteína solúvel

Para determinar a concentração de proteína solúvel, utilizou-se do método descrito por Lowry *et al.* (1951), com o emprego do reagente de Folin-Ciocalteu. Para tal, foram preparados dois reagentes (A e B). O primeiro consistiu na mistura entre 50 mL de solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) contendo Na₂CO₃ (20 g L⁻¹) e 1 mL de solução contendo sulfato de cobre (5 g L⁻¹) e tartarato de sódio e potássio (10 g L⁻¹); já o reagente B consiste em solução formada pelo reagente de Folin-Ciocalteu e água destilada na proporção 1:1. Para a realização dos ensaios, 100 µL de cada sobrenadante de meio de cultura, convenientemente

diluído em água destilada, foram adicionados a 2,5 mL do reagente A, e esta mistura foi incubada por 10 min em temperatura ambiente, no escuro. Após, 300 μ L do reagente B foram adicionados, e esta mistura incubada por 30 min em temperatura ambiente, também em ambiente escuro. Transcorrido este tempo, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 750 nm. Curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina (1 mg mL⁻¹) para interpretação dos dados de absorbância obtidos.

4.3. Caracterização da protease bruta produzida pelo isolado CL18 em CP

Cultivos do isolado CL18, realizados em CP por 4 dias (30 °C e 125 rpm), foram centrifugados (10.000 g por 5 min), e o sobrenadante utilizado como fonte de proteases (protease bruta).

4.3.1. Determinação de pH e temperatura ótimos

A determinação do pH e da temperatura (T) ótimos consistiu em mensurar a atividade enzimática (proteolítica) em diferentes condições de temperatura de incubação e de pH da solução tampão. Para este experimento, duas metodologias diferentes foram utilizadas, que são descritas a seguir.

Na primeira metodologia, ensaios enzimáticos foram realizados a 40 °C em diferentes condições de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0) para determinar o pH que resultou na melhor atividade enzimática; após, a atividade enzimática foi determinada no pH ótimo, variando-se a temperatura de incubação (30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C) para a determinação da temperatura ótima. Estes ensaios foram realizados em duplicata, sendo que para cada ensaio foi confeccionado um controle adequado.

Na segunda metodologia, as condições ótimas de pH e temperatura para a atividade enzimática foram avaliadas através de delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² completo. Foram estabelecidos dois níveis para cada variável (lineares; +1 e -1), quatro repetições no ponto central (0 e 0), além dos pontos axiais (quadráticos; +1,41 e -1,41), a fim de minimizar o número de ensaios necessários para serem realizados. A Tabela 1 apresenta as combinações das variáveis independentes (pH e temperatura), em valores codificados e reais, para os 12 experimentos realizados.

Tabela 1: Combinações de temperatura e pH nos ensaios do DCCR 2^2 para avaliação da atividade proteolítica

Ensaio	T (cod)	T (°C)	pH (cod)	pH
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 avaliada correspondeu à atividade proteolítica ($U\ mL^{-1}$). Os resultados foram avaliados utilizando o *software* Statistica 5.0. Coeficientes gerados por análise de regressão ($p < 0,05$) foram utilizados para elaborar modelo matemático capaz de explicar os efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática. O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e análise de variância (ANOVA). Na ANOVA foram comparadas as variâncias das regressões dos experimentos com a variância dos erros experimentais/falta de ajuste, considerando os graus de liberdade (5 para os ensaios; e 6 para o erro + falta de ajuste). A validação do modelo permitiu a elaboração de gráfico de superfície de resposta.

4.3.2. Cinética de atividade em azocaseína

O efeito de diferentes concentrações do substrato enzimático azocaseína ($0,06-6,0\ mg\ mL^{-1}$) sobre a atividade da protease bruta foi avaliado nas condições ótimas de pH e temperatura. A partir dos resultados, os valores de K_m e V_{max} para a protease bruta foram obtidos através de regressão não linear utilizando a equação de Michaelis-Menten. Nesta

análise foi empregado o *software* Statistica 5.0.

4.3.3. Efeito de sais, reagentes e inibidores sobre a atividade da protease bruta

Estes experimentos consistiram em verificar efeitos de diversas substâncias e compostos sobre a atividade proteolítica, em condições ótimas de temperatura e pH, utilizando azocaseína como substrato.

Os sais testados, nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹, foram CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MnCl₂, MgCl₂ e ZnCl₂. Os reagentes avaliados foram Triton X-100 (0,5% e 1,0%, v v⁻¹), Tween 20 (0,5 % e 1,0 %, v v⁻¹), Etanol (0,5 % e 1,0 %, v v⁻¹), Dimetilsulfóxido (DMSO; 0,5 % e 1,0 %, v v⁻¹), Dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,05 % e 0,10 %, m v⁻¹) e β-Mercaptoetanol (0,1 %, 0,5 % e 1,0 %, v v⁻¹). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para cada ensaio foram confeccionados controles negativos adequados, contendo a substância a ser testada, mas com a solução de TCA sendo adicionada antes da protease bruta.

Os inibidores testados foram o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), 1-10 fenantrolina e fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹. Neste experimento, a protease bruta foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos na presença do inibidor e ausência de substrato. Após este período a atividade proteolítica foi mensurada, em duplicatas, utilizando azocaseína como substrato.

Os resultados foram expressos em termos de atividade relativa (%), considerando-se o controle positivo (sem a adição da substância testada) como 100 %.

4.3.4. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da protease bruta produzida pelo isolado CL18 foi avaliada nas temperaturas de 45,0, 50,0, 52,5, 55,0, 57,5 e 60,0 °C. Para tanto, a protease bruta foi pré-incubada (em tampão Tris-HCl 100 mmol L⁻¹, pH 8,0) por diferentes intervalos de tempo:

- 45,0-55,0 °C: 0, 4, 8, 12, 16 e 20 min;
- 57,5 °C: 0, 3, 6, 9 e 12 min;
- 60,0 °C: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 min.

Após o período de pré-incubação nas respectivas temperaturas em banho-maria, os

microtubos contendo a protease bruta foram retirados e levados a banho de gelo para parar a reação de inativação térmica.

Na sequência, a protease pré-incubada foi submetida ao ensaio enzimático com o substrato azocaseína nas condições ótimas de pH e temperatura pré-determinadas. A atividade enzimática obtida no tempo zero foi considerada como 100 %, e os demais resultados foram apresentados como atividade residual (%). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.5. Atuação da protease bruta na hidrólise de diferentes substratos proteicos

A atuação da protease bruta produzida pelo isolado CL18 também foi avaliada através da incubação da enzima em meios reacionais contendo diferentes substratos orgânicos (penas, farinha de penas, cabelos, albumina, proteína isolada de soja, e caseína) na concentração de 10 g L⁻¹. Frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de tampão Tris-HCl (100 mmol L⁻¹, pH 8,0) e 0,25 g do respectivo substrato orgânico foram pré-incubados a 50 °C por 10 min para estabilização da temperatura em banho-maria com agitação recíprocante. Na sequência, 500 µL da protease bruta foram adicionados para iniciar a reação e a incubação ocorreu a 50 °C, também sob agitação, por 4 h.

Amostras de 500 µL foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h de incubação, sendo adicionados 500 µL de TCA (10 %, m v⁻¹) para finalizar a reação. Após centrifugação (10.000 g por 5 min), o sobrenadante foi convenientemente diluído em água destilada e a leitura da absorbância foi realizada a 280 nm em espectrofotômetro.

Todos os ensaios descritos foram realizados, pelo menos, em duplicatas e os resultados estão expressos em unidades de absorbância a 280 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bacillus sp. CL18 foi previamente isolado e avaliado quanto à potencial produção de proteases e crescimento em placas de Ágar Farinha de Penas em diferentes condições de temperatura e pH (OLIVEIRA & DAROIT, 2014), indicando seu potencial proteolítico e queratinolítico. Desta forma, foi selecionado para o estudo da capacidade de degradação de penas e produção de proteases extracelulares em cultivos submersos.

5.1. Degradação de penas por *Bacillus* sp. CL18

A degradação de penas foi avaliada durante cultivos em Caldo Pena, realizados a 30 °C em estufa orbital com agitação (125 rpm). A Figura 1 apresenta a massa remanescente de penas (em porcentagem) em relação a massa inicial, bem como a concentração da proteína solúvel, nos respectivos tempos de cultivo. Pode ser observado que, no quarto dia de cultivo, aproximadamente 96 % das penas haviam sido solubilizadas. Em relação à proteína solúvel, observou-se aumento da concentração com o passar dos dias de cultivos, com valores máximos aos 4 dias (~3,1 mg mL⁻¹), e posteriormente apresentando um padrão de estabilização.

Para efeito de comparação, Villa *et al.* (2013), utilizando penas como substrato, avaliaram capacidade queratinolítica de *Bacillus subtilis*, e observaram que a degradação de penas variou de 90-95 %, após 5 dias de cultivo. Queiroga *et al.* (2012) avaliaram cinco isolados bacterianos do gênero *Bacillus* quanto à sua capacidade queratinolítica, e observaram que a degradação de penas variou de 12 % a 67 %, dependendo da bactéria, após 4 dias de cultivo. Assim, *Bacillus* sp. CL18 pode ser considerado entre aqueles considerados como possuidores de elevada capacidade de degradação de penas.

O aumento na concentração de proteína solúvel em cultivos submersos é geralmente considerado como medida da digestão de resíduos queratinosos (SZABO *et al.*, 2000). Nagal e Jain (2010) avaliaram oito bactérias do gênero *Bacillus* quanto à liberação de proteína solúvel, apresentando o maior nível após 6 dias de cultivo, relativamente superior aos 4 dias obtidos em cultivos com *Bacillus* sp. CL 18.

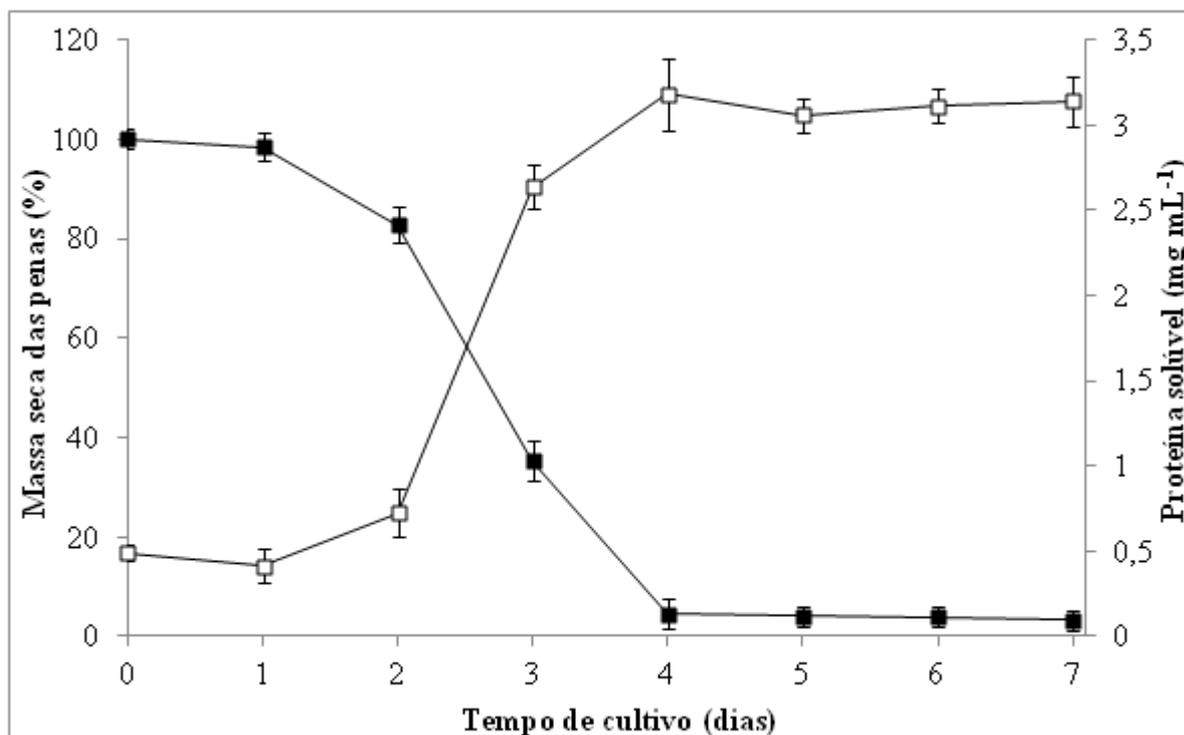


Figura 1: Massa seca das penas (%), ■ e concentração de proteína solúvel (mg mL⁻¹), □ durante o cultivo de *Bacillus* sp. CL 18 em Caldo Pena, com os respectivos desvios padrão.

A eficiência desta bactéria na degradação de penas sugere sua potencial utilização em processos de bioconversão. O fato de a bactéria degradar penas em condições moderadas de temperatura e pH indica diminuição do aporte energético para este bioprocessamento, bem como a redução da geração de efluentes que necessitem tratamento posterior. Os hidrolisados proteicos obtidos a partir da degradação de penas podem ser utilizados como fertilizantes nitrogenados, ingredientes de rações para animais, produção de biocombustíveis, entre outras aplicações (BRANDELLI *et al.*, 2010). Entretanto, a avaliação destas possibilidades depende de pesquisas futuras.

5.2. Produção de protease durante cultivos em Caldo Pena

A produção de proteases é capacidade intrínseca de microrganismos, que necessitam de uma fonte de energia, carbono e nitrogênio para o crescimento microbiano (GUPTA *et al.*, 2002). No presente estudo, os únicos substratos orgânicos para a nutrição e crescimento de *Bacillus* sp. CL18 foram representados pelas penas, que são formadas por proteínas do tipo queratina (~90 %, m v⁻¹). A capacidade microbiana de degradação deste substrato usualmente

está relacionada à produção de enzimas proteolíticas extracelulares (GUPTA & RAMNANI, 2006).

O perfil de produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 durante cultivos em CP é apresentado na Figura 2. Foi possível observar que o pico de produção ocorreu no 4º dia de cultivo (~160 U mL⁻¹), mantendo-se relativamente estável até o final da incubação.

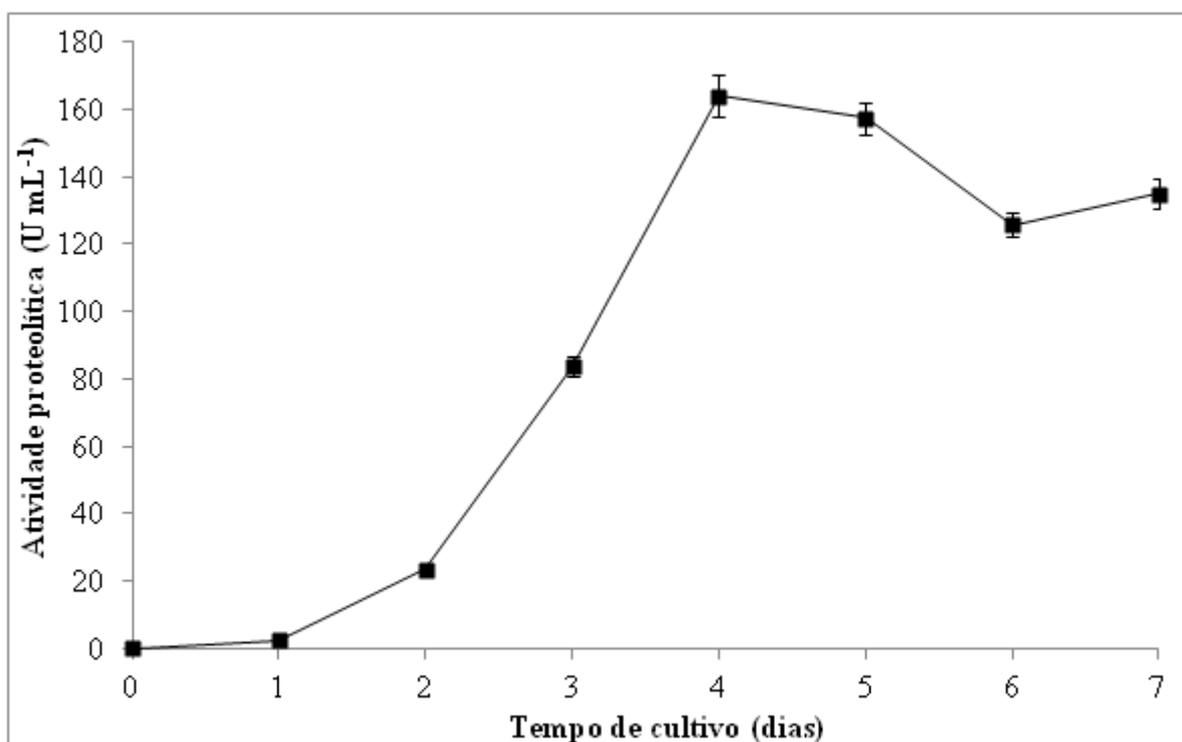


Figura 2: Produção de proteases extracelulares (U mL⁻¹) por *Bacillus* sp. CL 18 durante cultivos em Caldo Pena, com os respectivos desvios padrão.

Em estudo similar, Nilegaonkar *et al.* (2007) obtiveram a máxima produção de proteases pela bactéria *Bacillus cereus* MCM B-326 em 36 h de cultivo em meio contendo farelo de soja nas condições ótimas de temperatura e pH. Já em meio de cultivo contendo penas nativas, Riffel *et al.* (2003) avaliaram a capacidade queratinolítica do microrganismo *Chryseobacterium* sp. kr6, verificando a máxima produção de protease queratinolítica em 48 horas de cultivo a 30 °C e pH 8,0. Considerando a ampla produção de penas pela indústria avícola, estes resíduos representam potenciais substratos, amplamente disponíveis e de baixo custo, para a produção de proteases microbianas (BRANDELLI, 2008).

5.3. Caracterização da protease bruta produzida por *Bacillus* sp. CL18

Proteases microbianas são insumos tecnológicos valorizados, representando um dos principais grupos de enzimas produzidas industrialmente, respondendo por aproximadamente 2/3 das vendas globais de enzimas (KASANA *et al.*, 2011). Estas enzimas são utilizadas na indústria de alimentos, couros, detergentes, entre outras (GUPTA *et al.*, 2002). Portanto, a bioconversão microbiana das penas representa tanto uma estratégia para a destinação destes resíduos quanto uma forma para agregação de valor (DAROIT & BRANDELLI, 2014). No entanto, o uso comercial/industrial de enzimas microbianas necessita que sejam caracterizadas para indicar possíveis aplicações. Assim, a protease bruta produzida por *Bacillus* sp. CL18 nos cultivos em Caldo Pena foi submetida a processo de caracterização.

5.3.1. Temperatura e pH ótimos

Os efeitos da temperatura e pH sobre a atividade da protease extracelular do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18 foram avaliadas com duas metodologias diferentes. Primeiramente variou-se o pH de 6 a 10 em ensaios realizados a 40 °C; e depois variou-se a temperatura de 30 a 80 °C no pH ótimo (Figura 3).

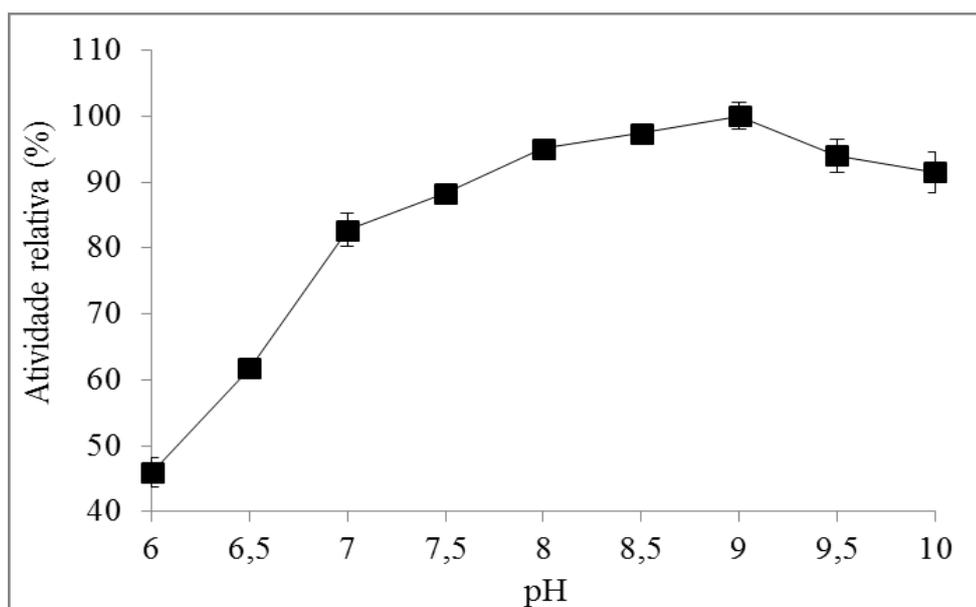


Figura 3: Efeito da variação de pH sobre a atividade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL 18, avaliada a 40 °C, com os respectivos desvios padrão.

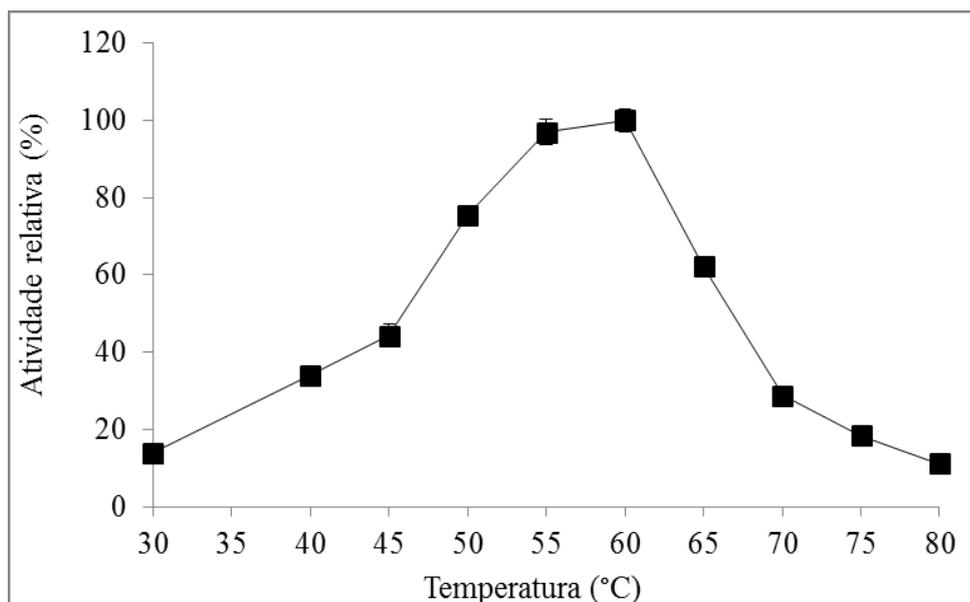


Figura 4: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL 18, em pH 9,0, com os respectivos desvios padrão.

Observou-se aumento da atividade da protease com o incremento do pH, alcançando valores máximos em pH 9,0, o que indica um caráter levemente alcalino, e decrescendo em valores superiores de pH. Em relação à temperatura, a máxima atividade da protease bruta (em pH 9,0) ocorreu a 60 °C (Figura 4), sendo que a 55 °C foi observada aproximadamente 97% da atividade máxima.

A segunda metodologia utilizada na avaliação do pH e temperatura ótimos foi através da utilização de DCCR 2² completo. Na Tabela 2 são apresentados os resultados da atividade enzimática (variável dependente) nos experimentos realizados em diferentes combinações de temperatura e pH (variáveis independentes).

Foi possível observar que os maiores valores de atividade proteolítica ocorreram a 55 °C e pH 8,0, ou seja, no ponto central do experimento (Tabelas 2 e 3). O aumento linear da temperatura, de 44,4 °C (-1) para 65,6 °C (+1), provocou leve efeito positivo sobre a atividade enzimática. Além disso, o efeito quadrático da temperatura [40 °C (-1,41) e 70 °C (+1,41)] apresentou elevado efeito negativo, indicando menor atividade enzimática a 40 °C e uma possível desnaturação enzimática no limite superior (70 °C).

Quanto ao pH, o efeito linear foi positivo e o efeito quadrático negativo, sugerindo que nos extremos de pH testados (6,0 e 10,0) as proteases na preparação bruta podem ter sofrido

modificações conformacionais, por exemplo através de efeitos em grupos funcionais de aminoácidos, que resultaram em menor atividade.

Tabela 2: Atividade proteolítica (U mL⁻¹) em diferentes combinações de temperatura (T) e pH do DCCR 2².

Ensaio	T (cod)	T (°C)	pH (cod)	pH real	U mL ⁻¹
1	1	65,6	1	9,4	134
2	1	65,6	-1	6,6	205
3	-1	44,4	-1	6,6	99
4	-1	44,4	1	9,4	132
5	1,41	70,0	0	8,0	120
6	-1,41	40,0	0	8,0	93
7	0	55,0	1,41	10,0	214
8	0	55,0	-1,41	6,0	145
9	0	55,0	0	8,0	281
10	0	55,0	0	8,0	280
11	0	55,0	0	8,0	269
12	0	55,0	0	8,0	284

Utilizando o *software* Statistica (5.0), as respectivas estimativas de efeito das variáveis foram calculadas, sendo que todas as variáveis avaliadas foram significativas ($p < 0,05$; Tabela 3). Através de análise de regressão dos dados experimentais, os coeficientes obtidos foram utilizados para a construção de modelo matemático que pudesse prever a atividade enzimática (U mL⁻¹) nos intervalos de temperatura e pH investigados. A seguinte equação foi obtida:

$$Y = 278,5 + 18,313 T - 86,436 T^2 + 7,433 \text{ pH} - 49,717 \text{ pH}^2 - 26 T \text{ pH}$$

em que Y é a atividade enzimática (U mL⁻¹), T é a temperatura (em valores codificados), e pH é o valor de pH (em valores codificados). A validade do modelo foi verificada por Análise de Variância (ANOVA; Tabela 4).

Tabela 3: Estimativas de efeito das variáveis e as respectivas interações sobre a atividade enzimática.

Variáveis	Efeito (U/mL)	Erro padrão	valor- <i>p</i>
Média	278,49	3,27	0,000004
Temperatura (T) (Linear)	36,62	4,64	0,004247
T x T	-172,87	5,20	0,000060
pH (Linear)	14,86	4,64	0,049276
pH x pH	-99,43	5,20	0,000313
T x pH	-52,00	6,55	0,004181

Tabela 4: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes (pH e T) sobre a atividade proteolítica.

Fonte de Variação	SS ^a	df ^b
T	2.675,01	1
T x T	47.418,62	1
pH	440,72	1
pH x pH	15.688,42	1
T x pH	2.704,00	1
Total Regressão	68.926,77	5
MS ^c da Regressão		13.785,35
Falta de ajuste	2.906,45	3
Erro puro	129,00	3
Total Residual	3.035,45	6
MS Residual		505,91
<i>Valor F-calculado</i> (MS da Regressão/MS Residual)		27,24
<i>Valor F-tabelado</i> (F _{0,95; 5df,6df})		4,39

^a SS: soma dos quadrados.

^b df: graus de liberdade.

^c MS: média dos quadrados.

Como pôde ser verificado, o valor de F-calculado a partir da regressão foi 6,2 vezes maior que o valor de F-tabelado (Tabela 4). Isto demonstra a validade e significância do modelo (em nível de 95 %) para descrição da atividade enzimática nas diferentes condições de temperatura e pH. O coeficiente R² igual a 0,95 indica que 95 % da variabilidade

observada nos ensaios pode ser explicada pelo modelo. Utilizando o modelo matemático, foi construído o gráfico de superfície resposta, apresentado na Figura 5.

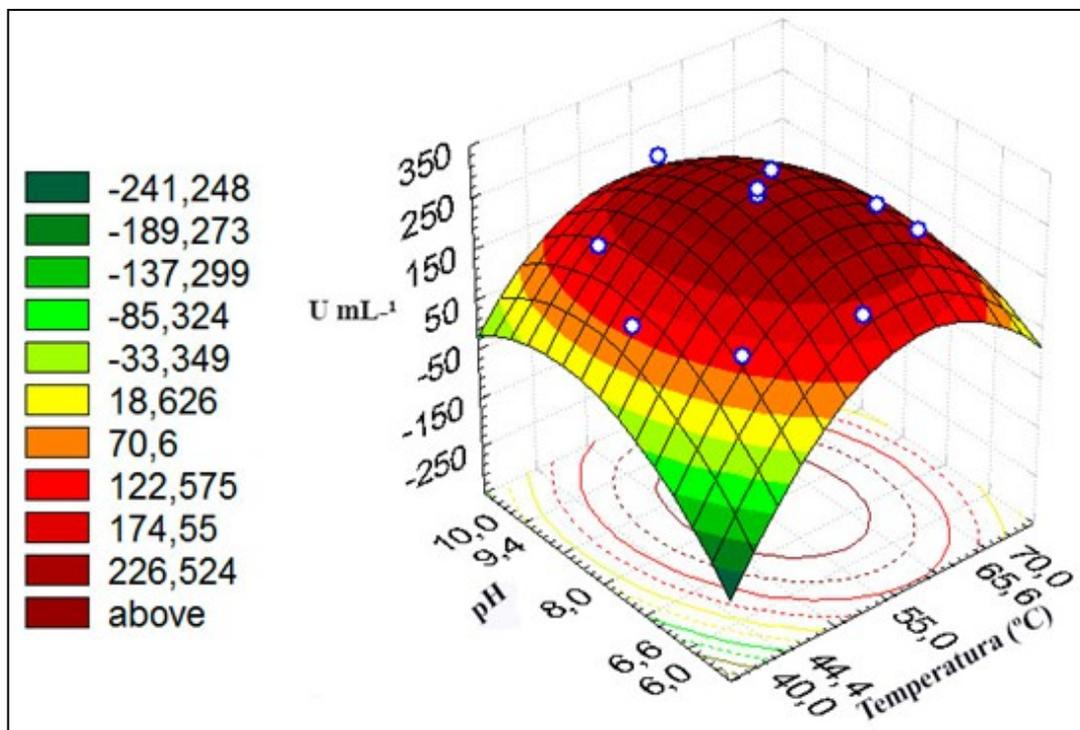


Figura 5: Superfície resposta para os efeitos de pH e temperatura sobre a atividade da protease extracelular de *Bacillus* sp. CL 18.

O uso de técnicas para otimizar a atividade das proteases, como a superfície resposta, permite otimizar condições de bioprocessos em menor número de ensaios e mesmo observar o efeito de interações entre variáveis para obtenção das condições ótimas (MANDENIUS & BRUNDIN, 2008). Especificamente, atividade ótima foi observada em temperaturas de 50-62 °C e valores de pH entre 7,0 e 9,2 (Figura 5). Assim, o experimento permite a construção de janelas operacionais para a máxima atividade enzimática. No que se refere a bioprocessos enzimáticos, tal versatilidade permite escolher condições reacionais adequadas para diferentes propósitos, utilizando diversas combinações de temperatura e pH nas quais o biocatalisador atua de forma ótima.

A análise da superfície de resposta mostra que os ensaios contendo pH mais ácidos e aqueles contendo pH mais básicos que o pH central de 8,0 resultaram em atividade enzimática menor, demonstrando que o pH bem como a temperatura influenciam na atividade da protease produzida pelo isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18. Com base nos resultados, as condições

de temperatura e pH ótimo para a atividade enzimática foram determinados como sendo 55 °C e pH 8.0.

Govarathanan *et al.* (2015) obtiveram temperatura ótima de 60 °C e pH 8,0 para protease purificada a partir do cultivo em penas da bactéria denominada *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. Já Zhang *et al.* (2009), em estudo utilizando a bactéria *Bacillus* sp. 50-3, caracterizaram a protease queratinolítica produzida em cultivo com farinha de penas, exibindo a maior atividade enzimática em na faixa de pH de 7,0-11,0 e temperatura entre 50 e 70 °C, sendo o pH e a temperatura ótimos de 10,0 e 60 °C, respectivamente. Hassan *et al.* (2013), obtiveram condições de temperatura e pH ótimos de 60 °C e 9,0, respectivamente, para proteases produzidas pelas bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* MA20 e *Bacillus subtilis* MA21 cultivadas em meio mineral contendo lã de ovelha. Nejad *et al.* (2009), a partir do isolado bacteriano denominado *Bacillus licheniformis* BBRC 100053, obtiveram as condições ótimas de pH de 8 e temperatura de 45 °C para as proteases obtidas a partir do cultivo em meio contendo lactose, maltose e peptona.

Tendo em vista processos industriais, enzimas que permanecem ativas em uma ampla faixa de pH possuem vantagens, como não requisitar um grande controle para esse parâmetro, além da diminuição dos gastos através da redução no uso de agentes tamponantes (RAO *et al.*, 1998). Quanto à temperatura, sua elevação provoca aumento da atividade proteolítica até certo ponto, próximo à temperatura máxima, sendo que a continuação do seu incremento pode provocar a desnaturação e, com isso, perda da atividade enzimática. Assim a temperatura é uma variável crucial em qualquer processo biocatalítico (ILLANES, 1999). A temperatura ótima não muito elevada e pH ligeiramente alcalino, apresenta vantagens relacionadas a processos enzimáticos, não requerendo aporte energético muito elevado, e além disso não é necessário tratar o efluente do processo enzimático (DAROIT *et al.*, 2011).

5.3.2. Estabilidade Térmica

A termoestabilidade permite avaliar o comportamento da enzima em bioprocessos, bem como a estabilidade em armazenamento. A estabilidade térmica da protease bruta foi avaliada através da pré-incubação da enzima em temperaturas distintas, entre 45 a 60 °C, por diferentes intervalos de tempo. Na sequência, a atividade residual (%) foi avaliada nas condições ótimas de temperatura e pH, e os resultados apresentados na Figura 6.

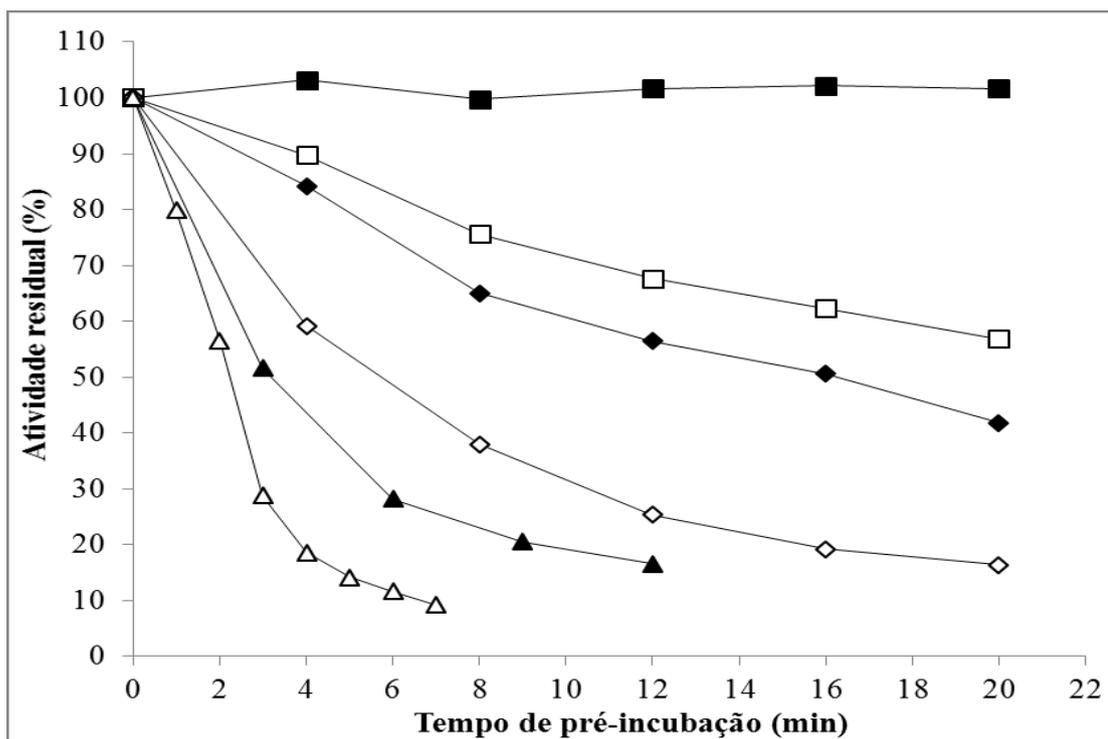


Figura 6: Estabilidade térmica da protease a 45,0 °C (■), 50,0 °C (□), 52,5 °C (◆), 55,0 °C (◇), 57,5 °C (▲), 60,0 °C (△).

Na temperatura de 45,0 °C pode-se observar que a atividade residual não foi afetada, indicando que, nesta temperatura, processos como a desnaturação térmica não ocorreram. No entanto, quando pré-incubada a 50, 52,5, 55, 57,5 e 60 °C a protease bruta apresentou decréscimo na atividade residual. A 60 °C, 95 % da atividade inicial foi perdida após pré-incubação por 7 min (Figura 6). O incremento da temperatura (de 50 °C a 60 °C) resultou em inativação mais rápida, e os resultados observados durante a pré-incubação da protease bruta na temperatura ótima (55 °C) indicam potencial função do substrato na manutenção da conformação do sítio ativo das proteases. Nestas condições, os efeitos de redução da atividade enzimática devem-se possivelmente ao efeito da temperatura como agente de desnaturação das proteases (ILLANES, 1999).

De forma similar ao observado neste estudo, protease bruta de *Bacillus licheniformis* BBRC 100053 manteve 48 %, 40 % e 12 % da atividade inicial após pré-incubação a 40, 50 e 60 °C, respectivamente, por 30 minutos (NEJAD *et al.*, 2009), e resultados semelhantes foram observados para protease bruta de *Bacillus subtilis* linhagem 38 (CHANTAWANNAKUL *et al.*, 2002), bem como de outras proteases produzidas por espécies de *Bacillus* (CORRÊA, 2009; DAROIT *et al.*, 2010).

Por outro lado, a protease produzida pela bactéria termofílica *Bacillus* sp. HUTBS62 demonstrou estabilidade a 50 ° C durante 2 h, enquanto que a 60 e 100 ° C, a atividade enzimática foi diminuída em 28 % e 73 % da atividade original, respectivamente, sendo o tempo de meia vida ser de 6 h, 4 h e 3 h a 70, 80 e 90 ° C, respectivamente (AQEL *et al.*, 2012). Em outro estudo, de um isolado bacteriano denominado *Bacillus* sp. N-40, a atividade da enzima foi verificada como sendo estável nas temperaturas de 40 a 70 ° C, estando ainda ativa a 80 ° C; a 55 ° C, a enzima preservou 77 % da atividade inicial após 3 horas (SEVINC & DEMIRKAN, 2011).

Os dados da Figura 6 foram utilizados para confeccionar gráfico semilogarítmico da atividade residual *versus* tempo de pré-incubação (Figura 7). O processo de inativação da protease bruta seguiu, aparentemente, uma cinética de primeira-ordem, o que é sugerido pelos altos valores de R^2 obtidos para as diferentes temperaturas. Assim, o comportamento da fração ativa da protease bruta do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL 18 em função do tempo de pré-incubação é representado por uma reta.

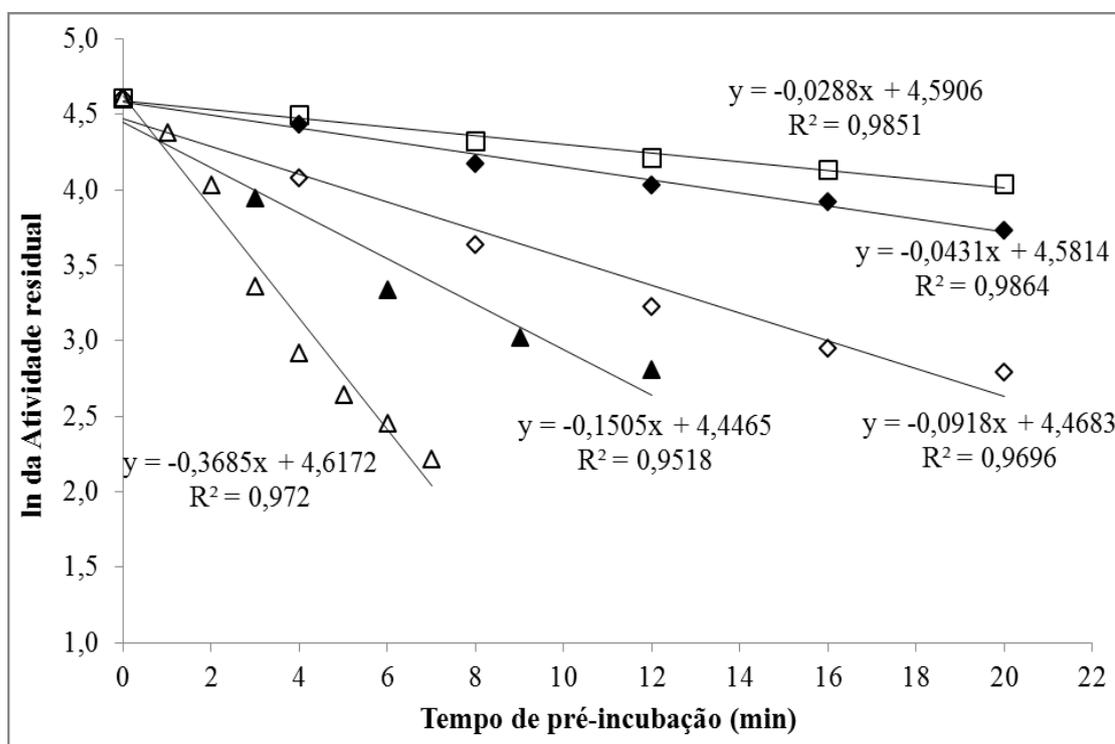


Figura 7: Gráfico semilogarítmico da atividade residual em função do tempo de pré-incubação nas temperaturas de 50,0 °C (□), 52,5 °C (◆), 55,0 °C (◇), 57,5 °C (▲), 60,0 °C (Δ).

O coeficiente angular de cada reta (kd) é uma constante de inativação de primeira ordem. A partir dos coeficientes angulares das retas (kd) foi possível calcular o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da protease bruta nas diferentes temperaturas de pré-incubação (Tabela 5), utilizando a equação:

$$t_{1/2} = \ln(2)/-kd$$

Tabela 5: Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 em diferentes temperaturas

Temperatura de pré-incubação (°C)	-kd	t _{1/2} (min)
50,0	0,0288	24,06
52,5	0,0431	16,08
55,0	0,0918	7,55
57,5	0,1505	4,60
60,0	0,3685	1,88

Como esperado, o $t_{1/2}$ diminuiu com o aumento da temperatura, apresentando valores de 24 min a 50 °C e 1,9 min a 60 °C. Os resultados indicam que a protease bruta apresenta baixa termoestabilidade, o que pode ser um fator positivo visando o controle mais eficiente da atuação enzimática (RAO *et al.*, 1998).

5.3.3. Cinética de atividade em azocaseína

A Figura 8 mostra o efeito da concentração de azocaseína na velocidade da reação enzimática catalisada pela protease bruta de *Bacillus* sp. CL18. Pode-se observar o aumento inicial mais acentuado da velocidade de hidrólise do substrato, tendendo à estabilização com o aumento gradativo de azocaseína no meio reacional. A partir destes resultados, o ajuste da curva foi realizado através de regressão não linear utilizando a equação de Michaelis-Menten:

$$V = (V_{\max} * S) / (K_m + S)$$

onde V é igual à velocidade de reação, S é a concentração de substrato, sendo possível obter as constantes K_m e V_{\max} .

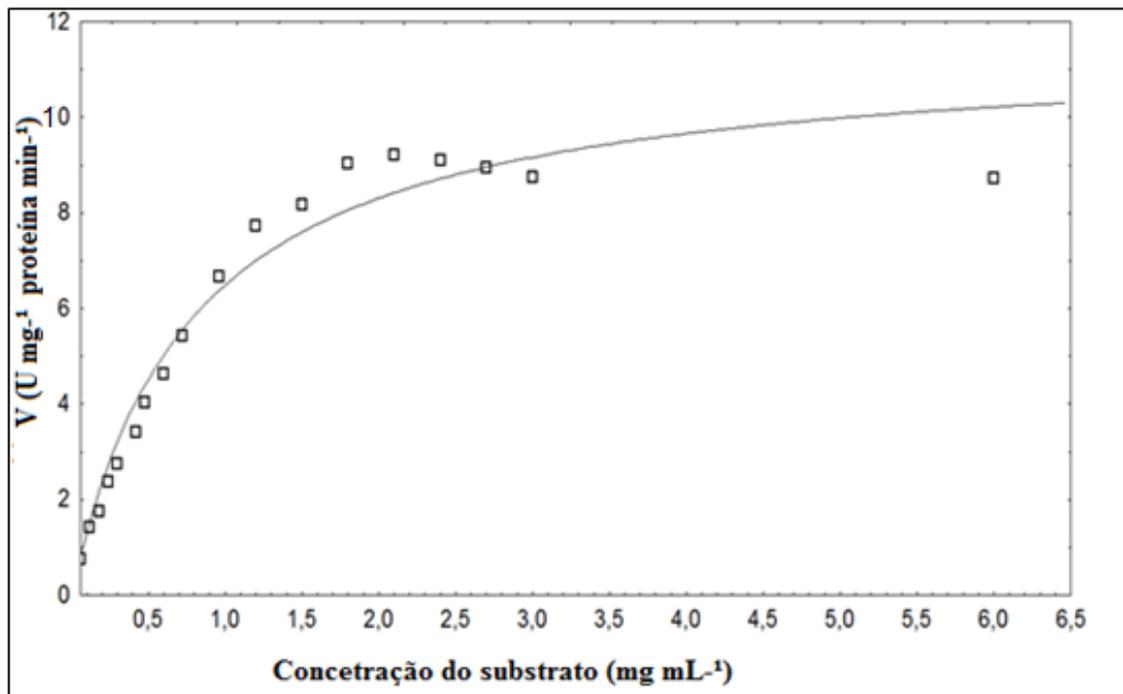


Figura 8: Velocidade de atuação da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 em função da concentração de substrato. (□) pontos experimentais e (—) ajuste da curva.

Os parâmetros V_{\max} e K_m caracterizam as reações enzimáticas que são descritas pela equação de Michaelis-Menten (FOGLER, 2012). A velocidade da reação é função do aumento da concentração do substrato, até um determinado valor dessa concentração, mantendo-se depois praticamente constante a novos acréscimos na concentração do substrato. Neste caso diz-se que a enzima está “saturada” com o substrato. A V_{\max} é a máxima velocidade inicial que a reação pode atingir, e depende da concentração da enzima, enquanto que K_m é a concentração de substrato que corresponde a metade de V_{\max} e independe da quantidade de enzima (BORZANI *et al.*, 2001).

O ajuste com a equação de Michaelis-Menten resultou em R^2 de 0,96, indicando ajuste adequado. V_{\max} , dependente da concentração de substrato, apresentou valor aparente de 11,53 $U\ mg\ prote\acute{a}na^{-1}\ min^{-1}$, enquanto que o K_m aparente foi de 0,778 $mg\ mL^{-1}$.

5.3.4. Efeito de sais sobre a atividade proteolítica

O efeito de diferentes sais (Tabela 6) sobre a atividade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL 18 foi determinado incubando-se a enzima a 55 °C por 10 min na presença do

respectivo composto nas concentrações de 1 e 5 mmol L⁻¹, seguido da determinação da atividade enzimática relativa (%). Um controle, na ausência de íons, foi também realizado e considerado como sendo 100 % da atividade da enzima. Tais determinações são importantes para o entendimento do comportamento da protease bruta em condições que podem ser encontradas ou promovidas em sistemas reacionais.

Tabela 6: Efeito de sais sobre a atividade proteolítica.

Sal	Concentração (mmol L ⁻¹)	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,0 ± 2,1
CaCl ₂	1	101,9 ± 1,9
	5	108,4 ± 1,6
CoCl ₂	1	59,0 ± 1,5
	5	46,4 ± 1,6
CuSO ₄	1	69,1 ± 1,5
	5	48,5 ± 1,3
FeSO ₄	1	85,8 ± 1,9
	5	49,6 ± 1,4
MnCl ₂	1	101,7 ± 1,8
	5	96,6 ± 1,8
MgCl ₂	1	102,5 ± 1,8
	5	112,8 ± 1,5
ZnCl ₂	1	66,0 ± 1,8
	5	14,1 ± 1,3

A atividade relativa manteve-se estável com pequenas variações positivas para os sais CaCl₂ e MgCl₂ na concentração de 5 mmol L⁻¹ (Tabela 6). Neste sentido, a adição de Ca²⁺ e Mg²⁺ aos meios reacionais, pelo menos nas concentrações testadas, podem atuar de forma benéfica na catálise da hidrólise de proteínas, potencialmente aumentando a eficiência do processo. Os sais de cobalto, cobre, ferro e zinco resultaram em diminuição da atividade enzimática (Tabela 6).

Kumar e Takagi (1999) relataram que algumas proteases requerem íons metálicos divalentes como Ca²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ para a obtenção de uma maior atividade, devido à proteção da enzima contra a desnaturação provocada por temperaturas mais elevadas. A

protease produzida por *Bacillus* sp. JB-99 foi estimulada na presença de Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} (JOHNVESLY & NAIK, 2001). Em estudo semelhante, Cui *et al.* (2015), observaram que presença dos sais Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , K^+ (5 mmol L⁻¹) resultaram em aumento na atividade da protease bruta da bactéria denominada SD11, sendo observados incrementos de 45, 42, 15, 19, 36, e 33 % em relação aos controles, respectivamente. Jaswal e Kocher (2006) também testaram o efeito de alguns íons metálicos (10 mM) sobre a atividade enzimática da protease alcalina de *Bacillus circulans* MTCC 7906, revelando que foi aumentada por Ca^{2+} (49 %), Mn^{2+} (35,6 %), Zn^{2+} (30,6 %), Co^{2+} (37,9 %) e Ba^{2+} (26,1), e inibida por Cu^{2+} (23,8 %). Efeitos oxidativos, de desnaturação e de complexação com cofatores e mesmo aminoácidos podem ter resultado nestes efeitos negativos (RIFFEL *et al.*, 2007).

5.3.5. Efeito de reagentes e inibidores sobre a atividade proteolítica

Os efeitos de reagentes e inibidores sobre a atividade da protease bruta de *Bacillus* sp. CL18 são apresentados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. O detergente aniônico SDS atuou reduzindo a atividade enzimática, que decaiu aproximadamente 59 % na presença de 0,10 % (m v⁻¹) deste reagente. Sellami-Kamoun *et al.* (2008) observaram que, em concentrações de 0,1 e 0,5 % (m v⁻¹), o SDS provocou inibição moderada (9 % e 27 %, respectivamente) da atividade da protease produzida por *Bacillus licheniformis* RP1. O SDS é reconhecido por ser um potente agente desnaturante de proteínas e, portanto, seu efeito negativo pode ser devido à desestabilização da estrutura de enzimas presentes na protease bruta; ainda, este resultado sugere a restrição de uso da protease como ingrediente de sabões em pó e detergentes (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998; GUPTA *et al.*, 2002).

No entanto, os detergentes não-iônicos Triton X-100 e Tween 20 atuaram aumentando a atividade enzimática (Tabela 7), possivelmente através do incremento do acesso do substrato ao sítio catalítico das enzimas. Hassan *et al.* (2013) avaliaram a atividade de proteases brutas de duas bactérias do gênero *Bacillus* frente aos detergentes Triton X-100 e Tween 20 (0,5 e 1,0 % v v⁻¹), tendo observado tendência de diminuição das atividades enzimáticas, com exceção do observado com Triton X-100 (0,5 %) para a protease bruta de *Bacillus subtilis* MA21, que resultou em incremento da atividade proteolítica.

Tabela 7: Efeito de reagentes sobre a atividade proteolítica.

Reagente	Concentração	Atividade relativa (%)
Controle	-	100,0 ± 2,0
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,05 % (m v ⁻¹)	67,9 ± 1,8
	0,10 % (m v ⁻¹)	41,4 ± 1,7
Triton X-100	0,50 % (v v ⁻¹)	113,9 ± 1,9
	1,00 % (v v ⁻¹)	109,0 ± 2,0
Tween 20	0,50 % (v v ⁻¹)	119,9 ± 2,1
	1,00 % (v v ⁻¹)	127,3 ± 1,9
Etanol	0,50 % (v v ⁻¹)	95,1 ± 1,8
	1,00 % (v v ⁻¹)	100,5 ± 1,6
Dimetil sulfóxido (DMSO)	0,50 % (v v ⁻¹)	106,4 ± 1,7
	1,00 % (v v ⁻¹)	113,7 ± 1,2
β-mercaptoetanol	0,10 % (v v ⁻¹)	69,6 ± 2,1
	0,50 % (v v ⁻¹)	64,0 ± 2,0
	1,00 % (v v ⁻¹)	64,6 ± 2,0

A presença de etanol do meio reacional não aparentou efeito sobre a atividade enzimática nas concentrações testadas, e DMSO apresentou tendência de aumento da atividade proteolítica (Tabela 7), como já indicado para proteases brutas de espécies de *Bacillus* (DAROIT *et al.*, 2010; HASSAN *et al.*, 2013). Os resultados indicam que as modificações de polaridade do meio não afetaram a atividade enzimática, e que os efeitos positivos dos solventes sugerem estudos subsequentes sobre a utilização da protease na síntese de peptídeos. Ebrahimipour *et al.* (2012), avaliaram os efeitos de vários solventes orgânicos, incluindo o etanol, sobre a estabilidade da protease bruta de *Bacillus licheniformis* ISA9, sendo observados incrementos na atividade proteolítica após 30 minutos de pré-incubação em meios reacionais contendo 25 e 50 % (v v⁻¹), em comparação com os controles (sem etanol). O agente redutor β-mercaptoetanol resultou em inibição moderada da atividade enzimática (Tabela 7), sugerindo que proteases presentes no sobrenadante dos cultivos dependem de pontes dissulfeto para estabilização da conformação enzimática (DAROIT *et al.*, 2011).

EDTA e 1,10-fenantrolina, agentes quelantes de íons metálicos, provocaram inibição da protease bruta (Tabela 8), sugerindo que metaloproteases podem estar entre as enzimas

produzidas por *Bacillus* sp. CL18 (RIFFEL *et al.*, 2007). Segundo Beg e Gupta (2003), se a enzima se mantém estável na presença de EDTA, esta pode apresentar potencial de utilização na indústria de detergentes, devido a estes compostos possuírem elevada concentração de agentes quelantes que auxiliam na redução da tensão superficial da água, além de se ligarem aos íons metálicos tornando-os indisponíveis na solução detergente.

Os maiores índices de inibição observados na presença de PMSF, um reconhecido inibidor de serino-proteases, indicando que a protease bruta pode também conter este grupo de enzimas proteolíticas (RAO *et al.*, 1998). Este grupo de proteases está entre as principais produzidas por espécies do gênero *Bacillus* (SCHALLMEY *et al.*, 2004). Considerando os efeitos de EDTA e PMSF (Tabela 8) e o efeito positivo da presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Tabela 6), além do fato de muitas serino-proteases de *Bacillus* dependerem de íons metálicos para sua atividade e estabilidade (GUPTA *et al.*, 2002), sugere-se que a maior parte das enzimas proteolíticas produzidas sejam serino-proteases dependentes de íons metálicos.

Tabela 8: Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica.

Inibidor	Concentração (mmol L ⁻¹)	Atividade residual (%)
Controle	-	100,0 ± 2,2
EDTA	1	56,8 ± 2,0
	5	46,9 ± 2,1
1,10-fenantrolina	1	83,2 ± 2,4
	5	79,8 ± 1,8
PMSF	1	42,1 ± 1,8
	5	35,9 ± 1,6

Como comparação, Zhang *et al.* (2009), testaram o efeito de diversos inibidores (1 e 10 mmol L⁻¹) sobre protease de *Bacillus* sp. 50-3 e, dentre eles, PMSF inibiu em 71-81 % a atividade proteolítica, EDTA resultou em 56-91 % de inibição, e 1,10-fenantrolina inibiu levemente a atividade da enzima. Chantawannakul *et al.* (2002) testou alguns produtos químicos, entre eles a 1,10-fenantrolina (1 mmol L⁻¹), que inibiu aproximadamente 90 % da atividade da protease de *Bacillus subtilis* linhagem 38. A protease bruta de *Bacillus* sp. P45, avaliada quanto ao efeito de inibidores (1 e 5 mmol L⁻¹), teve sua atividade reduzida por

EDTA (redução de 91 e 97 %), PMSF (redução de 25 e 32 %) e 1,10-fenantrolina (redução de 58 e 61 % (DAROIT *et al.*, 2011).

5.3.6. Atuação da protease bruta na hidrólise de diferentes substratos proteicos

Após a caracterização da protease bruta, esta foi empregada como biocatalisador visando a hidrólise de diferentes substratos proteicos (penas, farinha de penas, cabelos humanos, proteína isolada de soja, caseína, albumina). Esta abordagem objetivou averiguar potenciais aplicações da protease bruta em bioprocessos. O uso de enzimas proteolíticas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e por apresentar vantagens em relação aos processos químicos, como maior especificidade, menor consumo energético, maior velocidade de reação e possibilidade de controle do processo, além de muitas vezes melhorar a qualidade dos produtos (KIRK *et al.*, 2002; KASANA *et al.*, 2011).

Durante a hidrólise, realizada por até 4 h, os substratos cabelo humano e penas de frango foram pouco hidrolisados pela protease bruta (Figura 9). Por serem insolúveis, recalcitrantes e compactos, o ataque às ligações peptídicas das queratinas da pena e cabelo foi, aparentemente, restrito. Considerando a eficiente degradação de penas pelo isolado *Bacillus* sp. CL18 verificado pelos ensaios de massa seca, proteína solúvel e a produção de proteases, os resultados pouco expressivos da hidrólise de penas pela protease bruta indicam que a presença da bactéria é fundamental para a eficiente degradação. Assim, reforça-se a importância de sistemas sulfitolíticos no processo de biodegradação (GUPTA *et al.*, 2013a).

Neste sentido, foi possível notar maior hidrólise da farinha de penas do que das penas (Figura 9). O processo de produção da farinha de penas, que envolve a cocção sob pressão e moagem das penas, resulta em um substrato mais acessível à hidrólise, tanto pelo aumento da área superficial para ataque enzimático quanto pela quebra de pontes dissulfeto, em relação às penas inteiras (BRANDELLI *et al.*, 2010). Hidrólise semelhante foi observada para albumina (proteína solúvel), indicando certa especificidade da protease bruta na hidrólise de ligações peptídicas (DAROIT *et al.*, 2010). Já albumina apresentou um padrão de hidrólise não muito elevado, pouco superior à farinha de penas.

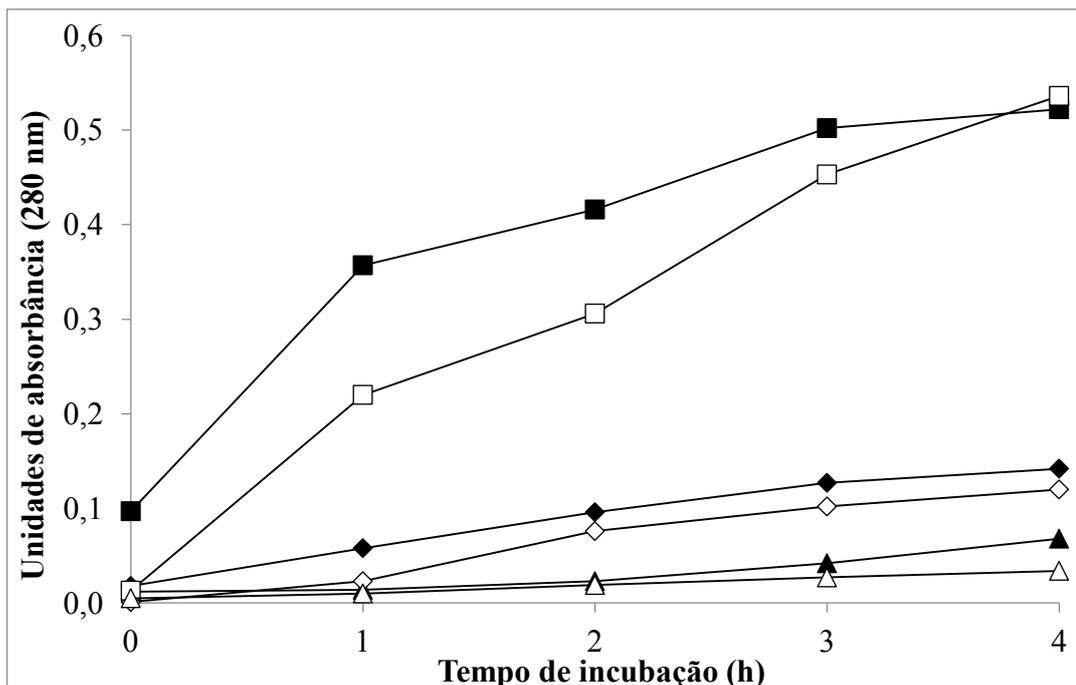


Figura 9: Atuação da protease bruta na hidrólise dos substratos proteína isolada de soja (■), caseína (□), albumina (◆), farinha de penas (◇), pena (▲), cabelo (△).

Os substratos preferencialmente atacados foram caseína e proteína isolada de soja (Figura 9), e este resultado indica potencial promissor da protease bruta de *Bacillus sp.* CL18 na hidrólise destas proteínas que são amplamente empregadas na indústria de alimentos e rações. Proteases brutas podem ser utilizadas no melhoramento da digestibilidade de rações animais (BRANDELLI, 2008). Por esta estratégia, as proteases são adicionadas às rações para otimizar a digestibilidade dos componentes proteicos, que especialmente são derivados da soja, e em alguns casos também é utilizada a farinha de penas (ONIFADE *et al.*, 1998).

A modificação de proteínas alimentares, através de hidrólise enzimática, vem sendo utilizada na modulação de propriedades físico-químicas da caseína e proteína isolada de soja, como capacidade de formação de espuma e capacidade emulsificante (OLIVEIRA *et al.*, 2015). O resultado da proteína se soja, indica o potencial na aplicação da hidrólise de proteínas de soja, o que as torna mais solúvel para a utilização em bebidas e agrega valor nutritivo (WISEMAN, 1991). A caseína constitui cerca de 80 % das proteínas que constituem o leite, e as proteínas do soro respondem pelos outros 20 % (OLALLA *et al.*, 2009), possuindo a protease do isolado bacteriano *Bacillus sp.* CL 18 potencial aplicação na indústria de laticínios. Proteases microbianas vêm sendo avaliadas na coagulação de proteínas do leite (caseínas) para produção de queijos (RAO *et al.*, 1998).

Particularmente, proteases derivadas de bactérias vêm sendo investigadas na liberação de peptídeos bioativos a partir da hidrólise de proteínas alimentares, sendo descritas atividades antioxidante, antihipertensiva, antimicrobiana, antidiabética, entre outras. Desta forma, enzimas proteolíticas são relevantes tanto do ponto de vista da ciência e tecnologia de alimentos, quanto em aplicações farmacêuticas e obtenção de produtos nutracêuticos com potencial efeito positivo sobre a saúde humana e animal (PHELAN *et al.*, 2009).

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou a utilização do isolado bacteriano *Bacillus* sp. CL18 na degradação eficiente de penas de frango, resíduos agroindustriais ricos em queratina que são de difícil degradação.

Através deste bioprocesso, foram obtidos insumos com potencial tecnológico (proteases) e, desta forma, a bioconversão das penas pode representar, concomitantemente, uma forma de manejo de resíduos e uma estratégia de agregação de valor a estes materiais.

A protease bruta produzida durante cultivos em Caldo Pena foi caracterizada, indicando sua potencial aplicação na hidrólise de proteínas como caseína e proteína isolada de soja, visando obter produtos úteis.

Os resultados alcançados garantem pesquisas e projetos futuros, tanto de avaliação do processo de biodegradação, quanto da aplicação das proteases obtidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.
- AQEL, H.; AL-QUADAN, F.; YOUSEF, T. K. A novel neutral protease from thermophilic *Bacillus strain* HUTBS62. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v. 2, p. 117-123, 2012.
- AQUIM, P. M.; MANCOPES, F.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J. O. Assessment of water management in tanneries: State of Rio Grande do Sul case study. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 94, p. 253-258, 2010.
- BARBOSA, J. B. **Aproveitamento de soro de queijo e farinha de casca de maracujá para a produção de proteases e α -amilases por *Bacillus sp.* SMIA-2**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Faculdade de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.
- BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidationstable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 294-304, 2003.
- BHUNIA, B.; BASAK, B.; DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp.* **Journal of Biochemical Technology**, v.3. p. 448-457, 2012.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. Vol. 1. São Paulo: Blucher, 2001.
- BRANDELLI, A. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, 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, p. 1735-1750, 2010.
- BRASIL. Lei Nº 12.305 de 02 de agosto de 2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília: Diário Oficial da União, 2010.
- CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; SAISAMORN, L. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**, v. 28, p. 241-245, 2002.
- CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus sp.* P7**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CUI, H.; WANG, L.; Yu, Y. Production and characterization of alkaline protease from a high yielding and moderately halophilic strain of SD11 marine bacteria. **Journal of Chemistry**, v. 2015, Article ID 798304, 8 pp., 2015.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F., SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 28, p. 370-379, 2010.

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**, v. 34, p. 372-384, 2014.

DETTMER, A. **Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

EBRAHIMPOUR, G.; SADEGHI, H.; BABADI, Z. K.; AMIRI, S. Identification of a bacterium isolated from soil of Ahvaz contaminated by oil and determination of its protease stability in organic solvents. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, p. 105-111, 2012.

EVANS, G. M.; FURLONG, J. C. **Environmental biotechnology**. Theory and Application. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4ª Ed, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

GAVRILESCU, M. Environmental Biotechnology: Achievements, Opportunities and Challenges. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 4, p. 1-36, 2010.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOVARTHANAN, M.; SELVANKUMAR, T.; ELVAM, K.; SUDHAKAR, C.; KANNAN, S. K. Response surface methodology optimization of keratinase production from alkali-treated feather waste and horn meal using *Bacillus* sp. MG-MASC-BT. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 27, p. 25-30, 2015.

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

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

GUPTA, R.; SHARMA, R.; BEG, Q. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 33, p. 216-228, 2013a.

GUPTA, R.; RAJPUT, R.; SHARMA, R.; GUPTA, N. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9931-9940, 2013b.

HASSAN, M. A.; HAROUN, B. M.; AMARA, A. A.; SEROUR, E. A. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

HOLANDA, M. A. C. **Avaliação nutricional da farinha de penas hidrolisada na alimentação de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE - Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

ILLANES, A. Stability of biocatalysis. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 1-9, 1999.

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília: IPEA, 2012.

JASWAL, R.; KOCHER, G. Partial characterization of a crude alkaline protease from *Bacillus circulans* and its detergent compatibility. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 4, 6 pp., 2006.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, p. 39-51, 2013.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 139-144, 2001.

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

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

KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, v. 31, p. 1689-1701, 2011.

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

LASEKAN, A.; BAKAR, F. A.; HASHIM, D. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. **Waste Management**, v. 33, p.552-565, 2013.

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

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 34/2008**. Brasília: MAPA, 2008.

MANDENIUS C. F.; BRUNDIN A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 1191-1203, 2008.

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

NEJAD, Z. G.; YAGHMAEI, S.; HOSSEINI, R. H. Production of extracellular protease and determination of optimal condition by *Bacillus licheniformis* BBRC 100053. **International Journal of Engineering. Transactions B: Applications**, v. 22, p. 221-228, 2009.

NILEGAONKAR, S. S.; ZAMBARE, V. P.; KANEKAR, P. P.; DHAKEPHALKAR, P. K.; SARNAIK, S.S. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1238-1245, 2007.

OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; RODRIGUEZ, C.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, v. 113, p. 835-838, 2009.

OLIVEIRA, C. T.; DAROIT, D. J. **Prospecção de bactérias produtoras de enzimas celulolíticas e lipolíticas**. In: Anais do 3º SEPE e 3ª Jornada de Iniciação Científica da UFFS. Chapecó: UFFS, 2013. 2 pp.

OLIVEIRA, C. T.; DAROIT, D. J. **Avaliação do potencial proteolítico e queratinolítico de bactérias isoladas do solo**. In: Anais do IV SEPE e IV Jornada de Iniciação Científica da UFFS. Chapecó: UFFS, 2014. 2 pp.

OLIVEIRA, C. F.; CORRÊA, A. P. F.; COLETTI, D.; DAROIT, D. J.; OLIVERA, F. C.; BRANDELLI, A. Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2668-2678, 2015.

ONIFADE, A. A.; A1-SANE, N. A.; AI-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 keratin as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 1-11, 1998.

PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. J.; O'BRIEN, N. M. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 643-654, 2009.

POOLE, A. J.; CHURCH, J. S.; HUSON, M. G. Environmentally sustainable fibers from regenerated protein. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1-8, 2009.

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

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

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

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

RIO GRANDE DO SUL. **Plano Estadual de Resíduos Sólidos do Rio Grande do Sul, 2015-2034**. Porto Alegre: [s.n.], 2014.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p.224-230, 2011.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SEVINC, N.; DEMIRKAN, E. Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, v. 5, p. 95-103, 2011.

SELLAMI-KAMOUN, A.; HADDAR, A.; ALI, N. E.-H.; GHORBEL-FRIKHA, B.; KANOUN, S.; NASRI, M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, v. 163, p. 299-306, 2008.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 3, p. 653-669, 2012.

SZABO, L.; BENEDEK, A.; SZABO, M. L.; BARABAS, G. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 252-255, 2000.

VILLA, A. L. V.; ARAGÃO, M. R. S.; SANTOS, E. P.; MAZOTTO, A. M.; ZINGALI, R. B.; SOUZA, E. P.; VERMELHO, A. B. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. **BMC Biotechnology**, v. 13, p. 13-15, 2013.

ZHANG, B.; JIANG, D.; ZHOU, W.; HAO, H.; NIU, T.. Isolation and characterization of a new *Bacillus* sp. 50-3 with highly alkaline keratinase activity from *Calotes versicolor* faeces. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 583-590, 2009.

WEIJERS, S. R.; RIET, K. V. Enzyme stability in downstream processing. Part I: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotechnology Advances**, v. 10, p. 237-49, 1992.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Acribia, 1991.