

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Caracterização e aplicação de proteases produzidas por
linhagens de *Bacillus* sp.**

Dissertação de Mestrado

Janice Luehring Giongo

Porto Alegre, 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Caracterização e aplicação de proteases produzidas por
linhagens de *Bacillus* sp.**

Janice Luehring Giongo

Farmacêutica Industrial- PUCRS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre (RS), Brasil

Março, 2006

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Brandelli, pela orientação, sabedoria, compreensão e apoio em alguns momentos difíceis que passei durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e seus Professores

Ao professor David Driemeier, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela importante contribuição nos exames histológicos das peles.

Aos colegas de laboratório, Ana Paula, Daniel, Mário, Silvana, Rosieli, Dione, Voltaire, Daniele, Bacana e em especial a Amanda, Lisana e Márcia pelos momentos de alegria e pela amizade em todas as horas.

À amiga bolsista Franciani, pela força, amizade e auxílio em vários momentos difíceis.

À amiga Ana Paula Corrêa pela amizade, companheirismo e importante ajuda na elaboração dos géis.

Aos meus familiares, principalmente aos meus irmãos João Francisco, Janine e Jorge Luís, pelo apoio e incentivo constante.

Ao meu namorado Rodrigo, pela paciência, amizade e auxílio durante este tempo.

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de Mestrado

E finalmente aos meus pais, as pessoas mais importantes, pelo exemplo de vida e por terem me ensinado que a persistência é uma grande virtude. Obrigada!

Produção, caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*

Autor: Janice Luehring Giongo

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

RESUMO

Algumas enzimas são encontradas facilmente em diferentes microrganismos do ambiente e requerem um destaque especial devido a seu grande valor econômico. As proteases apresentam grande diversidade bioquímica, sendo facilmente manipuláveis, favorecendo dessa maneira suas aplicações biotecnológicas. Três linhagens bacterianas de *Bacillus sp.* foram isoladas com o objetivo de produzir protease e determinar as condições ótimas de temperatura, pH, e efeito de substratos e substâncias químicas sobre a atividade da enzima, assim como verificar a atividade depilatória e a utilização como agentes de modificação de proteína. As linhagens de *Bacillus sp.* apresentaram halos de atividade proteolítica em placas de Ágar Leite em diferentes pHs. O padrão proteolítico das enzimas em extrato bruto utilizando inibidores de protease indica que são serina-proteases, com alta especificidade pelo substrato azocaseína, pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37°C, respectivamente. As enzimas mantiveram-se estáveis à 37°C por 30 minutos, entretanto quando submetidas a uma temperatura de 55°C, perderam 50% da atividade inicial nos primeiros 20 minutos. A atividade enzimática foi parcialmente inibida por PMSF e benzamidina e totalmente por HgCl₂. A adição de detergentes como o SDS ou o Triton X100 ocasionou um leve aumento na atividade das enzimas. Os sobrenadantes das linhagens de *Bacillus sp.* apresentaram enzimas com a capacidade de promover depilação de peles bovinas. Exames histológicos demonstraram que o tratamento com as enzimas não acarretou danos ao colágeno. Esses resultados indicam que as proteases produzidas pelos isolados apresentaram potencial para aplicação em processos envolvendo hidrólise de queratina, além da utilização como agente de modificação de proteínas.

Palavras chaves: *Bacillus sp.*, proteases, hidrólise de queratina, atividade depilatória

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (p.81) Março, 2006.

Production, characterization and application of proteases produced by strains of *Bacillus sp.*

Author: Janice Luehring Giongo

Advisor: Prof. Dr. Adriano Brandelli

ABSTRACT

Some enzymes are easily found in different microorganisms of the environment and they require a special prominence due its great economic value. Proteases present great biochemistry diversity, being easily manipulated allowing in this way, their biotechnological applications. Three *Bacillus sp. strains* were isolated intending to produce protease and determine optimal conditions of temperature, pH, and effect of chemical substances on the activity of the enzyme, as well as to verify the depilatory activity and utilization as agents protein modification. *Bacillus sp.* strains showed proteolytic activity in milk plates in different pH. The proteolytic characteristic of enzymes in crude extract using protease inhibitors indicates that they are serine-proteases, with high specificity to azocasein, with optimal pH and temperature at 9,0 and 37°C, respectively. The enzymes have been kept stable at 37°C for 30 minutes. Nevertheless, when they were subjected to 55°C they lost 50% of their initial activity in the first 20 minutes. The enzymatic activity was partially inhibited by PMSF and benzamidine and totally by HgCl₂. The addition of detergents, as SDS and Triton X100, caused a light increase on enzymes activity. The supernatants of *Bacillus sp.* strains showed enzymes with capacity to depilate bovine skin. Histological evaluation showed that the treatment with enzymes do not promote damage to collagen. These results indicate that proteases produced by isolated present a powerful application in processes involving keratin hydrolysis, as well as the use as an agent that modifies proteins.

Key words: *Bacillus sp.*, proteases, keratin hydrolysis, depilatory activity

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (p.81), March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Enzimas proteolíticas.....	3
2.2. Fonte de obtenção de proteases.....	5
2.3. Produção de protease bacteriana.....	7
2.4. Atividade enzimática.....	9
2.5 Influência de diversos fatores na atividade enzimática de proteases.....	10
2.5.1. pH.....	10
2.5.2. Temperatura.....	12
2.5.3. Agentes inibidores.....	13
2.5.4 Íons metálicos.....	14
2.6. Purificação das proteases bacterianas.....	15
2.7. Utilização de protease como agente de modificação de proteínas.....	17
2.8. Utilização de enzimas no processo de depilação do couro.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Microrganismos selecionados.....	20
3.1.1. Identificação dos microrganismos.....	20
3.1.2. Manutenção e estoque dos microrganismos.....	21
3.2. Caracterização das proteases no extrato bruto.....	21
3.2.1 Meios de cultura.....	21

3.2.2. Farinha de pena.....	22
3.2.3 Verificação da atividade proteolítica das linhagens bacterianas.....	22
3.2.4. Condições dos cultivos.....	22
3.2.5. Produção da enzima.....	23
3.2.6. Ensaio enzimático.....	23
3.2.7. Determinação da especificidade da enzima ao substrato.....	24
3.2.8. Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática.....	24
3.2.9. Determinação do pH ótimo de atividade enzimática.....	25
3.2.10. Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática.....	25
3.2.11. Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	25
3.2.12. Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática.....	26
3.2.13. Estabilidade térmica das enzimas.....	26
3.3. Purificação parcial das enzimas.....	26
3.3.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	26
3.3.2. Determinação da proteína solúvel e da atividade enzimática das etapas da precipitação fracionada.....	27
3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	28
3.5. Zimograma.....	28
3.6. Avaliação da atividade depilatória.....	29
3.6.1. Preparação da pele bovina para ensaio de atividade depilatória.....	29
3.6.2. Ensaio de depilação.....	29
3.6.3. Avaliação visual das peles tratadas.....	30

3.6.4. Avaliação microscópica das peles tratadas.....	30
3.6.4.1. Preparo.....	30
3.6.4.2. Análise.....	30
3.7. Aplicação da enzima produzida pela BI 16 como agente de modificação de proteína de soja.....	31
3.7.1. Obtenção da enzima.....	31
3.7.2. Avaliação da utilização da enzima como agente modificador das propriedades funcionais da proteína isolada.....	31
3.7.3. Avaliação da capacidade de formação de espuma.....	32
3.7.4. Avaliação da capacidade emulsificante.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Caracterização dos microrganismos.....	34
4.1.1 Morfologia colonial e celular.....	34
4.1.2 Testes bioquímicos.....	34
4.1.3 Sequenciamento.....	36
4.2. Atividade proteolítica dos isolados.....	37
4.3. Caracterização das proteases no extrato cru.....	38
4.3.1. Temperatura ótima de atividade enzimática.....	38
4.3.2. Determinação do pH ótimo de atividade enzimática.....	40
4.3.3. Atividade enzimática em diferentes substratos.....	41

4.3.4. Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática.....	42
4.3.5. Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	43
4.3.6. Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática.....	46
4.3.7. Estabilidade térmica das enzimas.....	47
4.3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	49
4.3.9 Zimograma.....	51
4.4. Avaliação da atividade depilatória.....	52
4.4.1. Avaliação visual das peles tratadas.....	52
4.4.2. Avaliação microscópica.....	53
4.5. Purificação parcial das enzimas.....	56
4.5.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	56
4.6. Aplicação da enzima produzida pela linhagem BL16 como agente de modificação de proteína de soja e soro de queijo.....	57
4.6.1. Avaliação da capacidade de formação espuma.....	57
4.6.2. Avaliação da capacidade emulsificante	58
5. CONCLUSÕES.....	61
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
7. APÊNDICES.....	79

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.....	7
Tabela 2: Temperaturas ótimas para produção máxima de protease.....	13
Tabela 3: Inibidores específicos de proteases.....	14
Tabela 4: Características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas..	35
Tabela 5: Efeito do pH na atividade proteolítica dos isolados	38
Tabela 6: Atividade da enzima sobre diferentes substratos	42
Tabela 7: Efeito de inibidores específicos na atividade enzimática da protease no extrato cru.....	43
Tabela 8: Efeito de detergentes na atividade enzimática relativa.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Posição filogenética das linhagens BL16, BL17 e BL20 no gênero <i>Bacillus</i>	36
Figura 2: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade enzimática das linhagens BL16, BL17 e BL20.....	39
Figura 3: Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática das linhagens BL16, BL17 e BL20.....	41
Figura 4: Efeito de íons na atividade enzimática da BL16.....	44
Figura 5: Efeito de íons na atividade enzimática da BL17.....	45
Figura 6: Efeito de íons na atividade enzimática da BL 20.....	45
Figura 7: Estabilidade térmica da BL16, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos.....	48

Figura 8: Estabilidade térmica da BL17, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos.	48
Figura 9: Estabilidade térmica da BL20, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos.....	49
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% do extrato bruto da BL16.....	50
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% do extrato bruto da BL17 e BL20.....	51
Figura 12: Zimograma de gelatina do sobrenadante cru dos isolados BL16, BL17 e BL20.....	52
Figura 13: Fotografia de corte histológico das peles.....	55
Figura 14: Quantificação da atividade enzimática de cada etapa da precipitação fracionada.....	57
Figura 15: Porcentagem do aumento de volume de espuma na proveta dos hidrolisados de proteína de soja e soro, tratados com diferentes concentrações da enzima produzida.....	58

Figura 16: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima.....59

Figura 17: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soro tratados com diferentes concentrações da enzima.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

AL: Agar Leite

BHI: Infusão de cérebro e coração

CPF: Caldo Farinha de Pena

EDTA: Etilenodiaminotetracetato dissódico

MMM: Meio Mínimo Mineral

NaOH: Hidróxido de Sódio

PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila

SDS: Sódio dodecil sulfato

SDS-PAGE: Sódio dodecil sulfato- eletroforese em gel de poliacrilamida

TCA: Ácido tricloroacético

UFC: Unidade formadora de colônia

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a indústria mundial tem investido na produção de matérias primas a partir de fontes de energia renováveis. As vantagens desse desenvolvimento são observadas tanto no campo econômico, com a produção de insumos a partir de fontes renováveis naturais, como no campo ecológico com processos controláveis de resíduos biodegradáveis.

Neste contexto, a utilização de resíduos ou subprodutos como base para meios de cultivo para produção de enzimas microbianas vem recebendo crescente atenção. Existem algumas enzimas que são facilmente encontradas em diferentes microrganismos, que requerem um destaque especial devido a seu grande valor econômico. Entre estas, encontram-se as proteases, que apresentam grande diversidade bioquímica, sendo facilmente manipuláveis, favorecendo dessa maneira suas aplicações biotecnológicas.

Estas enzimas pertencem ao grupo que possui uma grande importância comercial e 40% do total das proteases utilizadas industrialmente são de origem microbiana. São utilizadas na produção de detergentes, no aumento da digestibilidade em alimentos animais e na degradação de subprodutos ricos em proteína. Outra utilização das enzimas proteolíticas, que ainda não é amplamente

empregada, é na indústria do couro. O método tradicional utiliza para depilação uma grande quantidade de sulfitos, que gera uma forte carga poluente. Uma alternativa para isso seria a utilização de proteases microbianas auxiliando na depilação do couro.

A hidrólise protéica é uma tecnologia desenvolvida como forma de agregar valor, funcionalidade e ampliar o leque de aplicações para materiais de utilização pouco convencional. Através desse procedimento, consegue-se modificar as propriedades químicas, físicas e biológicas das proteínas.

Por apresentarem ampla utilidade comercial e industrial, a otimização de sua produção é muito importante, já que elas alcançam elevados valores no mercado internacional. Entretanto, o Brasil não se encontra em posição favorável no mercado mundial de enzimas, participando com menos de 2% do total e importando cerca de 95% do total de enzimas utilizadas nas indústrias brasileiras. Isto, reflete claramente o pequeno desenvolvimento brasileiro referente à tecnologia enzimática.

Este projeto teve como objetivo caracterizar proteases produzidas por três cepas de *Bacillus* sp., durante crescimento em farinha de pena, para posterior aplicação como agente de modificação protéica, através da hidrólise da proteína de soja e soro de queijo e como agente depilatório em couro bovino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Enzimas proteolíticas

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores que alteram reações químicas e devido a isso são amplamente utilizadas nas indústrias de alimento, farmacêutica, de diagnóstico e na indústria química (Kumar & Takagi, 1999).

A clivagem de peptídeos proteolíticos é uma das mais importantes modificações de proteínas. A proteólise enzimática tem sido associada com a digestão de proteínas, despertando o interesse de fisiologistas e bioquímicos no processo de digestão de proteínas nos animais e nos homens (Beynon, 1996). Estudos avançados demonstram que as proteases conduzem modificações seletivas e específicas em proteínas (Rao *et al.*, 1998).

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (Uyar & Baysal, 2004). A União Internacional de Bioquímica (IUB) classifica essas enzimas em seis famílias de acordo com a massa molecular, com as suas propriedades elétricas e com sua especificidade ao substrato. São elas: serina protease I (ex. tripsina e elastase), serina protease II (ex. subtilisina), cisteína protease (ex. papaína), aspartil protease (ex. pepsina, quimosina), metalo protease I (ex. carboxipeptidase bovina) e metalo protease II

(ex. termolisina). A serina protease e a metalo protease se subdividem em duas famílias, as proteases de mamíferos e as proteases microbianas. Cada família de protease possui resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo (Beynon, 1996).

O uso de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas têm se tornado bastante difundido na indústria de alimentos. As principais enzimas utilizadas para este fim são as proteases, que ocupam uma posição de destaque devido às suas aplicações comerciais e às inúmeras vantagens que apresentam em relação aos demais agentes utilizados para este fim. Estas enzimas representam, atualmente, 60% do mercado mundial de enzimas, sendo 40% deste mercado referente às proteases de origem microbiana (Johnvesly & Naik, 2001). Estima-se um mercado anual de um bilhão de dólares em todo o mundo (Rao *et al.*, 1998).

As proteases executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes. As proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para conseqüente absorção pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (Rao *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, as proteases estão sendo utilizadas com diversas finalidades, no processo industrial da fabricação de detergentes, na indústria de

alimentos (Joo *et al.*, 2003) e também na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (Rao *et al.*, 1998).

Proteínas fibrosas presentes em materiais como penas, unhas, chifres e cabelos estão abundantemente disponíveis na natureza sendo desprezados como resíduos. Mas estes podem ser úteis se convertidos em biomassa ou em concentrados protéicos de aminoácidos, pela ação de proteases microbianas (Venugopal *et al.*, 1989).

2.2. Fontes de obtenção de proteases

Considerando que as proteases são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos (Rao *et al.*, 1998), elas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e microrganismos. Embora as proteases microbianas sejam geralmente produzidas por cultivo submerso, processos de cultivo em estado sólido também têm sido utilizados em um menor grau para a produção dessas enzimas (George *et al.*, 1995).

As proteases produzidas por plantas, requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilização de área para cultivo e também das condições climáticas. Em destaque temos a produção de papaína, extraída do mamão, e a bromelaína do abacaxi. As proteases de origem animal dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso (Rao *et al.*, 1998).

De maneira geral, os microrganismos são preferidos frente a outras fontes de proteases devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço tempo

necessário para o seu cultivo (Rao *et al.*, 1998) e à grande variedade de atividades catalíticas que dispõem. As proteases microbianas são em geral mais estáveis que as homólogas de plantas e animais e o seu processo de produção é mais fácil (Wiseman,1991). Os microrganismos são responsáveis por grande parte da produção das proteases utilizadas industrialmente, que podem ser obtidas de bactérias, fungos e vírus, sendo as provenientes de bactérias as de maior emprego (Rao *et al.*,1998).

As proteases bacterianas apresentam inúmeras aplicações nas indústrias alimentícia e química, principalmente das espécies de *Bacillus*, que possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas. Estas são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (Joo & Chang, 2005). No segmento das indústrias de alimentação, elas são o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame (Rao *et al.*, 1998).

Na tabela 1 são mostradas as diversas origens das proteases, bem como suas respectivas aplicações industriais.

Tabela 1: Aplicações industriais das enzimas obtidas de plantas, animais e microrganismos.

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelaína	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
Microrganismos (<i>Aspergillus niger</i>)	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas.
Microrganismos (<i>Aspergillus oryzae</i>)		Hidrólise protéica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação.
Microrganismos (<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>)	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação do leite).
Microrganismos (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)		Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
Microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: Wiseman (1991)

2.3 Produção de protease bacteriana

Entre as várias proteases, as de origem bacteriana são as de maior relevância, quando comparadas com proteases fúngicas e animais. Dentro das proteases bacterianas, os *Bacillus* spp. são os maiores produtores de proteases extracelulares (Nascimento & Martins, 2004).

Para que se possa viabilizar a produção da enzima, a linhagem selecionada deve apresentar algumas características como, desenvolver-se em meio simples e barato, produzir o mínimo de metabólitos secundários indesejáveis, excretar a enzima de forma que esta seja facilmente separada e purificada e não ser patogênica (Scriban *et al.*, 1985).

A maioria das proteases comerciais de origem bacteriana, geralmente neutras e alcalinas, é produzida por microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, principalmente pela sua facilidade de adaptação e crescimento tanto em meios complexos, quanto em meios sintéticos (Takami *et al.*, 1990).

Cada microrganismo ou linhagem apresenta determinada condição especial que deve ser respeitada para a produção máxima de enzimas. Os desenvolvimentos dos meios com glicose e peptona foram importantes fatores para aumentar a produção de proteases (Cochran *et al.*, 1992).

Para espécies de *Bacillus*, a produção de proteases está fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (Nehete *et al.*, 1985, Johnvesly & Naik, 2001). O meio de cultura utilizado para o cultivo do microrganismo produtor de protease deve conter uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e alguns fatores necessários ao melhor desenvolvimento da linhagem. É importante também considerar a necessidade de um indutor ou as possíveis repressões devido à presença de algum composto do meio e a repressão catabólica produzida pela glicose (Crueger & Crueger, 1993).

Com vista à produção em escala industrial, subprodutos são uma boa alternativa econômica, pois o aproveitamento de resíduos torna o processo mais barato e fornece, na maioria das vezes, fontes aceitáveis para a cultura bacteriana. Os resíduos e subprodutos ricos em queratina, uma proteína de baixo valor nutricional, tem sido utilizados para produção de proteases. As penas

constituem aproximadamente 5% do peso corporal das aves, constituídas de queratina rígida, podendo ser completamente degradadas por alguns microrganismos. Várias bactérias do gênero *Bacillus*, cultivadas em meio contendo penas ou farinha de pena produzem proteases queratinolíticas (Chen *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001). Recentemente, bactérias gram-negativas isoladas de resíduos da indústria avícola, têm sido associadas com a produção de proteases quando cultivadas em pena nativa como única fonte de carbono e nitrogênio (Sangali & Brandelli, 2000; De Toni *et al.*, 2002; Riffel *et al.*, 2003).

Estas proteases apresentam importante uso em processos biotecnológicos de digestão de penas não aproveitadas em curtumes, conduzindo a processos industriais não poluentes (Shih,1993; Onifade *et al.*,1998). Grandes esforços têm sido feitos para a redução de resíduos de pena, provenientes de aviários (Young & Smith, 1975; Williams *et al.*, 1990). Após sofrerem hidrólise, as penas podem ser convertidas em alimentos industriais, fertilizantes, colas, filmes ou usadas para produção de aminoácidos raros como a serina, cisteína e a prolina (Papadopolous *et al.*,1986; Yamauchi *et al.*,1996).

2.4 Atividade enzimática

A atividade da enzima é medida através de sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A concentração do produto aumenta linearmente com o tempo em um dado intervalo de tempo. Entretanto, a partir de certo tempo ela começa a decrescer. Isso ocorre porque

pode ter diminuído a concentração de substrato, a inativação parcial da enzima durante a reação, a inibição do produto e o deslocamento do equilíbrio (Lima *et al.*, 2001).

O parâmetro mais representativo para determinar o fim da fermentação é a atividade enzimática. Mas, algumas vezes a determinação é demorada acarretando tempo de resposta longo. Nesse caso, a variação de outros parâmetros de processo como o pH e oxigênio dissolvido podem ser utilizados para caracterizar o término do processo fermentativo (Lima *et al.*, 2001).

A atividade é expressa em unidades de atividade. A IUB (unidade internacional-IU) considera uma unidade de atividade como sendo a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um micromol de substrato em produto por minuto. Algumas vezes pode-se utilizar atividade específica, que é expressa em unidades (IU) por massa de proteína.

2.5 Influência de diversos fatores na atividade enzimática de proteases

2.5.1 pH

Todas as enzimas são sensíveis à concentração de H^+ do meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre, porque como outras proteínas, as enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de união com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo. Em consequência disso pode haver uma troca na velocidade máxima de reação (V_{max}), na afinidade da enzima pelo

substrato (K_m) ou na própria estabilidade da enzima, pois esta depende do tempo em que se mantém exposta ao pH desfavorável (Wiseman, 1991). As proteases são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas em relação à faixa de pH em que as atividades são ótimas (Sandhya *et al.*, 2005).

As proteases bacterianas ácidas possuem faixa ótima de pH entre 2,0 e 4,0, sendo produzidas principalmente por fungos e utilizadas na produção de queijos (Crueger & Crueger, 1993).

As proteases bacterianas neutras são ativas em uma faixa estreita de pH, entre 5,0 e 8,0 e possuem baixa termotolerância. Algumas destas proteases, como as metaloproteases, necessitam de íons metálicos divalentes para melhorar suas atividades enzimáticas (Seong *et al.*, 2004). São bastante utilizadas nas indústrias de alimentos por possuírem a função de hidrolisar aminoácidos hidrofóbicos, restritos ao pH neutro, conseqüentemente reduzindo o amargor das proteínas hidrolisadas nos alimentos (Sandhya *et al.*, 2005).

As proteases bacterianas alcalinas são caracterizadas pela sua alta atividade em pH alcalino, pela sua alta especificidade ao substrato, pela sua resistência a altas temperaturas e pela sua capacidade de resistir à ambientes com baixa atividade de água (Takami *et al.*, 1990). Este grupo de enzimas tem sua maior produção numa faixa de pH 6,0 –13,0 (Genckal & Tari, 2005). O aparecimento de enzimas adequadas, estáveis em pH alcalino, obtidas por fermentação de bactérias, podendo ser obtidas em maiores quantidades e menor tempo, com menor custo, possibilitou a utilização das enzimas na indústria de

detergentes (Lima *et al.*, 2001). As aplicações comerciais das proteases alcalinas incluem também a possibilidade do uso na catálise de peptídeos sintéticos e para resolver misturas racêmicas de aminoácidos (Sutar *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995).

2.5.2 Temperatura

A temperatura é uma variável crítica em alguns processos enzimáticos, produzindo simultaneamente efeitos opostos de aumento da reatividade enzimática e inativação (Illanes *et al.*, 2000). A variação da atividade enzimática em função da temperatura pode resultar no aumento da agitação das moléculas com elevação da temperatura, que aumenta a freqüência das colisões entre o substrato e a enzima e pode provocar a desnaturação da enzima, frente ao calor (Trevan *et al.*, 1990; Scriban *et al.*, 1985).

A velocidade de reação aumenta com a temperatura até um pico de velocidade ser atingido. Este aumento é devido ao número elevado de moléculas com energia suficiente para atravessar a barreira de energia e formar os produtos da reação. Uma elevação adicional da temperatura resulta em uma redução na velocidade de reação, como resultado da desnaturação da enzima induzida pela temperatura (Lehninger *et al.*, 2000).

Frankena *et al.*, (1985) mostrou que existe uma ligação entre a síntese da enzima e o metabolismo energético nos *Bacillus*, quando houve o controle da temperatura e do oxigênio. As temperaturas ótimas para produção de protease estão mencionadas na tabela 2.

Tabela 2: Temperaturas ótimas para produção máxima de protease

Temperatura ótima (°C)	Organismo
28	<i>Penicillium griseofulvin</i>
30	<i>Bacillus sp.</i>
	<i>Streptomyces diastaticus</i>
32	<i>Aspergillus flavus</i>
35	<i>Bacillus sp.</i>
36	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus sp.</i>
37	<i>Bacillus alcalophilus</i>
	<i>Bacillus firmus</i>
39,5	<i>Bacillus licheniformis</i>
40	<i>Bacillus sp.</i>
45	<i>Bacillus thermoruber</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
52	<i>Thermoactinomyicetes</i>
55	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
60	<i>Bacillus stearothermophilus</i>

Fonte: Kumar & Takagi (1999)

2.5.3 Agentes inibidores

Os inibidores de proteases possuem uma significativa função na regulação da proteólise, sendo as proteases de origem endógena ou exógena. Eles permitem a regulação da taxa de proteólise na presença da enzima ativa (Cherqui *et al.*, 2001).

Os agentes inibidores de proteases são componentes que reduzem a medida da taxa de hidrólise de um dado substrato. Estes inibidores subdividem-se em duas classes: os de ligação irreversível, quando os inibidores se ligam irreversivelmente a enzima, modificando sua estrutura química e seu sítio de ação, e os de ligação reversível (Beynon, 1996). Esta última pode ser do tipo competitiva, sendo revertida com o aumento da concentração de substrato ou do tipo não competitiva, que não pode ser revertida com o aumento do substrato,

podendo ser diminuída através da redução da concentração de substrato utilizada (Wiseman, 1991).

As proteases alcalinas são completamente inibidas pelo fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e disopropil fluorofosfato (DFP). O PMSF é inibidor específico de serina proteases, fazendo com que ela tenha sua atividade diminuída. Outras proteases são sensíveis a agentes quelantes, como o EDTA e são conhecidas como metaloproteases (Kumar & Takagi, 1999). Alguns inibidores específicos de proteases estão listados na tabela 3.

Tabela 3: Inibidores específicos de proteases

Tipo de Protease	Inibidores
Serina	Organofosforados (DFP, Di-isopropil-fosfofluoridrato), sulfonil-fluorido(PMSF), ácidos peptídicos borônicos, inibidores protéicos (aprotinina) e inibidores seletivos.
Cisteína	Diazometanos peptídicos, peptídeos epóxidos, cistatinas, inibidores seletivos.
Metaló	Inibidores protéicos (TIMP), quelantes metálicos (EDTA e EGTA e 1-10-fenantrolina).
Aspartil	Pepsatina A

Fonte: Beynon, (1996) e Chaia *et al* (2000)

2.5.4 Íons metálicos

Íons metálicos são importantes cofatores, que são substâncias não-protéicas que tomam parte das reações enzimáticas e são regeneradas para serem utilizadas em reações futuras. Diversas enzimas necessitam da presença de íons, entre as quais incluem-se as metaloproteases. O envolvimento de Zn^{2+} na atividade enzimática da carboxipeptidase é um exemplo desse tipo de comportamento. A carboxipeptidase é uma metaloprotease que catalisa a hidrólise

da ligação peptídica C-terminal das proteínas. O Zn^{2+} que é requerido para a atividade da enzima, é complexado com a cadeia lateral imidazólica das histidinas e com o carboxilato da cadeia lateral do glutamato. O íon zinco está, além disso, complexado ao substrato (Campbel, 2001).

Algumas proteases, como as proteases alcalinas, requerem íons metálicos divalentes como o Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} ou a combinação desses cátions para à obtenção de uma maior atividade (Kumar & Takagi, 1999). Acredita-se que esses cátions protegem a enzima contra a desnaturação em função da temperatura, mantendo a atividade em altas temperaturas (Satoshi & Noriaki, 2004).

Entretanto, alguns íons metálicos atuam como inibidores na atividade enzimática. O íon Hg^{+2} tem sido frequentemente associado com inibição da atividade catalítica de proteases (Kumar & Takagi, 1999).

Alguns íons metálicos divalentes como o cálcio, cobalto, bário, ferro, magnésio, manganês e molibdênio são requeridos no meio de fermentação para uma maior produção de certas proteases (Kumar & Takagi, 1999).

2.6 Purificação das proteases bacterianas

No processo de recuperação e purificação de um metabólito celular, é de suma importância sabermos a sua localização, ou seja, se ele é extracelular ou intracelular. Esse conhecimento facilita e muito o processo, pois sendo extracelular, a extração é desnecessária, o que não acontece quando é intracelular ou ligada à membrana. A maioria das proteases bacterianas é extracelular (Trevan *et al.*, 1990).

Para a realização da purificação das proteases é necessário levarmos em consideração suas características e suas massas moleculares (Bressollier *et al.*, 1999). O conhecimento prévio sobre a estabilidade frente às variações de temperatura, pH, detergentes é necessário para a obtenção de uma boa purificação (Beynon, 1996).

A separação da biomassa celular do sobrenadante é a primeira etapa, que pode ser realizado por floculação, filtração, flotação ou centrifugação (Kumar & Takagi, 1999). O segundo passo consiste na concentração da enzima, pois as próximas etapas utilizam um pequeno volume de amostra (Beynon, 1996).

A precipitação é o método mais comum utilizado para o isolamento e recuperação de proteínas de meios de cultivo. Normalmente se utiliza um sal ou um solvente orgânico, com baixo teor de solubilidade e desidratação de proteínas na fase aquosa (Kumar & Takagi, 1999). A precipitação com sulfato de amônio é a mais utilizada, pois é um procedimento simples e barato que produz graus consideráveis de recuperação e purificação, além do fato de que o sulfato de amônio aumenta a estabilidade de muitas enzimas (Trevan *et al.*, 1990).

Outras etapas são utilizadas após a precipitação. As mais freqüentes são as que utilizam a cromatografia em coluna, que podem ser de gel filtração, troca iônica e de interação hidrofóbica, sendo essas as etapas mais caras do processo (Beynon, 1996). Ao isolarmos uma enzima para fins comerciais, devemos levar em consideração o custo da produção em relação ao valor do produto final, ou seja, verificarmos se a purificação passando por todas as etapas é necessária (Kumar & Takagi, 1999).

2.7 Utilização de protease como agente de modificação de proteínas

Na indústria alimentícia, algumas das propriedades características das proteínas, como a solubilidade, a capacidade emulsificante, capacidade de retenção de água e gordura, se reduz com o decorrer do processamento dos alimentos. Essa redução interfere na produção de muitos alimentos que necessitam de proteínas com alto grau de funcionalidade (Wiseman, 1991).

A hidrólise enzimática de proteínas está sendo muito utilizada na indústria, pois não reduz o valor nutricional e possui a vantagem de ter uma especificidade melhor, além de não possuir toxicidade (Bernardi *et al.*, 1991). As proteases bacterianas possuem importante aplicação na hidrólise de proteínas de soja, tornando-as solúveis para a utilização em bebidas, agregando valor nutritivo a estas (Wiseman, 1991).

O efeito da adição de proteases na massa do *cracker* foi relatado por Lima *et al.* (1998), que demonstraram o aumento de 5% na solubilidade dos extratos protéicos das massas após 12 horas de fermentação das esponjas, sendo atribuído principalmente, à proteólise do glúten. Recentemente, a utilização de protease para a produção de um hidrolisado de resíduo de atum foi estudada com o objetivo de solubilizá-lo para a utilização como fonte protéica em rações animais (Guerard *et al.*, 2002).

Assim, a hidrólise de proteínas é uma tecnologia que agrega valor e funcionalidade, além de ampliar as aplicações dos materiais pouco convencionais, como subprodutos e resíduos da indústria alimentícia (Donald *et al.*, 1994).

2.8 Utilização de enzimas no processo de depilação do couro

A indústria do couro possui a preocupação constante de diminuir os odores e a poluição causada pelo sulfeto de sódio (e seus gases), extremamente tóxico, que é amplamente utilizado na etapa de depilação do couro (Roth *et al.*, 1995). Os métodos normalmente utilizados no processo de depilação do couro envolvem essas substâncias químicas, tóxicas, que podem causar, além de danos aos trabalhadores, problemas ambientais, tais como a poluição e a deposição de resíduos. O sulfeto de selênio também causa sérias corrosões em metais e concreto, devido a sua oxidação biológica até ácido sulfúrico (Balasubramanian & Pugalenti, 2000).

A utilização de enzimas neste processo é com certeza uma boa alternativa para o aumento da qualidade do couro e também pra redução do índice de poluição ambiental (Rao *et al.*, 1998). Já em 1910, com Otto Rohm, se fez uso de enzimas pancreáticas em uma das etapas da depilação (no remolho). Entretanto, devido à falta de especificidade e ao tempo de depilação ser de 24h, este método não foi empregado. Buscou-se então, um método mais rápido, com um custo mais baixo, utilizando-se enzimas microbianas (Germann, 1997).

No processamento de couros as proteases encontram uma ampla aplicação durante as várias fases. Na fase inicial de limpeza é necessário haver uma re-hidratação, passando pela remoção de pêlos, onde é utilizada uma protease alcalina, porque o pH básico ajuda na exposição dos folículos pilosos, facilitando

sua remoção. Nas fases finais é necessária a degradação parcial da queratina e elastina presentes, existindo a ação devido à quebra do colágeno (Lima *et al.*, 2001).

Estudos utilizando o sobrenadante de um meio de cultivo de *Bacillus subtilis* como fonte de enzima foram realizados e a atividade depilatória foi testada. As peles de ovelhas tratadas com estas enzimas tiveram seus pêlos removidos sem dano à estrutura fibrosa (Varela *et al.*, 1996). Malathi & Chakraborty.(1991) obtiveram resultados semelhantes a estes. Recentemente, Macedo *et al.* (2005) descreveram uma nova protease de *Bacillus subtilis* capaz de promover a depilação de peles bovinas sem causar dano ao colágeno.

Tecnologicamente e ecologicamente, a depilação enzimática tem sido considerada a melhor alternativa para o processo de depilação (Germann, 1997). A seleção de enzimas com especificidade para os substratos como elastina e queratina pode diminuir a quantidade de enzima utilizada no processo de depilação, reduzir a formação de resíduos, bem como o consumo de energia (Rao *et al.*, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos selecionados

Foram utilizadas três linhagens bacterianas de *Bacillus* sp., BL16, BL17, BL20, previamente isoladas (Heck, 2001) para padronizar as condições ideais de cultivo bacteriano e produção de protease alcalina.

3.1.1. Identificação dos microrganismos

As identificações dos microrganismos selecionados foram baseadas em análises morfológicas e bioquímicas, comparando os dados com os de espécie padrão e também usando o kit API-50CHB (bioMérieux) com análise dos resultados pelo software APILAB Plus (bioMérieux). As características morfológicas, culturais e fisiológicas foram comparadas com os dados encontrados no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Sneath *et al.*,1984).

As linhagens bacterianas BL16, BL17 e BL20 foram identificadas a partir do seqüenciamento do gene 16S do DNA ribossômico. Os seqüenciamentos foram

realizados na Universidade de Lausanne (Suíça), após a extração do DNA genômico e amplificação dos fragmentos por PCR, Osborn *et al.*(1999).

As seqüências nucleotídicas do gene 16S rRNA foram submetidas ao GenBank (nº acesso DQ3887864 a DQ3887866). O algoritmo BLAST foi usado para localizar seqüências homólogas no GenBank. O cálculo da distância e a construção da árvore filogenética foram realizados pelo método de *neighbour-joining* usando o programa MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura e Nei 2004). Outras seqüências nucleotídicas do gene 16S rRNA utilizadas nas análises filogenéticas, foram obtidas no GenBank (nº acesso AY620954, AY651023, AY530960, AY530960, AY605932, AJ620368, AY603656, AB021191, AJ276351, AB021198 e AB021181).

3.1.2. Manutenção e estoque dos microrganismos

As culturas bacterianas foram mantidas em placa de Ágar nutriente e repicadas a cada 15 dias. Estas foram mantidas congeladas a -20°C em seus respectivos meios com 20% de glicerol.

3.2. Caracterização das proteases no extrato bruto

3.2.1 Meios de cultura

Os meios de cultura e diluente utilizados para o isolamento, seleção e manutenção dos microrganismos estudados foram: Água Peptonada 0,1%, Ágar Farinha de Pena (AFP), Ágar Nutriente (NA), Ágar leite (AL), Caldo farinha de pena (CFP) e BHI. A composição dos meios encontra-se listada no apêndice 7. O pH dos meios foi ajustado conforme necessário com NaOH (1N) ou HCl (1N).

3.2.2 Farinha de pena

A farinha de pena utilizada como componente em meios de cultura e síntese de substrato para ensaios enzimáticos (azocaseína) foi obtida a partir de cocção sob pressão e moagem pela empresa Etna Agroindústria Ltda. (Brasil) e fornecida em lote de 20Kg.

3.2.3 Verificação da atividade proteolítica das linhagens bacterianas

Para a determinação da atividade proteolítica das linhagens utilizou-se o teste de formação de halo em placas de Ágar leite (AL). As três linhagens bacterianas foram inoculadas com agulha nas placas, devidamente ajustadas aos diferentes pHs (7, 8, 9, 10 e 11) e incubadas na temperatura de 30°C durante 24h. Após este período fez-se a medição em milímetros dos halos formados.

3.2.4 Cultivo dos isolados

Os inóculos foram feitos a partir de raspagem das culturas bacterianas mantidas em placas de BHI, na temperatura de 4°C, sob condições estéreis. O meio de cultura utilizado para realização da caracterização da enzima foi o caldo farinha de pena (CFP).

3.2.5 Produção da enzima

A produção da enzima foi conduzida por incubação durante 48h em uma estufa com agitação (125 rpm) na temperatura de 30°C. Uma amostra do cultivo foi centrifugada em tubos de microcentrífuga a 10000g/5 min para a separação da biomassa celular e das substâncias insolúveis do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima para as análises de atividade enzimática.

3.2.6 Ensaio enzimático

A atividade das proteases foi analisada com o substrato azocaseína utilizando o seguinte método: 100 µl do extrato do sobrenadante foi misturado a 100 µl do tampão tris 0,1M pH 9. Foi adicionado 100 µl do substrato (azocaseína 10mg/ml). Essa mistura foi incubada por 30 min a 37 °C e a reação interrompida adicionando-se 500µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação a 10.000 x g por 5 min ser realizada, nos 800µl do sobrenadante adicionou-se 200µl de NaOH 1,8N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420nm. Uma unidade enzimática é definida como a

quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste. Um controle foi realizado adicionando-se as mesmas quantidades de extrato do sobrenadante, de tampão tris 0,1M pH 9 e do substrato (azocaseína 10mg/ml) ao TCA10%. Seguiu-se o mesmo procedimento.

3.2.7 Determinação da atividade da enzima com diferentes substratos

Foi utilizado o mesmo ensaio enzimático já detalhado, com a preparação da enzima anteriormente descrita. Os substratos testados foram azocaseína, albumina e gelatina, dissolvidos em tampão fosfato 0,1M, pH 7, na concentração de 10mg/ml. A leitura da amostra com o substrato azocaseína foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420nm, já as amostras de albumina e gelatina foram lidas no comprimento de onda de 280nm.

3.2.8 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática

Para determinação da temperatura ótima, foi utilizada a metodologia já descrita no item 3.2.6, variando-se apenas as temperaturas de incubação. As temperaturas utilizadas foram 10, 28, 37, 55, 65, 75°C.

3.2.9 Determinação do pH ótimo de atividade enzimática

O ensaio para pH ótimo da atividade enzimática foi realizado da mesma maneira descrita no item 3.2.6, substituindo-se apenas o tampão utilizado pelos tampões citrato de sódio 0,1M (pH 4 e 5), fosfato de sódio 0,1M (pH 6, 7, 8) e Tris 0,1M (pH 9 e 10).

3.2.10 Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática

O efeito de inibidores sobre a enzima foi medido através do mesmo método descrito no item 3.2.6, exceto pela utilização dos inibidores nas concentrações indicadas no meio reacional e produção da enzima conforme ao item 3.2.5. Foi realizada uma pré-incubação da enzima com o inibidor por 10 minutos, na temperatura de incubação utilizada pela análise enzimática. Os inibidores utilizados foram: EDTA (5mM), PMSF (2mM), 1,10-fenantrolina (1mM) e benzamidina (1mM). Um controle foi realizado através da realização da atividade enzimática sem a adição de inibidores. A atividade para cada tipo de protease foi calculada como: porcentagem da atividade específica = $(A - A_i / A) \times 100$, onde A é a atividade total sem inibidores e A_i é a atividade com inibidor específico.

3.2.11 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Foi realizada a mesma metodologia já descrita, exceto pela adição de substâncias químicas em determinadas concentrações no meio reacional e pela

suas pré-incubações com a enzima testada por 10 minutos à temperatura ambiente. As substâncias químicas testadas foram: CaCl_2 , BaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , HgCl_2 na concentração final no meio reacional de 5mM.

3.2.12 Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática

A metodologia utilizada foi a mesma do item 3.2.6, exceto pela adição dos detergentes às enzimas, durante 10 minutos em uma temperatura de 37°C. Os detergentes testados foram os seguintes: Tween 20, SDS e Triton X100, todos a uma concentração de 0,5%.

3.2.13 Estabilidade térmica das enzimas

Para verificação da estabilidade térmica e da atividade enzimática utilizou-se o mesmo ensaio já descrito, com a preparação da enzima como no item 3.2.5, exceto pela pré-incubação da enzima nas temperaturas de 37°C e 55°C nos tempos de 0, 10, 20, 30, 60 minutos antes do ensaio de atividade enzimática.

3.3 Purificação parcial das enzimas

3.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

A linhagem bacteriana BL16 foi cultivada em condições ótimas de produção da enzima, sendo o volume do cultivo de 100ml. O inóculo foi realizado como descritos no item 3.2.4.

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada com o sobrenadante do cultivo, obtido através da centrifugação deste a 10000g/ 15min/ 4°C.

As faixas de saturação utilizadas para a linhagem bacteriana BL16 foram: 0-30%, 30-60% e de 60-100%. O experimento foi conduzido sob condições de refrigeração e agitação. As quantidades de sulfato de amônio pesadas para cada precipitação foram calculadas com base no volume de sobrenadante do cultivo sujeito à precipitação segundo Scopes (1992).

Após a adição da quantidade de sulfato de amônio adequada para cada etapa da precipitação fracionada, a suspensão formada foi mantida por 1 hora sob refrigeração e após foi centrifugada nas mesmas condições da centrifugação do cultivo, citada anteriormente, e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de tampão fosfato 10mM, pH 8,0. O sobrenadante resultante foi conduzido para a etapa de precipitação posterior, até a última etapa (60-80%).

Amostras de cada etapa da precipitação foram armazenadas para posterior determinação da concentração de proteína solúvel e atividade enzimática.

3.3.2 Determinação da proteína solúvel e da atividade enzimática das etapas da precipitação fracionada

O material obtido em cada etapa foi submetido a análises para a determinação da concentração de proteína solúvel e da atividade enzimática. As

metodologias utilizadas foram a de Lowry (1951) e de Secades & Guijarro (1999), para a análise de proteína solúvel e de atividade proteolítica.

3.4 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Alíquotas de 1ml do sobrenadante do cultivo foram utilizados para realização do gel. Em tubo de microcentrífuga adicionou-se 10 μ l da amostra + 10 μ l do tampão tris-HCl, 0,125M, pH 6,8, contendo 2% de SDS e 10% de glicerol + 10 μ l do íon Ca²⁺. A cada uma das alíquotas foi adicionado 10% de 2-mercaptoetanol e estas foram colocadas em banho-maria a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e a eletroforese foi realizada utilizando um sistema Mighty Small (Hoefer Scientific) com uma corrente de 20mA.

3.5 Zimograma

O extrato enzimático foi incubado com igual volume do tampão de amostra (100mM de Tris HCl, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,02%) por 10 minutos. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 16,5% contendo 1mg/ml de gelatina. O gel foi lavado com Tris HCl 50mM, pH 8,0, contendo Triton X-100 2,5% por 30 minutos duas vezes. Após, o gel foi incubado com Tris HCl, pH 7,4 contendo 0,5% de NaN₃ a 37°C durante 12 horas. Após o gel foi fixado com metanol 50% contendo 10% de ácido acético e corado com Commassie blue (Koshikawa *et al.*, 1998).

3.6 Avaliação da atividade depilatória

3.6.1. Preparação da pele bovina para ensaio de atividade depilatória

Pedaços de pele bovina fresca foram utilizadas para o experimento de depilação e foram gentilmente cedidas pelo frigorífico Três CSA.

As peles bovinas foram recebidas na condição de pele fresca, sem terem sido submetidas a nenhum processamento. Primeiramente, estas passaram por um descarte seguido de incubação por duas horas com tensoativo comercial para desengorduramento. Em seguida, as peles foram lavadas em água corrente e água destilada e cortadas em pedaços de aproximadamente 10x10 centímetros para o experimento de depilação.

3.6.2. Ensaio de depilação

O microrganismo isolado foi cultivado em Enrlenmeyer de 500mL com 100mL de CFP, conforme o item 3.2.4. Após 48 horas de cultivo, o meio foi centrifugado a 10000g/ 5 min/ 4°C e determinada a atividade queratinolítica do sobrenadante como item 3.2.6.

O sobrenadante com atividade foi colocado em contato com as peles preparadas como no item 3.6.1, na proporção de 50% (m/v) à temperatura ambiente, em frascos de 2 litros. O controle negativo foi preparado utilizando-se o mesmo tratamento, sendo substituído o sobrenadante por água destilada. Após aproximadamente 24 horas de incubação, as peles foram retiradas para análise.

3.6.3. Avaliação visual das peles tratadas

As peles retiradas dos frascos foram analisadas quanto a três aspectos principais, comparadas ao controle negativo:

- Presença e/ou ausência de áreas depiladas;
- Desprendimento ou não de pêlos quando submetidos à ação mecânica com uma pinça;
- Colaboração dos pêlos após incubação.

Em seguida, as peles tratadas e o controle foram depositadas em recipientes com formol tamponado (composição descrita no apêndice 6).

3.6.4. Avaliação microscópica das peles tratadas

3.6.4.1. Preparo

O preparo das peles para análises histológicas foi realizado segundo Prophet *et al.* (1992). Os fragmentos das peles e o controle foram fixados em formol tamponado a 10% durante 3 dias, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos com espessura de 3 um a 5 um foram feitos em micrótomo rotatório e fixados em lâminas histológicas. Após secagem, os cortes foram desparafinados e corados por coloração de hematoxilina-eosina.

3.6.4.2. Análise

A análise histológica foi realizada pelo professor David Driemeier do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Veterinária, desta mesma

Universidade. Os cortes histológicos preparados no item anterior foram examinados em microscópio ótico em diversos aumentos, fotografados e analisados considerando os seguintes aspectos:

- Presença ou ausência de epiderme;
- Presença ou ausência de folículos pilosos;
- Aparência da derme.

3.7 Aplicação da enzima produzida pela BL16 como agente de modificação de proteína de soja e soro de queijo

3.7.1 Obtenção da enzima

A obtenção da enzima para a utilização como agente modificador de propriedades funcionais de proteínas se deu conforme descrito no item 3.3.1, entretanto somente a precipitação na faixa de saturação de 30-60% foi realizada, devido ao fato de que nesta faixa encontrou-se a melhor relação entre a enzima precipitada e quantidade de sulfato de amônio adicionado. Após a precipitação com o sulfato de amônio, o material precipitado foi submetido à diálise contra água, sob agitação e refrigeração, para a retirada do sal (sulfato de amônio), durante 24 horas.

3.7.2 Avaliação da utilização da enzima como agente modificador das propriedades funcionais da proteína isolada

Soluções de 6% de proteína isolada de soja (Bunge Alimentos) e proteína isolada de soro de queijo em tampão fosfato 10mM, pH7,0 foram preparadas e a

partir destas foram feitos hidrolisados com diferentes concentrações de enzima. O preparo dos hidrolisados foi feito através da incubação das soluções de proteína de soja e soro de queijo (6%) com a enzima em diferentes concentrações a 37°C, durante 60 minutos. O controle foi feito sem a adição da enzima ao substrato. A relação de enzima/substrato utilizada para os hidrolisados foi: hidrolisado 1 (H1) 0,1/10, hidrolisado 2 (H2) 0,5/10 e hidrolisado 3 (H3) 1,0/10.

3.7.3 Avaliação da capacidade de formação de espuma

Para a determinação da capacidade de formação de espuma, 5 ml dos hidrolisados (obtidos conforme item 3.7.2), diluídos a 3% em tampão fosfato 10mM, pH 7,0 foram agitados em uma proveta, durante 3 minutos, através de um misturador (Vortex). O aumento de volume na proveta foi medido através da fórmula:

$$\% \text{aumento Volume} = ((V_f - V_i) / V_i) \times 100$$

A estabilidade da espuma também foi determinada, através da medida do volume na proveta, 10 minutos após a agitação, segundo Kato *et al.* (1993).

3.7.4. Avaliação da capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante foi medida a partir dos hidrolisados (obtidos conforme item 3.7.2.) diluídos a 1% (v/v) em tampão fosfato, 10mM, pH 7,0. Para isto, 1ml de óleo de soja foi adicionado aos hidrolisados e a mistura formada foi

agitada durante 1 minuto, no vórtex. A partir desta, alíquotas de 100 μ l foram diluídas em 5ml de SDS 0,1% a cada 5 minutos, começando pelo tempo zero (término da agitação da mistura) até 20 minutos. A absorbância das alíquotas foi medida em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 500nm.

Para avaliação da capacidade emulsificante em condições de alta concentração de sal e acidez, o mesmo procedimento foi realizado, com a diferença que os hidrolisados foram diluídos em tampão fosfato, 10mM, pH 7,0, contendo 0,2M de NaCl, e em tampão citrato pH 3,0, respectivamente.

Para a avaliação da capacidade emulsificante em altas temperaturas, a mistura dos hidrolisados e óleo de soja, após agitação por 1 minuto, permaneceram durante 3 minutos a temperatura de 100°C. Após o mesmo procedimento anteriormente descrito foi realizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos microrganismos

4.1.1. Morfologia colonial e celular

A morfologia colonial das linhagens BL16, bem como da BL17 e BL20 foi observada após 24h de crescimento em meio Agar leite (AL). As colônias possuem forma circular, consistência mucóide, superfície lisa e coloração amarelo-parda.

As linhagens apresentaram coloração de Gram variável, mas foram positivas no teste de KOH. Foi verificada a presença de esporos.

4.1.2. Testes bioquímicos

Os resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados podem ser visualizados na tabela 4. Comparados ao *Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática* (Sneath *et al.*,1984), apresentam várias características compatíveis com *Bacillus* spp. Foi utilizado um kit API 50CHB, e os resultados analisados pelo

software APILAB Plus. Os resultados preliminares confirmaram que as linhagens bacterianas BL16, BL17 e BL20 pertencem ao gênero *Bacillus*.

Tabela 4: Características bioquímicas e fisiológicas das linhagens bacterianas.

Testes Bioquímicos	BL16	BL17	BL20
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Gelatinase	+	+	+
Lipase	+	+	+
Urease	-	-	-
Citrato	-	-	-
Hidrólise de amido	+	+	+
Nitrato	+	+	+
Motilidade	-	+	+
Prova de vermelho-metil	-	-	-
Prova de Voges-Proskauer	+	+	+
TSI	ácido/	ácido/ H ₂ S(-)	
β-hemólise	+	+	+
Crescimento			
Aerobiose	+	+	+
Microaerofilia	+	+	+
Anaerobiose	-	-	-

4.1.3 Sequenciamento

O sequenciamento do gene 16S do DNA ribossômico e a comparação das seqüências nucleotídicas das linhagens bacterianas BL16, BL17 e BL20 indicaram alto grau de similaridade, estando estas relacionadas com o gênero *Bacillus*. Como observado na árvore filogenética (Figura 1), ocorreu a formação de dois grupos distintos.

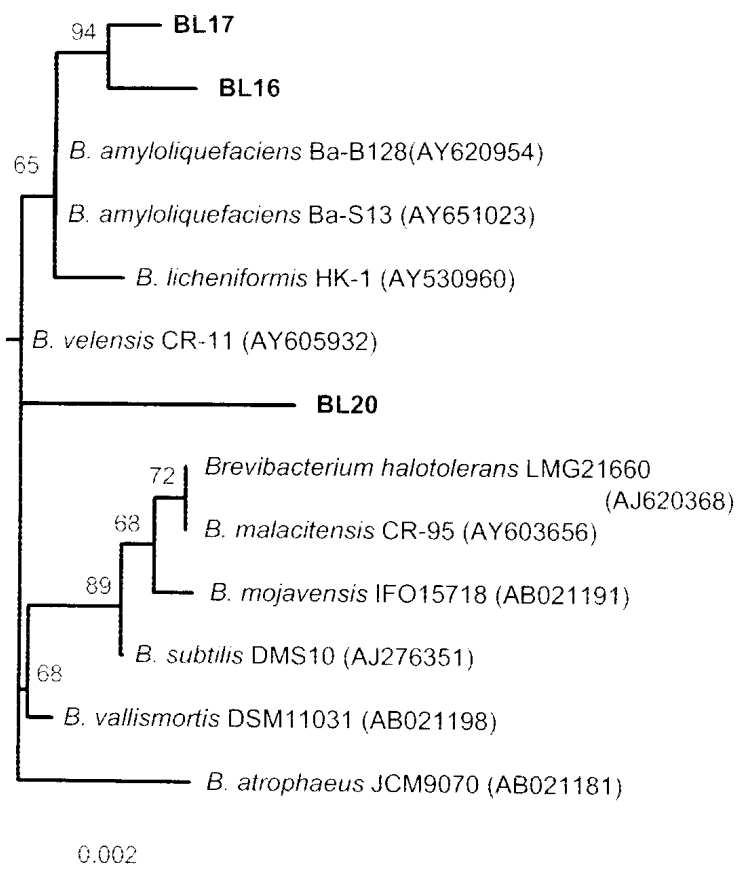


Figura 1. Posição filogenética das linhagens BL16, BL17 e BL20 pertencentes ao gênero *Bacillus*. O padrão de ramificações foi gerado usando o método neighbour-joining. O número de acesso no GenBank das seqüências nucleotídicas do gene 16S rRNA estão indicadas entre parênteses.

O primeiro grupo constituído pelas linhagens bacterianas BL16 e BL17, embora apresente características bioquímicas distintas (motilidade), foi altamente relacionado entre si e com as cepas bacterianas isoladas na China pertencentes a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* (nº acesso AY620954 e AY651023). Também apresentaram alta relação com a linhagem bacteriana da espécie *Bacillus licheniformis* (nº acesso AY530960). Ambas as linhagens de *Bacillus*, foram submetidas diretamente ao GenBank pelos pesquisadores Hsieh e Korkmaz no ano de 2004, porém sem publicação prévia. O segundo grupo constituído pela BL20, foi relacionado com a linhagem bacteriana da espécie *Bacillus velensis* (nº acesso AY530960), depositada no GenBank como reportado por Perez-Losada *et al.*, (2004).

4.2 Atividade proteolítica dos isolados

A determinação da atividade proteolítica dos isolados foi realizada em placas de AL, incubadas na temperatura de 30°C durante 24h. Os microrganismos produziram halos de proteólise no pH 7, 8, 9 e 10. Os halos proteolíticos foram maiores no pH 7, entretanto apresentaram halo de proteólise também em pH mais alcalino. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 5. Os halos formados confirmam a característica proteolítica das cepas. Esse resultado também foi encontrado por Riffel (2002) quando submeteu seus isolados a temperatura de 30°C inoculados em placas de AL.

Tabela 5: Efeito do pH na atividade proteolítica dos isolados ^a

pH	BL16	BL17	BL20
pH 7,0	8	6	5
pH 8,0	3	1	3
pH 9,0	2	0,7	2
pH 10	2	0	0,5
pH 11	0	0	0

^a A atividade proteolítica foi determinada como a distância (mm) entre os halos e as colônias após 24 horas de crescimento

4.3. Caracterização das proteases no extrato bruto

4.3.1. Temperatura ótima de atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas produzidas pelas linhagens BL16, BL17 e BL20, no extrato bruto encontra-se na figura 2. A atividade enzimática foi observada entre 37°C e 65°C, nas linhagens BL16 e BL20. Na BL17 a atividade foi observada em uma faixa de temperatura mais estreita, entre 37°C e 50°C. A temperatura ótima para atividade enzimática foi de 37°C. Entretanto, em temperatura de 55°C, a BL16 permaneceu com 80% de sua atividade máxima e a BL17 e BL20 permaneceram com aproximadamente 60% de suas atividades.

Resultado semelhante foi verificado por Kobayashi *et al.* (1995), em que a protease extracelular oriunda de *Bacillus* sp. KSM-K16, também exibiu uma alta

estabilidade e atividade em temperatura de 55°C. Em geral enzimas que possuem características termoestáveis, suportam temperaturas na faixa de 50°C a 70°C, sendo bastante utilizadas na indústria química, principalmente na indústria de detergentes (Rahmon *et al.*, 1994).

Proteases queratolíticas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* apresentaram características termotolerantes e mantiveram-se estáveis a temperatura de 55°C, porém a temperatura ótima para produção da enzima foi de 37°C. Isso também foi verificado em protease produzida por *Staphylococcus* (Kim *et al.*, 2001).

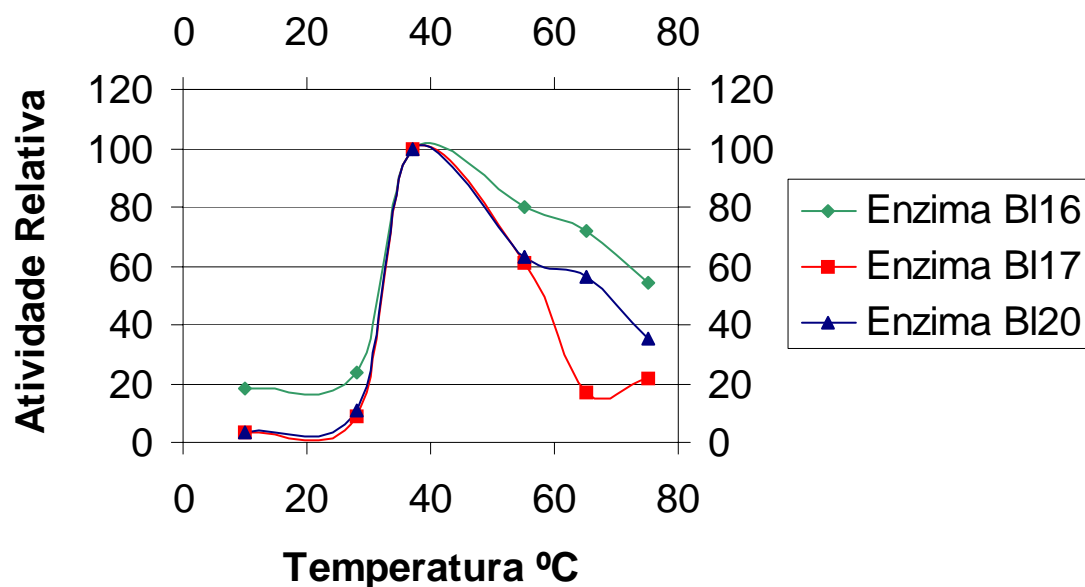


Figura 2: Efeito da variação da temperatura sobre a atividade enzimática das linhagens BL16, BL17 e BL20 no extrato bruto.

4.3.2 pH ótimo de atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática no extrato bruto das três linhagens está apresentado na figura 3. As enzimas apresentaram atividade entre o pH 5,0 e 10,0, com atividade máxima em pH 9,0, nas três linhagens. Entretanto, observou-se baixa atividade em pH inferior a 7,0. A atividade manteve-se também quando valores mais alcalinos de pH foram empregados. Este comportamento é encontrado facilmente em proteases bacterianas alcalinas. As proteases neutras normalmente possuem uma faixa de atividade de pH 6,0 a 8,0 (Rao *et al.*, 1998).

As proteases alcalinas possuem inúmeras aplicações na indústria e podem ser utilizadas também com ação depilatória. As proteases neutras são geralmente utilizadas em alimentos, pois geram um menor amargor em proteínas alimentares hidrolisadas (Rao *et al.*, 1998).

Resultado similar sobre a influência do pH na atividade enzimática foi reportado por Chellappan *et al.* (2005), em que mais de 80% da atividade máxima da protease de *E. album* BTMSF10 foi mantida entre pH 9,0 e 12, e abaixo do pH 8,0 as enzimas mostraram-se com 50% da atividade reduzida.

Proteases microbianas com atividade ótima em valores de pH entre 7,0 e 11,0 têm sido comumente apresentadas: pH 7,5 para *Streptomyces albidoflavus* (Bressolier *et al.* 1999), 8,0 para *Yersinia ruckeri* (Secades e Guijarro, 1999), 9,0 para *Pseudomonas aeruginosa* (Karadzic *et al.*, 2004), 10,0 para *Bacillus pumilus* (Huang *et al.*, 2003) e 11,0 para *Bacillus* sp (Tari *et al.*, 2005).

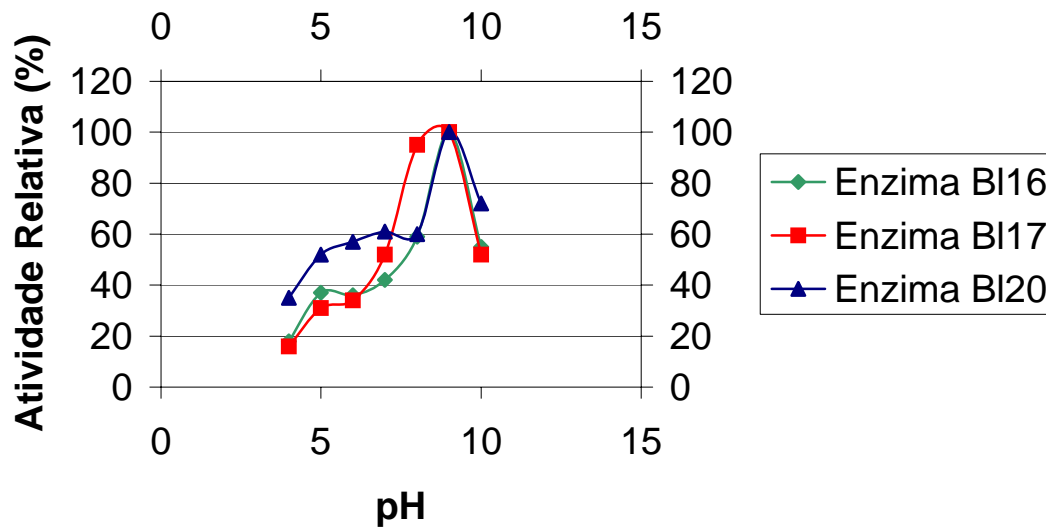


Figura 3: Efeito da variação do pH sobre a atividade enzimática da BL16, BL17 e BL20 no extrato bruto.

4.3.3 Atividade enzimática em diferentes substratos

Os isolados submetidos aos diferentes substratos tiveram suas atividades enzimáticas mensuradas como descrito na tabela 6. As enzimas produzidas pelas três linhagens apresentaram boa atividade quando adicionado o substrato azocaseína (Sigma). Já quando o ensaio enzimático foi realizado com os substratos gelatina e albumina e lidos no espectrofotômetro a 280nm, foi verificada uma melhor atividade com a gelatina. Este resultado indica que as enzimas

possuem atividade em mais de um substrato e a utilização de um substrato mais barato é viável.

Tabela 6: Atividade da enzima sobre diferentes substratos ^a. Cada ponto representa uma média duas repetições.

Substrato	Atividade enzimática(U/ml)		
	BL16	BL17	BL20
Azocaseína	1360	623	869
Albumina	659	577	667
Gelatina	790	632	801

^a O ensaio enzimático utilizou pH 9,0 e os substratos na concentração de 10mg/ml.

4.3.4 Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática

O efeito de inibidores sobre as enzimas está apresentado na tabela 7. Em todos os casos, as enzimas foram inibidas pelo PMSF. O agente quelante EDTA, não suprimiu a atividade enzimática do isolado BL20. As inibições pelo PMSF das enzimas lhes conferem característica de serina-protease. As enzimas produzidas pelos isolados BL16 e principalmente BL17 tiveram sua atividade enzimática também inibida pelo EDTA e 1,10-fenantrolina, inibidores específicos de metalloproteases.

Letourneau *et al.* (1998), observaram que a atividade queratinolítica de *Streptomyces* sp. é inibida tanto pelo EDTA quanto pelo PMSF. Já a atividade proteolítica produzida por *Bacillus clausii* foi inibida unicamente pelo PMSF (Kumar & Takagi, 1999).

A queratinase produzida pelo *Vibrio* sp. Kr2, também mostrou inibição frente a PMSF, mostrando um perfil de serina-protease (Sangali & Brandelli, 2000). A maioria das queratinases descritas até hoje são proteases do tipo serina, mas nem todas as enzimas do tipo serina-proteinase são capazes de degradar queratina nativa (Lin *et al.*, 1999; Friedrich & Antranikian, 1996; Böckle *et al.*, 1995).

Tabela 7: Efeito de inibidores específicos na atividade enzimática das proteases no extrato bruto. Cada ponto representa uma média de três repetições^a.

Inibidor	Atividade Relativa (%)		
	BL16	BL17	BL20
Controle	100	100	100
EDTA	58	16	98
PMSF	7	4	12
1,10- Fenantrolina	55	6	96
Benzamidina	16	*	42

^a A porcentagem das atividades específicas foram calculadas como descrito em material e métodos. * Não foi realizada análise

4.3.5 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

O efeito de íons metálicos na atividade enzimática das enzimas produzidas por BL16, BL17 e BL20, encontra-se nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente. Na linhagem BL16, a atividade manteve-se estável na presença de Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺ e

Zn^{2+} . A atividade foi inibida totalmente pelo Hg^{2+} , o que ocorreu também nas enzimas produzidas pelas linhagens BL17 e BL20. A inibição por íons Hg^{2+} tem sido relacionada com a ligação a grupos sulfidril (-SH), presentes no sítio ativo da enzima e também a interações com resíduos de triptofano ou com grupos carboxil de aminoácidos da enzima (Lusterio, 1992). Entretanto, os outros íons metálicos bivalentes aumentaram a atividade enzimática nos isolados BL17 e BL20.

Proteases de *Bacillus clausii* mostraram-se mais estáveis na presença de íons bivalentes (Kumar & Takagi, 1999). Resultado similar também encontrou Kazan *et al.* (2005). Íons metálicos protegem a enzima contra a desnaturação térmica e têm papel essencial na sustentação da atividade enzimática em altas temperaturas (Gupta & Beg, 2002).

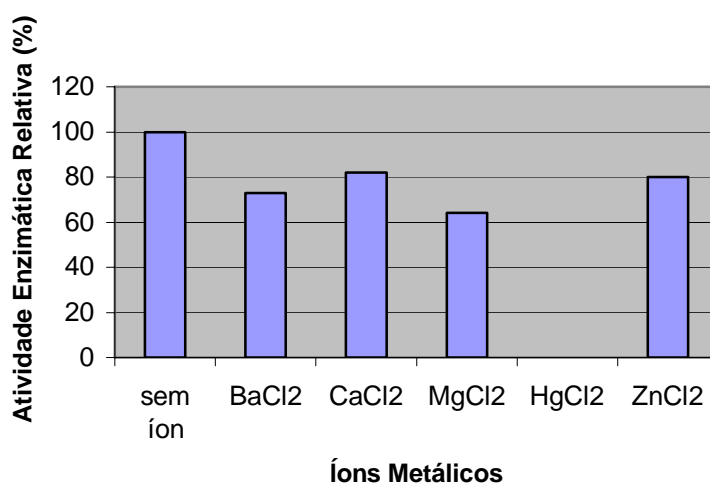


Figura 4: Efeito de íons na atividade enzimática do isolado BL16. O controle foi realizado através da hidrólise de azocaseína sem adição de íons. Cada ponto representa uma média de três repetições.

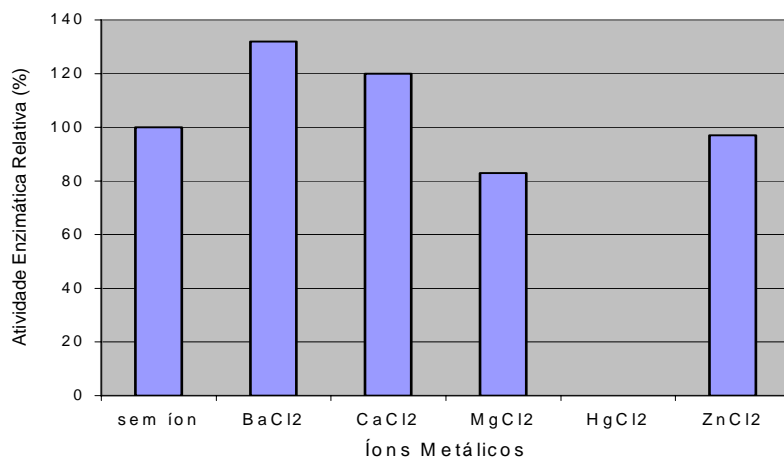


Figura 5: Efeito de íons na atividade enzimática do isolado BL17. O controle foi realizado através da hidrólise de azocaseína sem adição de íons. Cada ponto representa uma média de três repetições.

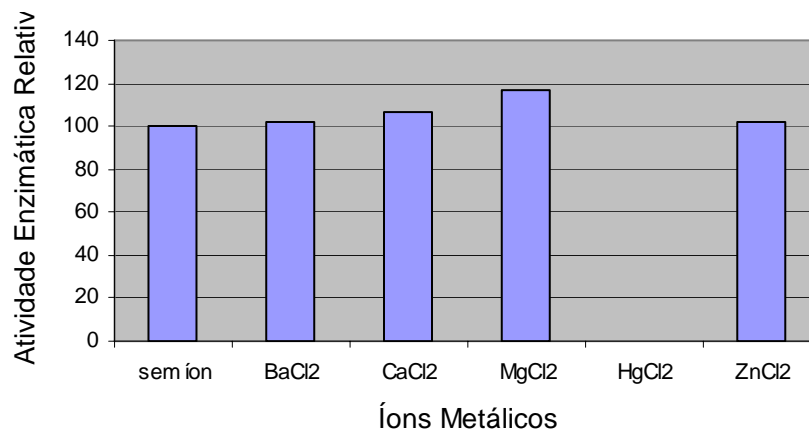


Figura 6: Efeito de íons na atividade enzimática do isolado BL 20. O controle foi realizado através da hidrólise de azocaseína sem adição de íons. Cada ponto representa uma média de três repetições.

4.3.6 Efeitos de detergentes sobre a atividade enzimática

O efeito de detergentes está mostrado na tabela 8. A atividade enzimática mostrou-se bastante estável frente aos diferentes tensoativos. A adição do SDS, do Triton X-100 e do Tween 20 resultou numa maior atividade em quase todos os casos, provavelmente devido à maior acessibilidade ao substrato.

As proteases oriundas das linhagens BL16, BL17 e BL20 mostraram-se estáveis à presença dos surfactantes, tendo grande potencial de tornarem-se fontes de protease para aplicação na indústria de detergentes.

Protease de *Bacillus clausii* mostrou estabilidade e compatibilidade na presença de surfactantes aniônicos como o SDS (Kumar & Takagi, 1999). Kobayashi *et al* (1995) reportou que uma protease alcalina de *Bacillus* sp. reteve aproximadamente 75% de sua atividade no tratamento com 5% de SDS.

Gupta (1999) reportou uma protease de *Bacillus* sp. SBS que conservou aproximadamente 60% de sua atividade quando tratada por 1 hora com 1% de SDS. Já a protease de *Bacillus* sp. JB-99 manteve 75% da atividade quando submetida ao tratamento por 1 hora com 0,5% de SDS (Johnvesly & Naik, 2001).

Alguns autores também observaram um aumento da atividade enzimática, na ordem de 20% na presença de SDS (Böckle *et al.*, 1995).

Tabela 8: Efeito de detergentes na atividade enzimática relativa. A determinação foi realizada em duplicata.

Detergente ^a	Atividade Relativa (%)		
	BL16	BL17	BL20
Controle	100	100	100
Triton X-100	107	105	126
Twen	88	99	114
SDS	114	110	108

^a A concentração dos detergentes foi de 0,5%.

4.3.7 Estabilidade térmica das enzimas

A atividade enzimática das linhagens bacterianas manteve-se estável na temperatura de 37°C por 30 minutos (Figuras 7, 8 e 9). Quando incubadas 60 minutos os isolados BL16 e BL20 tiveram suas atividades reduzidas a aproximadamente 40% da inicial, entretanto, o isolado BL17 teve uma redução mais considerável, chegando a 70% da atividade inicial. Quando submetidas a uma temperatura de 55°C (Figuras 7, 8 e 9), após 20 minutos, a atividade foi 50% menor que a atividade inicial e em 60 minutos de incubação esta atividade caiu para cerca de 10% da inicial. Estes resultados sugerem que estas proteases poderão ser utilizadas em aplicações envolvendo hidrólise de proteínas em temperaturas moderadas. Esta característica vem ao encontro do crescente interesse pelo desenvolvimento de processos industriais com menor gasto energético por operar a temperaturas moderadas (Chauhan & Gupta 2003).

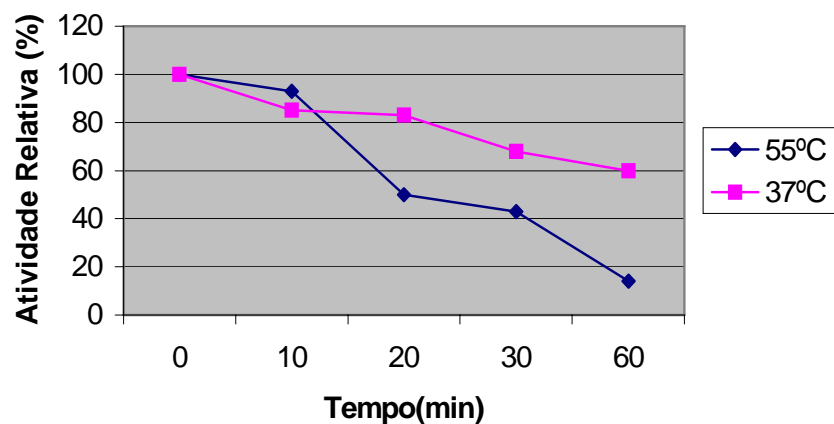


Figura 7: Estabilidade térmica da BL16, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

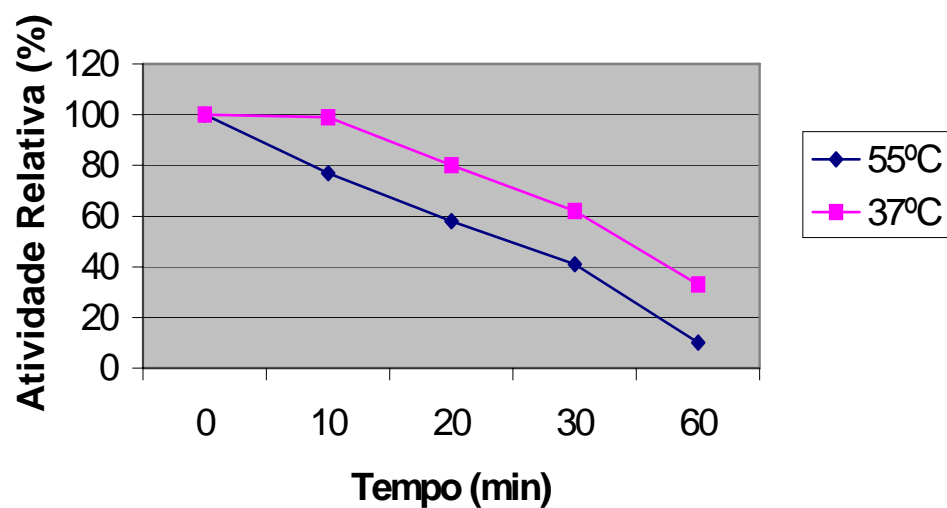


Figura 8: Estabilidade térmica da BL17, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

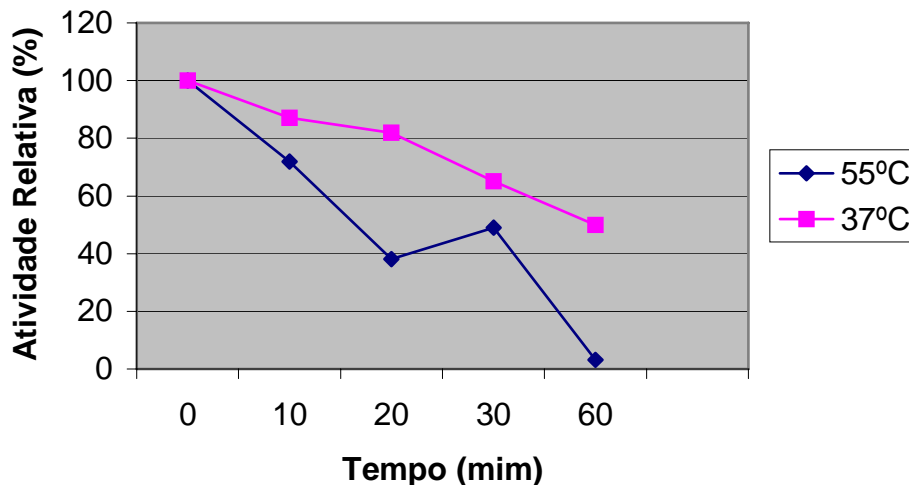


Figura 9: Estabilidade térmica da BL20, frente às temperaturas de 37°C e 55°C em diferentes tempos. Cada ponto representa uma média de duas repetições.

4.3.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As figuras 10 e 11 mostram os géis de eletroforese dos sobrenadantes dos cultivos das linhagens BL16, BL17 e BL20. Podemos observar nas canaletas 2, 3 e 4 as bandas referentes as proteínas do extrato bruto. Observou-se a presença de uma banda maioritária, correspondendo a 20 kDa para BL16, e de uma única banda de 23 e 32 KDa para BL17 e BL20, respectivamente. Estas bandas podem ser associadas com peptídeos derivados da queratina ou ainda com as enzimas secretadas pelas bactérias. Zaghoul *et al.* (1998) relatou a presença de múltiplas bandas de proteína após cultivo de linhagens queratinolíticas de *Bacillus* em penas de frango.

Geralmente o peso molecular de proteases oriundas de espécie de *Bacillus* está entre 15-40 KDa (Kazan *et al.*, 2005). Bressolier *et al.* (1999) apresentou uma

serina protease com peso molecular de 18 KDa, produzida por *Streptomyces albidoflavus*. Entretanto, há relatos de proteases alcalinas de *Bacillus* que possuem peso molecular entre 42-68 KDa (Kazan *et al.*,2005).

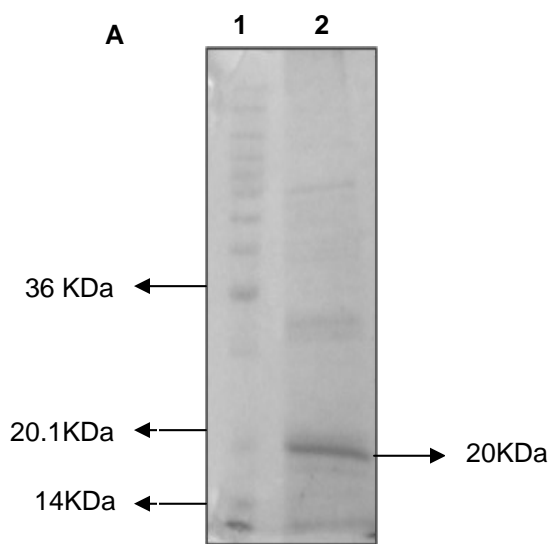
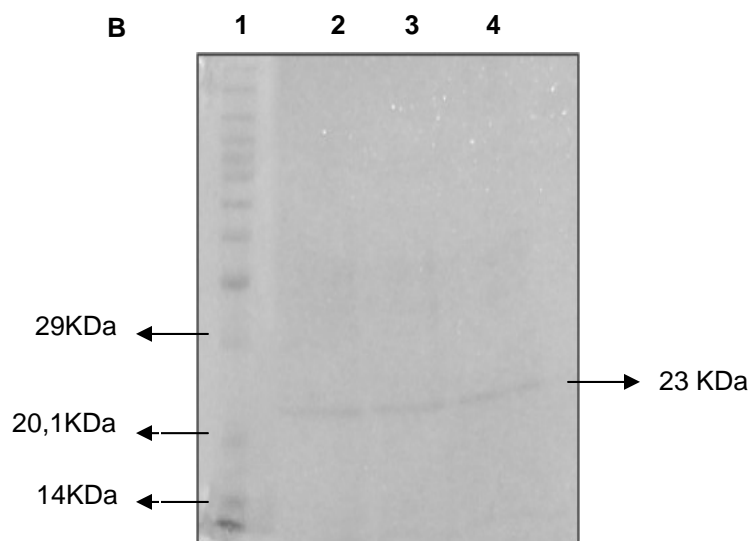


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% do extrato bruto da BL16 (A), Canaleta 1, marcador Wide Molecular Weight Standart (Sigma); canaletas 2, extrato bruto.



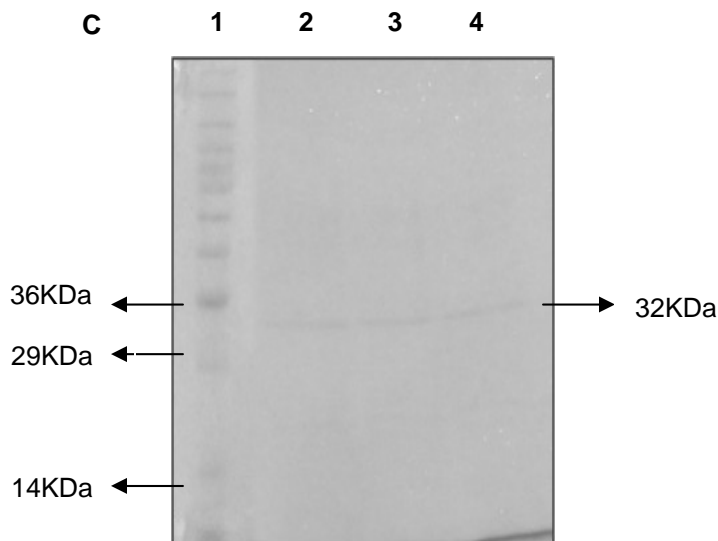


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% do extrato bruto BL17 (B) e BL20 (C). Canaleta 1, marcador Wide Molecular Weight Standart (Sigma); canaletas 2 – 4, extrato bruto.

4.3.9. Zimograma

A figura 12 mostra o zimograma com gelatina dos extratos brutos. Pode-se, observar bandas nítidas correspondendo à atividade proteolítica das enzimas. Foram utilizados os extratos brutos, sem passar por nenhuma etapa de purificação, portanto a atividade verificada em várias bandas possivelmente corresponda a mais de uma enzima. Na canaleta 1 o sobrenadante da BL16 apresentou aproximadamente 8 bandas, na canaleta 2 o sobrenadante da BL17 apresentou 5 bandas e na canaleta 3 verificou-se que o sobrenadante da BL20 apresentou 7 bandas. Verifica-se que as possíveis enzimas possuem características diferentes e que a atividade proteolítica não ocorreu devido a uma única proteína. Foi realizado outro zimograma, adicionando-se PMSF (inibidor de serina protease) nas amostras, para verificarmos se todas as enzimas teriam

característica de serina-protease. Não foi observada nenhuma banda nítida no gel, sugerindo que as bandas correspondam a enzimas com característica de serino-protease.

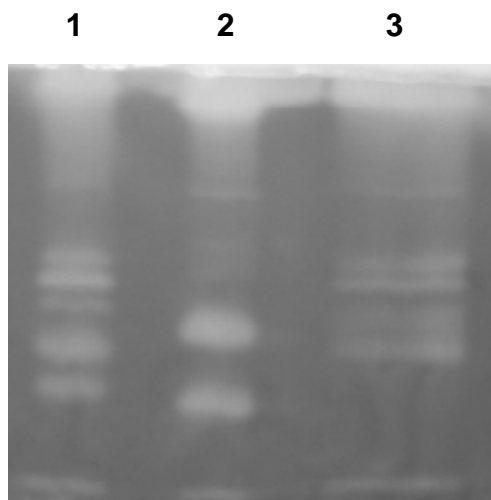


Figura 12: Zimograma de gelatina do sobrenadante cru dos isolados. Canaleta 1) BL16, 2) BL17 e 3) BL20. Os géis demonstram a atividade proteolítica das enzimas.

4.4 Avaliação da atividade depilatória

4.4.1 Avaliação visual

As peles tratadas com os extratos brutos da BL16, BL17 e BL 20, após 24h apresentaram algumas diferenças em relação ao controle. A coloração dos pêlos manteve-se inalterada, mas foram constatadas pequenas áreas na superfície da pele bovina, em que os pêlos estavam mais ralos.

Houve uma acentuada diferença entre o controle e as enzimas testadas, quando os pêlos foram puxados mecanicamente com uma pinça. No primeiro, os

pêlos não se desprenderam facilmente, já com as enzimas, os pêlos desprenderam-se muito facilmente.

O volume utilizado do preparado enzimático é semelhante ao utilizado na indústria. Cerca de 50% de solução de reagentes em relação ao peso da pele (Cantera *et al.*, 1996). O tempo total da etapa da depilação também manteve-se similar aos níveis industriais, cerca de 18h (Cantera *et al.*, 1996, Marsal *et al.*, 1999, Moreira *et al.*, 2000).

O pH utilizado no preparo enzimático foi 9,0. Sabe-se que pHs elevados favorecem a depilação (Malathi & Chakraborty, 1991), também para outros métodos de depilação alternativos, como uso de peróxido de hidrogênio e aminas (Marsal *et al.*, 1999). A temperatura em que foi realizado o ensaio (25°C), é a mesma utilizada na rotina dos curtumes, em que se utiliza a temperatura ambiente para baratear o processo.

4.4.2 Avaliação microscópica

A avaliação microscópica através dos cortes histológicos das peles revelou que os pêlos tratados com a enzima produzida pela linhagem bacteriana BL16 (Figura 13 B), manteve presente seu epitélio, queratina e folículos pilosos, entretanto houve uma digestão parcial do epitélio, causado talvez pela digestão enzimática. No controle a epiderme manteve-se intacta com glândulas anexas e pêlos presentes nos folículos (Figura 13 A).

As enzimas produzidas pelas linhagens BL17 e BL20 (Figuras 13, C e D), causaram apenas a diminuição da camada de queratina, enquanto que as demais estruturas não apresentaram nenhum tipo de alteração. Não foi observada alteração na estrutura do colágeno, em todas as peles tratadas, quando comparadas ao controle, indicando que este tratamento não causa danos na estrutura da pele. Isso é importante, pois a integridade da fibra de colágeno é essencial para que o couro tenha as propriedades físicas adequadas à sua utilização na fabricação de diversos artefatos (Cantera *et al.*, 1996; Raju *et al.*, 1996).

A pele tratada apenas com água mostra o epitélio e os folículos pilosos íntegros. Após o tratamento com as enzimas a camada de queratina do epitélio diminuiu bastante facilitando a retirada do pêlo. Este efeito da ação da enzima traz vantagem ao processo de curtimento, pois a retirada do pêlo pode ser feita por filtração do efluente líquido, diminuindo a quantidade de resíduos orgânicos gerados no processo.

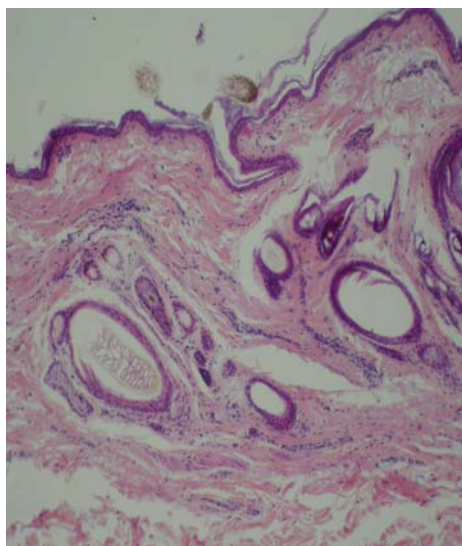
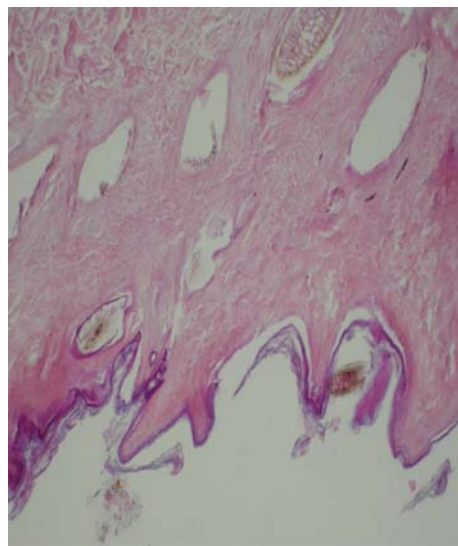
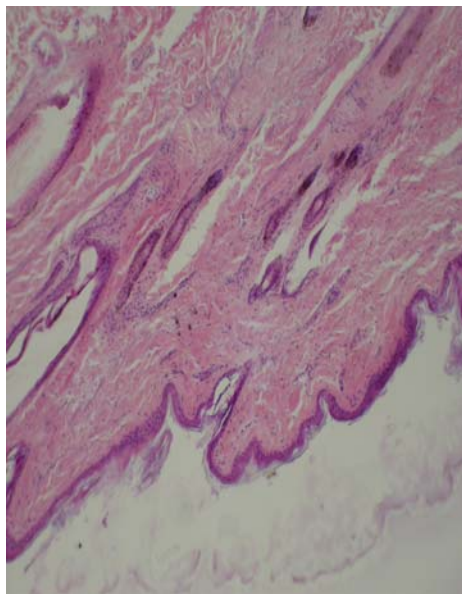
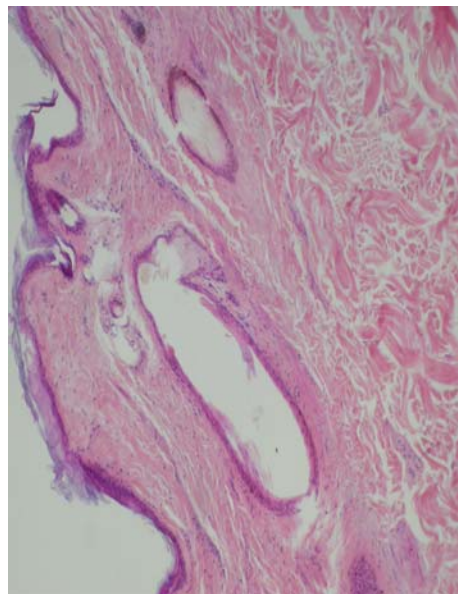
A)**B)****C)****D)**

Figura 13: Fotografia de corte histológico das peles: **A)** Controle (Pele tratada com água), **B)** submetida à tratamento com sobrenadante de cultivo do microrganismo BL-16, **C)** submetida à tratamento com sobrenadante de cultivo do microrganismo BL-17 e **D)** submetida à tratamento com sobrenadante de cultivo do microrganismo BL-20. Aumento 10 X.

4.5 Purificação parcial da enzima produzida pela linhagem BL16

4.5.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

O microrganismo foi cultivado nas condições anteriormente descritas (pH 9,0, 10g/L de farinha de pena a 30°C). Após a realização da precipitação fracionada do sobrenadante resultante da centrifugação do cultivo (6°C/10000g/15 min) as faixas de saturação de 0 a 30%, 30 a 60% e 60 a 100%, resultaram em três precipitados. Para cada precipitado foi realizada a quantificação de proteína solúvel e a atividade enzimática. Os valores foram expressos em porcentagem (%), comparados sempre ao valor encontrado no extrato bruto (100%). Conforme verificamos na figura 14, na faixa de 30-60%, se recupera quase que 100% da enzima. Isso indica que como primeiro passo da etapa de purificação, a precipitação fracionada é bastante útil, além de ser rápida. Para fins comerciais a enzima não necessita de uma pureza absoluta por isso essa etapa pode ser empregada com sucesso.

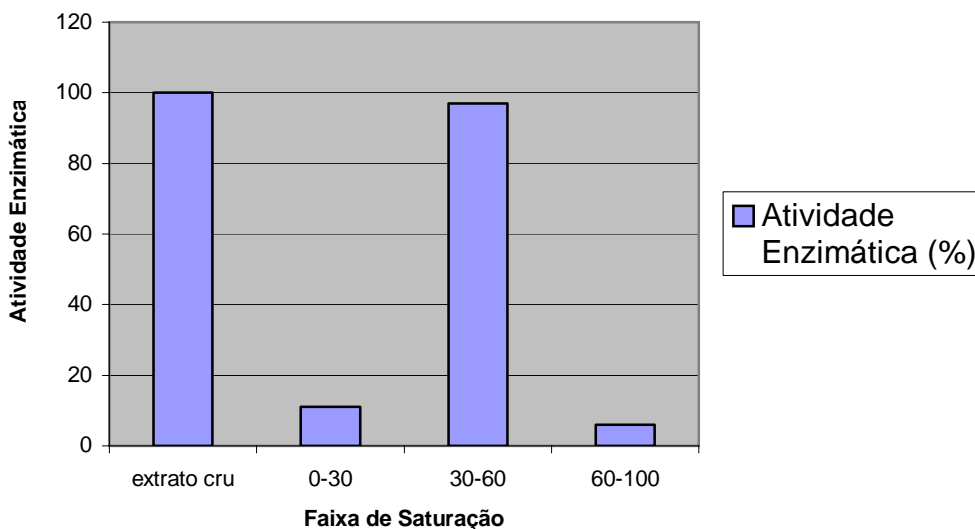


Figura 14: Atividade enzimática de cada etapa da precipitação fracionada. Cada valor representa uma média de duas repetições.

4.6 Aplicação da enzima produzida pela linhagem BL16 como agente de modificação de proteína de soja e soro de queijo

4.6.1 Avaliação da capacidade de formação de espuma

Através da figura 15, verifica-se que à medida que a concentração da enzima em relação ao substrato foi aumentada, a capacidade de formação de espuma diminuiu. Este fato foi observado utilizando proteína isolada de soja e proteína isolada do soro de queijo. Isto indica que a enzima teria potencial aplicação na indústria, com o objetivo de auxiliar no processo de produção de produtos que devem ter a quantidade de espuma controlada. A proteína de soja,

por exemplo, é adicionada em sucos, e a formação de espuma pode dificultar o processamento do produto. A fração protéica do soro de queijo tem emprego crescente em diversos produtos. Contrariamente a este resultado, há trabalhos que relatam um aumento na formação de espuma em hidrolisados de protease bacteriana de *Bacillus subtilis* (Don *et al.*, 1991).

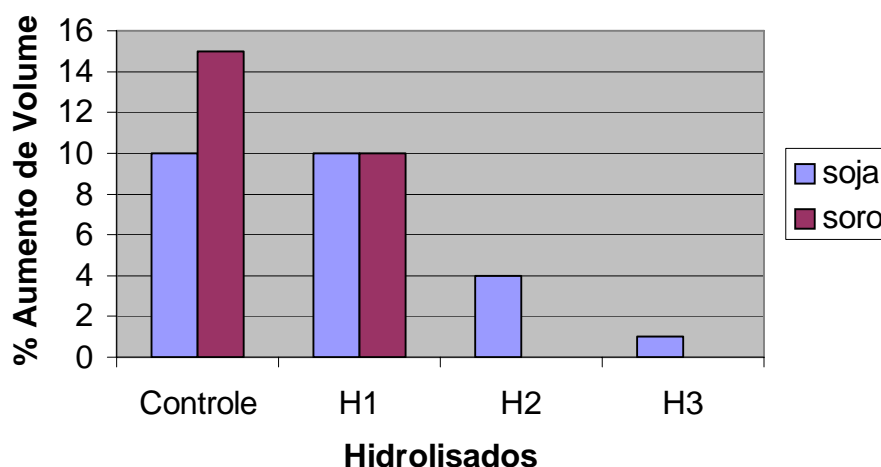


Figura 15: Porcentagem do aumento de volume de espuma na proveta dos hidrolisados de proteína de soja e soro, tratados com diferentes concentrações da enzima produzida.

4.6.2 Avaliação da capacidade emulsificante

Os hidrolisados de soja apresentaram capacidade emulsificante e certa estabilidade na emulsão formada com óleo de soja (Figura 16). O hidrolisado H1 obteve melhor capacidade emulsificante e os outros dois hidrolisados apresentaram características semelhantes. Quando os hidrolisados foram submetidos à alta temperatura, acidez e concentração de sal não apresentaram significativa diferença na capacidade de emulsificação, entretanto a estabilidade

diminuiu. O valor no tempo zero representa a capacidade emulsificante e a meia vida da turbidez inicial reflete a estabilidade da emulsão.

Os hidrolisados de soro apresentaram capacidade emulsificante e relativa estabilidade conforme a figura 17. O hidrolisado 3 foi o que apresentou melhor capacidade emulsificante mesmo quando submetido a 100°C, a condições ácidas e alta concentração de sal. Essas propriedades demonstram que a enzima produzida pelo isolado BL16 pode ser aplicada para modificação de proteína, resultando em melhoria de propriedades funcionais, mesmo sob condições encontradas no processamento de alimentos, como alta concentração de sal e temperatura.

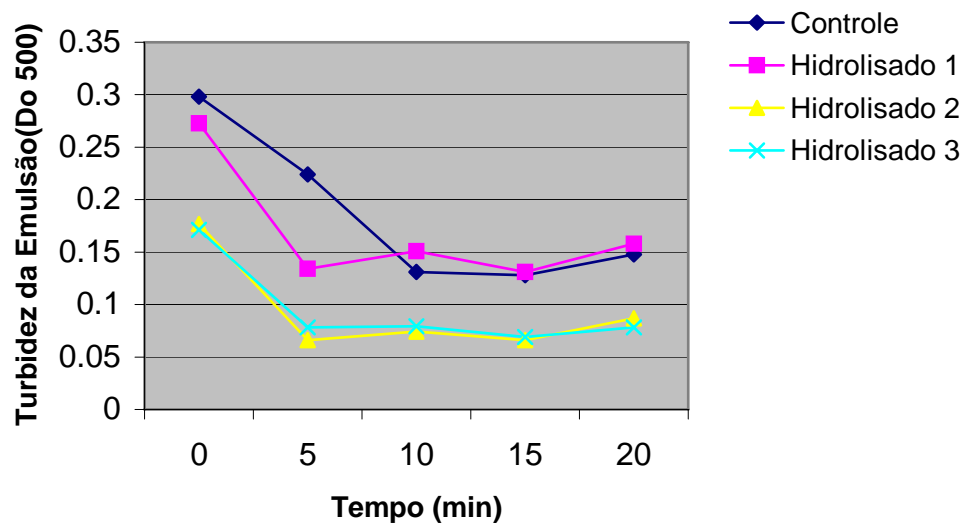


Figura 16: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soja tratados com diferentes concentrações da enzima.

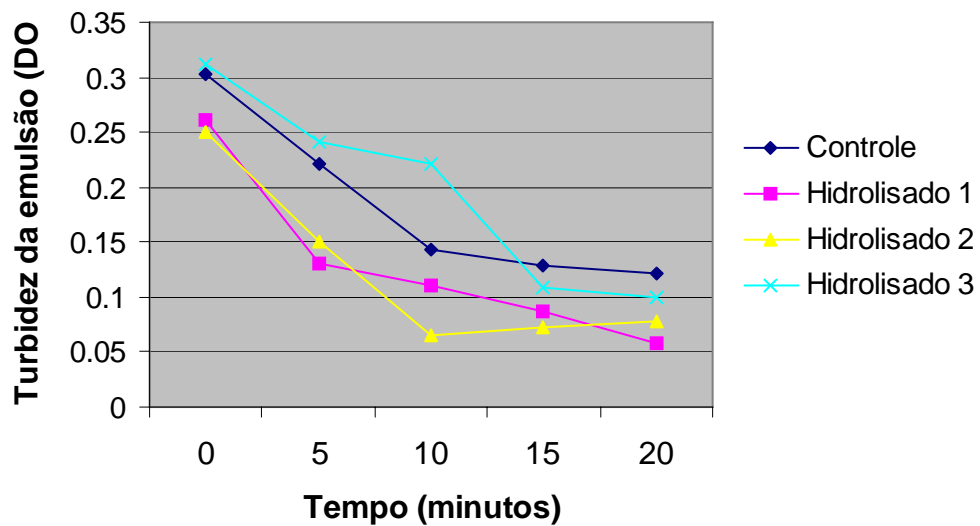


Figura 17: Capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão dos hidrolisados de proteína de soro tratados com diferentes concentrações da enzima.

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento:

- 1- Os microrganismos selecionados produzem atividade proteolítica na faixa de pH 7 a 10.
- 2- A atividade enzimática apresentou ampla faixa de temperatura e pH, com temperatura ótima em 37°C e pH 9,0.
- 3- As enzimas foram inibidas pelo PMSF, apresentando caráter de serina-protease.
- 4- A adição de detergentes, não diminuiu a atividade enzimática dos isolados.

- 5- As enzimas dos isolados apresentaram características necessárias para um eficiente processo de depilação de pele bovina.

- 6- A protease do isolado BL16 mostrou potencialidade como agente de modificação de proteína de soja e soro de queijo, apresentando capacidade antiespumífera quando os hidrolisados protéicos foram agitados, frente à mesma agitação feita ao controle.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICSUL – Associação das Indústrias de Curtume do Rio Grande do Sul.
[Informações] Disponível em: www.aicsul.com.br. Acesso em: 2005.

BALASUBRAMANIAN, S.; PUGALENTHI, V. A comparative study of the determination of sulphide in tannery waste water by ion selective electrode (ISE) and iodometry. **Water Research**, Oxford, UK, v.34, p.4201-4206, 2000.

BERNARDI, D.L.S.; PILOSOFF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. **Journal of American Oil Chemists's Society**, Champaign, IL, v.68, n.2 , p.102-105,1991.

BEYNON, R.J. **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University.Press, 1996. 257p.

BRESSOLIER, P. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serina proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.65, n.6, p.2570-2576, 1999.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. p.196-199.

CANTERA, C.S.; ANGELINETTI ALTOBELLI, G.; GAITA, G. Hair-saving enzyme-assisted unhairing. Influence of enzymatic products upon final leather quality. **Journal of the Society Technologists and Chemists**, Pembs, UK, v.80, p.83-86, 1996.

CHAIA, A. et al. Identification and properties of two extracellular proteases from *Brevundimonas diminuta*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.31,n.1,p.1517-1527,2000.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.60, n.4, p.381-95, 2002.

CHELLAPAN, S.; JASMIN, C.; BASHUR, M. et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, In

Press,2005.

CHEN, S.T.; CHEN, S.Y.; HSIAO, S.C.; WANG, K.T. Kinetic resolution of N-protected amino acid esters in organic solvents catalysed by a stable industrial alkaline protease. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.13, p.773-778, 1991.

CHEN, S.T.; KAO C.L.; WANG K.T. Alkaline protease catalysis of a secondary amine to form a peptide bond. **International Journal Peptide and Protease Research**, Dordrecht, NE, v.46, p.314-319, 1995.

CHERQUI, A.; CRUZ, N.; SIMÕES, N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimma unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, UK, v.31, p.761-769, 2001.

CHOWYYOK, W.; WONGMOGKOL, N.; PRICHANOT, S. Extration of alkaline protease using aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v.40, p.3514-3518, 2005.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. 2nd. Ed. New York : J. Wiley and sons, 1992. p. 335-375.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnologia**: manual de microbiologia industrial.

Zaragoza: Acribia, 1993. 413p.

DE TONI, C.H.; RICHTER, M.F.; CHAGAS, J.R.; HENRIQUES, J.A.; TERMIGNONI, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xantomonas maltophilia* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, n.4, p.342-348, 2002.

DONALD, P.; MILLER, E.; SCHIRMER, B. Repletion of Nutritional Parameters in Surgical Patients Receiving Peptide Versus Amino Acid Elemental Feedings. **Nutritional Research**, New York, v.14, p.3-12, 1994.

FRANKENA, J.; VAN, V.; STOUTHAMER, A.H. A continuous culture study of the extracellular protease in *Bacillus licheniformis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.22, p.169 – 176, 1985.

FRIEDRICH, A.B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermatogales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.10, p. 3705-3710, 1996.

GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M.R.V.; SUBRAMANIAN, T.V.; JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid

state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, Oxford, K,v.30, p.457-462, 1995.

GERMANN, G.H. The 1997 John Arthur Wilson memorial lecture: the evolution of the unhairing process as influenced by technological, economic and ecological consideration. **The Journal of the American Leather Chemists Association**, Lubbock, TX, v.92, n.4, p.84-92, 1997.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hidrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis**, Amsterdam, NE, v.19-20, p.489-498, 2002.

GUPTA, R.K.; SAXENA, R.K.; KHAN, S. Bleach- stable, alkaline protease from *Bacillus* sp.. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.21, p.135-138, 1999.

GUPTA, R.; BEG, Q.K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial aplications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.59, p.15-32, 2002.

HECK, J. X. **Aproveitamento de um resíduo industrial fibroso de soja para o desenvolvimento de um processo de cultivo semi-sólido**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do

Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

HUANG, Q.; PENG, Y.; LI, X.; WANG, H.; ZHANG, Y. Purification and characterization of an extracellular alkaline protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. **Current Microbiology**, New York, v.46, p.169-176, 2003.

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

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**, Oxford, UK, v.37, p.139-144, 2001.

JOO, H.S.; CHANG, C.S.; KUMAR, C.G. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v.95, p.267-272, 2003.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaliphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation:

feasibility as a laundry detergent additive, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.38, p.176-183, 2005.

KARADZIC, I.; MASUL, A.; FUJIWARA, N. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. **Journal of bioscience and bioengineering**, Japão, v.98, n.3, p.145-152, 2004.

KATO, A.; MINAKI, K.; KOBAYASHI, K. Improvement of emulsifying properties of egg proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, n.4, p.540-543, 1993.

KAZAN, D.; DENIZCI, A.; ONER, M.N.; ERARSLAN, A. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, GE, v. 8, p. 335-344, 2005.

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

KOSHIKAWA, N.; HASEGAWA, S.; NAGASHIMA, Y.; MITSHASHI, K.; TSUBOTA, Y.; MIGATA, S. Expression of trypsin by epithelial cells of various

tissues, leukocytes and neurons in human and mouse. **Annual Journal of Pathology**, Bethesda, MD, v.153, p. 937–944, 1998.

KOBAYASHI,T.; HAKAMADA,Y.; ADACHI, S. et al . Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp KSM-K-16. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.43, p.473-81, 1995.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; MASATOSHI, N. **MEGA2**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Tempe, Arizona: Arizona State University,2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. p115-625.

LETORNEAU, F. et al. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S. K1-02: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology** , Oxford, UK, v.26, p.77-80, 1998.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p351-366.

LIMA, D.P.; CAMARGO, C. R. O.; PONEZI, A.N. Efeito da Adição de Proteases na Solubilidade de Proteínas da Massa do Cracker. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Local do evento. [Anais]. Local da publicação, 1998. v.3, p.1750-1752.

LIN, X. et al . Selection and characterization of feather- degrading bacteria from canola meal compost. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.23, p.149-153,1999.

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

LUSTERIO, D.D et al . Alkali-resistant, alkaline endo-1,4-b-glucanase produced by Bacillus sp. PKM-5430. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, Tokio, v.56, p.1671-1672,1992.

MACEDO, A.J.; DE SILVA, W.O.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.; TERMIGNONI, C. Nível keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. **Applied Environmental Microbiology**,

Washington, v.71, n.1, p.594-596, 2005.

MALLATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of alkaline peptidase by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.3, p.712-716, 1991.

MARSAL, A.; MOREIRA, J.M.; BARTOLI, E.; BORRÁS, M.A.D. Study on a new unhairing process with Hydrogen Peroxide and Amines. **Journal American Leather Chemists Association**, Lubbock, TX, v.94, p.1-10, 1999.

MOREIRA, L.M.; BARTOLI, E.; BORRÁS, M. A. D.; MARSAL, A. Influence of the unhairing process on the mechanical characteristics of the leather. **Journal American Leather Chemists Association**, Lubbock, TX, v.95, p.293-300, 2000.

NASCIMENTO, W.C.; MARTINS, M.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.35, p.91-96, 2004.

NEHETE, P.N.; SHAH, V.D.; KOTHARI, R.M. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE,

v.7,p.413-418,1985.

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

PAPADOPOULOS, M.C.; EL BOUSHY, A.R.; ROODBEEN A.E.; KETELAARS E.H. Effectes of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, NE, v.14, p. 279-290, 1986.

PEREZ-LOSADA, M.; BOND-BUCKUP,G.; JARA,C.G.; CRANDALL,K.A. Molecular systematics and biogeography of the southern South american freshwater 'crabs' Aegla (decapoda: Anomura: Aeglidae)using multiple heuristic tree search approaches. **Systematic Biology**, Philadelphia, v.53, n.5, p.767-780, 2004.

PROPHET,E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: [s.n.], 1992. p.278

RAJU, A.A.; CHANDRABABU, N.K.; SAMIVELU, N.; ROSE, C.; RAO, N.M. Ecofriendly enzymatic dehairing using extracellular proteases from *Bacillus* species isolate. **Journal American Leather Chemists Association**, Lubbock, TX, v.91,p.115-119,1996.

RAHMON, R.; SAXEMA, R.K.; KHAN, S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.2, p.135-138, 1999.

RAO, M.B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.62, n.3,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**, Heidelberg, GE, v.179, p.258-265, 2002.

ROTH, S.H.; SKARAJNY, B.; REIFFESTEIN, R.J. Alteration of the morphology and neurochemistry of the mammalian nervous system hydrogen sulphide. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Victoria, Austrália, v.22,p.379-380,1995.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v.40, p.2689-2694, 2005.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. A feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp . strain kr2. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v.89, p.735-745, 2000.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of novel feathers-degrading bacterial strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Totowa, NJ, v.87, p.17-24, 2000.

SATOSHI, U.; NORIAKI, I. Partial purification and characterization of pro-phospholipase A2 activating proteases from gill membranes of the red sea bream, *crysophrys major*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B , New York, v.141, p.121-127, 2005.

SCOPES, R.K. **Protein Purification**. New York: Springer Verlag, 1985. 489p.

SCRIBAN, R. et al. **Biotecnología**. São Paulo: Manole, 1985. 489p.

SECADES, P. ; GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.9, p.3969-3979, 1999.

SEONG, C.; JO, J.S.; KIM, S.W.; LEE, O.; HAN, J.; YOO, J.C. Production, purification and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.26, p.907-909, 2004.

SHIH, J.C.H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization a review. **Poultry Science**, Savoy, IL, v.72, p.617-620, 1993.

SNEATH, et al . **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8ed. Baltimore: Lippincott, Williams Wilkins, 1984. 2v.

SUTAR, I.I.; SRINIVASAN, M.N.; VARTAK, H.G. A low molecular weight alkaline proteinase from *Conidobolus coronatus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, NE, v.13, p.119-124, 1991.

TAKAMI, H.; AKIBA, T.; HORIKISHI, K. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, GE, v.34, p.157-162, 1990.

TARI, C.; GENCKAL, H. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, In Press, 2005.

TREVAN, M.D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K.H.; STANBURY, P. **Biotechnologia: Principios biológicos**. Zaragoza : Acribia, 1990. 284p.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. Under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Oxford, UK, v.39, p.1893-1898, 2004.

VARELA, H.; FERRARI, M.D.; BELOBRADJIC, L.; WEYRAUCH, R.; LOPERENA, M.L. Short communication: Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of peptidase with promising unhairing activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**. Dordrecht, NE, v.12, p.643-645, 1996.

VENUGOPAL, V.; ALUR, M.D.; NERKAR, D.P. Solubilization of fish proteins using immobilized microbial cells. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken,

NJ, v.33, p.1098-1103, 1989.

WILLIAMS, C.M et al. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.1509-1515,1990.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de las enzimas** . Zaragoza: Acribia, 1991. 444p.

YAMAGUCHI, K.; YAMAGUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KHODA, A.; KONISHI, Y. Preparation of stable aqueous solutions of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, NJ, v.31, p.439-444, 1996.

YOUNG, R.A.; SMITH, R.E. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.21, p.593-586, 1975.

7. APÊNDICE

ÁGAR LEITE (AL)

Componentes	g L ⁻¹
Peptona de carne	5
Extrato de levedura	3
Leite desnatado	10,0
Agar	12
Água destilada	1000

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C

ÁGAR NUTRIENTE

Componentes	Quantidades
Peptona de carne	5,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
Ágar	15,0
Água destilada	1000mL

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C

BHI

Componentes	Quantidades
BHI	37 G
Água destilada	900 mL

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C

CALDO FARINHA DE PENA (CFP)

Componentes	g L ⁻¹
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,4
Farinha de pena	10,0
Água destilada	1000

Obs.: Autoclavar por 15 min/121°C

FORMOL TAMPONADO

Componentes	Quantidades
Formaldeído	100 mL
Na ₂ HPO ₄	4,0 g
NaH ₂ PO ₄	6,5 g
Água destilada	900 mL