**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e
purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica**

Alessandro Riffel

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

**Piracicaba
2006**

Alessandro Riffel
Farmacêutico

Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica

Orientador:
Prof. Dr. **FLÁVIO CESAR ALMEIDA TAVARES**

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola**

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Riffel, Alessandro

Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica / Alessandro Riffel. - Piracicaba, 2006.

98 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Bactérias aeróbicas gram-negativos 2. Enzimas proteolíticas 3. Esderoproteínas
4. Metaloprotease 5. Proteinase I. Título

CDD 574.1925

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedicatória

Dedico este trabalho a:
todo cidadão brasileiro - pelo suor e esforço,
meus pais Darci Riffel e Celita Tereza Knebel Riffel - pela educação e aposta
e minha querida irmã Ana Cláudia - pela alegria

Agradecimentos

A Deus.

A CAPES pelo investimento na pesquisa e apoio financeiro durante esses últimos 4 anos de doutorado.

A Universidade de São Paulo e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela estrutura acadêmica e pessoal e todos os funcionários, alunos e professores.

A meus pais, Chico Riffel e Celita e minha alegre e querida irmã Ana Cláudia.

A meus colegas de laboratório, Betão, Keila, Rebeca, Ana, Gildemberg, Polé, Simone, Marina, Rodrigão, Varejeira (Luis) e outros que passaram, Nervo, Fossa, Pupin e Daniele pela convivência quase sempre harmoniosa.

Aos laboratórios dos Professores Ricardo Azevedo e Márcio Lambais e todos os seus integrantes pela paciência e pelo acesso a estrutura, sem o qual esse trabalho não seria possível.

A Professora Siu Mui Tsai por mais uma vez abrir as portas de seu laboratório que juntamente com a Fabi facilitaram o sequenciamento de DNA.

A Dra. Cláudia Bellato pela ajuda com o processamento da proteína para a espectrometria e as boas dicas de sempre.

Ao Gustavo do Laboratório Thomson de Espectrometria pela ajuda com a espectrometria de massas.

Ao camarada Renato pela ajuda com a microscopia.

A meu amigo Darião pela ajuda com a espectrometria atômica e as longas conversas sobre a ciência no Brasil.

A Dani Takahashi pela grande ajuda com as extrações de RNA e a transmissão do conhecimento em biologia molecular.

Aos colegas de moradia Simão Lindoso, Dyemão Bento, Paulinho de Tarso, Paulo Tobias, Maurão e anteriormente Gildemberg, Bilola, João de Deus dos Santos Cachaça e Robertão Wagner pela amizade e pela possibilidade de conhecer e entender melhor o Brasil.

Ao Tabajara Futebol Clube pela oportunidade de conviver em equipe, principalmente após o futebol e pela oportunidade de erguer tantos troféus em tão pouco tempo. Que se

mantenha vivo e até 2014. Também aos integrantes dos outros times aos quais o tabajara obteve tanto sucesso e que constituem a comunidade piracicabana dos fomes de bola.

Ao Pernetá futebol Clube e a todos os seus integrantes pela camaradagem e por participarem desta verdadeira terapia que foi o futebol da sexta sem a qual esse trabalho também não seria possível.

Ao Professor Flavio Cesar Almeida Tavares, pela aceitação, orientação e principalmente pelo ensinamento de como andar com as próprias pernas.

Pelos meus colegas do Rio Grande do Sul, Mandita, Bacana, Luis, Julio, que mesmo a distância mantiveram o contato, a amizade e as trocas de conhecimento.

Ao Professor Adriano Brandelli, a quem devo inspiração, iniciação e gosto pela ciência, pela presença e ajuda de sempre.

Aos meus amigos de Santo Cristo pela grande irmandade que existe, apesar de muitas vezes não sabermos disto.

A Piracicaba que eu adoro tanto, cheia de amores e cheia de encantos....

A Carla Mello, pela compreensão e ajuda de sempre.....

A todos os amigos e pessoas que de alguma forma fazem e fizeram parte da minha vida bem com as loiras geladas que me acompanharam neste período.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PROTEASES	16
2.1.1 Classificação.....	16
2.1.2 Relação Evolutiva das Proteases	19
2.1.3 Funções Fisiológicas das Peptidases	20
2.1.4 Aplicações	21
2.2 QUERATINÓLISE MICROBIANA.....	21
2.2.1 Queratinas.....	21
2.2.2 Microrganismos Queratinolíticos	23
2.2.3 Queratinases	24
2.2.4 Clonagem e Superexpressão de Queratinases	28
2.2.5 Aplicações das Queratinases	29
2.2.5.1 Reaproveitamento de Penas de Frango	29
2.2.5.2 Depilação do Couro.....	31
2.2.6 O Processo de Degradação da queratina	32
2.2.6.1 Queratinólise Mecânica.....	32
2.2.6.2 Hidrólise de Pontes Dissulfeto	32
2.2.6.3 Proteólise.....	33
2.3 O GÊNERO CHRYSEOBACTERIUM.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES NUTRICIONAIS SOBRE O CRESCIMENTO E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE CHRYSEOBACTERIUM SP. KR6	35
3.1.1 Microrganismo, Meios de Cultura e Condições de Crescimento	35
3.1.2 Determinação do Número de Células Viáveis.....	35
3.1.3 Ensaio de Atividade Proteolítica	36
3.1.4 Ensaio de Atividade Queratinolítica.....	36
3.1.5 Zimografia	37
3.1.6 Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica.....	37
3.1.7 Quantificação de proteína.....	37
3.1.8 Doseamento de glicose	38
3.1.9 Análise Microscópica (Microscopia Eletrônica de Varredura).....	38
3.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUERATINASE DE CHRYSEOBACTERIUM SP. KR6 ..	38
3.2.1 Produção da Enzima	38
3.2.2 Ensaios de Atividade Enzimática	39
3.2.2.1 Atividade Proteolítica.....	39
3.2.2.2 Atividade Queratinolítica;.....	39
3.2.3 Purificação	39
3.2.3.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica.....	39
3.2.3.2 Cromatografia em Gel Filtração:.....	40

3.2.4 Técnicas Eletroforéticas	40
3.2.4.1 Determinação de Peso Molecular	40
3.2.4.2 Zimografia	40
3.2.5 Quantificação de proteína	41
3.2.6 Caracterização	41
3.2.6.1 Determinação de pH ótimo	41
3.2.6.2 Determinação de Temperatura Ótima	41
3.2.6.3 Estabilidade Térmica	42
3.2.6.4 Efeito de Interferentes na atividade proteolítica	42
3.2.6.5 Determinação do metal	42
3.2.7 Identificação da Proteína	43
3.2.7.1 Ionização a Laser com MS com TOF de Alta Resolução (Maldi-Tof/MS)	43
3.2.7.2 Espectrometria de Massas em Tandem com Ionização por Electrospray (ESI-MS/MS)	43
3.2.8 Hidrólise de Substratos Protéicos Insolúveis	44
3.2.8.1 Método Colorimétrico para Quantificação e Aminoácidos Solúveis	44
3.2.8.2 Análise de Aminoácidos Solúveis por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)	44
3.3 IDENTIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE DA QUERATINASE DE CHRYSEOBACTERIUM SP. KR6	45
3.3.1 Extração de DNA Total	45
3.3.2 Desenho dos Iniciadores Degenerados e Amplificação de DNA por PCR	46
3.3.3 Clonagem	46
3.3.4 Preparo de Células de E. coli Competentes por Cloreto de Rubídio	46
3.3.5 Transformação de E. coli por Choque Térmico	47
3.3.6 Extração de DNA Plasmidial	47
3.3.7 Sequenciamento	48
3.3.8 Extração de RNA Total	48
3.3.9 Síntese da Primeira Fita de cDNA	49
3.3.10 Amplificação do cDNA	50
3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
4 RESULTADOS	51
4.1 EFEITO DAS CONDIÇÕES NUTRICIONAIS NO CRESCIMENTO E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	51
4.1.1 Crescimento e Atividade Enzimática	51
4.1.2 Efeito de inibidores na atividade proteolítica	54
4.1.3 Análise Microscópica	54
4.2 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUERATINASE DE CHRYSEOBACTERIUM SP. KR6	54
4.2.1 Purificação	54
4.2.2 Caracterização da Queratinase	59
4.2.2.1 Determinação do Peso Molecular	59
4.2.2.2 Efeitos da Temperatura e pH na atividade e Estabilidade Térmica da Protease	59
4.2.2.3 Efeito de Interferentes	64
4.2.2.4 Determinação do Metal	64
4.2.2.5 Hidrólise de Substratos Insolúveis	64
4.2.2.6 Identificação da queratinase	66
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO GENE DA QUERATINASE DE CHRYSEOBACTERIUM SP. KR6	66
4.3.1 Amplificação do DNA com os Iniciadores Degenerados	66
4.3.2 Clonagem e Sequenciamento	69

4.3.3 Extração de RNA e amplificação do cDNA.....	69
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

RESUMO

Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica

A linhagem queratinolítica *Chryseobacterium* sp. Kr6 mostrou-se com possibilidade de aplicação em processos envolvendo queratinólise, principalmente na hidrólise de penas de frango e depilação de couro bovino. No presente trabalho avaliou-se o efeito da composição do meio sobre o crescimento e atividade proteolítica deste isolado e uma protease queratinolítica (queratinase) foi purificada e caracterizada. O microrganismo mostrou-se adaptado à utilização de queratina como substrato durante o crescimento, produziu diferentes proteases dependendo do meio utilizado e a maior atividade proteolítica foi atingida quando utilizado meio de cultivo com penas como única fonte de carbono e nitrogênio. A adição de fonte extra de nutrientes resultou em uma parcial repressão catabólica. Uma protease extracelular (Q1) foi purificada cerca de 14 vezes utilizando cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose CL 4B e gel filtração em Superose H12R. Q1 mostrou ser uma proteína monomérica com peso molecular de 64 KDa determinado por SDS-PAGE e pH e temperatura ótimos de 8,5 e 50°C respectivamente. O perfil de inibição indica tratar-se uma metaloprotease e as seqüências internas dos peptídeos resultantes de digestão triptica mostraram homologia ao sítio ativo e de ligação ao Zn da família M14 (Carboxipeptidase). A atividade proteolítica foi estimulada pela presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e inibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+} , Hg^{2+} e agentes redutores. Q1 apresentou atividade queratinolítica sobre o substrato keratin azure, mas não foi capaz de hidrolisar penas de frango sugerindo a necessidade de outras enzimas durante o processo de degradação de penas. Utilizando os iniciadores degenerados desenhados com base na seqüência dos peptídeos, foi amplificado um fragmento de 470 pb correspondente a uma região do possível gene desta metaloproteína utilizando DNA e cDNA como molde. A seqüência do fragmento pode estar sendo expressa, mas não apresentou similaridade e homologia a proteínas conhecidas e portando, indicativa de uma nova metaloprotease.

Palavras-Chave: Proteases; Queratina; *Chryseobacterium*; Queratinase; Metaloprotease

ABSTRACT

Evaluation of extracellular proteases from *Chryseobacterium* sp. Kr6 strain and purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease

The strain *Chryseobacterium* sp. kr6 shown to be useful for biotechnological purposes such as hydrolysis of poultry feathers and de-hairing of bovine pelts. The effect of media composition on the protease production and growth by this strain was studied and a keratinolytic protease (keratinase) was purified and characterized. The strain was adapted to use keratin as substrate to growth, produced different proteases in different media composition and the higher proteolytic activity was reached when used feather as only source of carbon and nitrogen. The addition of sources of nutrients has resulted in partially repressed catabolism. An extracellular protease (Q1) was purified 14-fold by chromatography using the hydrophobic interaction Phenyl-Sepharose CL 4B column and gel filtração in Superose 12HR. SDS-PAGE indicated that the Q1 is a monomeric protein with molecular mass of 64 KDa. and optima pH and temperature were 8,5 e 50°C, respectively. The inhibition profile indicates to be a Zn-metalloprotease and analysis of tryptic peptides sequence revealed sequence homology to the conserved active site and Zn binding site, which may characterize keratinase Q1 as a member of M14 metalloprotease family (Carboxipeptidase). The activity was stimulated by of Ca^{2+} and Mg^{2+} and inhibited by Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+} , Hg^{2+} and reducing agents. Q1 presented keratinolytic activity under substrate keratin azure, but was unable to hydrolyze poultry feather, suggesting the requirement by other enzymes in the feather hydrolysis mechanism. Degenerate primers amplified a 470 bp, corresponding to a probable gene region of this metalloprotein, with DNA and cDNA. The sequence is being expressed but do not showed similarity and homology to known proteins, thus indicating a new metalloprotease.

Key words: Protease; Keratin; *Chryseobacterium*; Keratinase; Metalloprotease

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Famílias de Metalopeptidases com base na estrutura do sítio de ligação ao cátion. As letras indicadas com os números representam os ligantes de Zn já identificados. Resíduos da linha a correspondem ao primeiro e segundo ligantes; resíduos em b o terceiro ligante e em c o provável quinto ligante18
- Figura 4.1 - Curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em diferentes meios de cultivo. (●) Triptona; (□) CPG; (◆) CP; (Δ) CPN; (x) Ccas e (▲) e CGli a 30°C, 150 RPM e pH inicial 752
- Figura 4.2 - Atividade Proteolítica durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em diferentes meios de cultivo. (●) Triptona; (□) CPG; (◆) CP e (Δ) CPN; a 30°C, 150 RPM e pH inicial 752
- Figura 4.3 - Liberação de proteína solúvel para o meio durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 nos meios: (◆) CP; (□) CPG e CPN(▲) cultivado a 30°C, 150 RPM e pH inicial 753
- Figura 4.4 - Concentração de glicose residual no meio de cultivo: (□) CPG e (●) Cgli durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivado a 30°C, 150 RPM e pH inicial 753
- Figura 4.5 - Zimografia das proteases secretadas pela linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivada nos meios: A – Ctrip(1,2,5 e 6); B – CP(3,4,5 e 6); C – CPG(3,4,5 e 6) e D – CPN(3,4,5 e 6) após 20 horas de cultivo55
- Figura 4.6 - Micrografia das penas em suspensão após cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em meio CP em diferentes tempos de coleta: (A) – 0; (B) - 8; (C) - 18 e (D) - 36 horas. O tamanho das células bacterianas é de 1 µm. Q – fibra de queratina, C – célula de *Chryseobacterium* sp. Kr6 e R – Ráquis da pena. Aumento de 2000 vezes56
- Figura 4.7 - Micrografia das penas em suspensão após cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 de 18 horas em meio CP. (A)- aumento de 1000 vezes e (B)- aumento de 2000 vezes. O tamanho das células bacterianas é de 1 µm. Q – fibra de queratina, C – célula de *Chryseobacterium* sp. Kr6 e R – Ráquis da pena.....57
- Figura 4.8 - Perfil de eluição em cromatografia de Interação hidrofóbica em coluna Phenyl-Sepharose das proteases de *Chryseobacterium* sp. A coluna foi eluída com tampão fosfato gradiente de 1 a 0 M de (NH₄)₂SO₃ (- -) e monitorada absorbância a 280 nm (○) e atividade proteolítica (●).....58

- Figura 4.9 - Perfil de eluição da cromatografia em Gel-filtração (Superose 12 HRTM) do pico HIC1. A coluna foi eluída com tampão fosfato 100 mM e NaCl 50 mM e as frações monitoradas para absorbância a 280 nm (—) e atividade (- -).....58
- Figura 4.10 - SDS-PAGE da queratinase Q1 de *Chryseobacterium* sp. Kr6. A - Marcador de Peso Molecular (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 e 10 KDa); B - Q1 purificada e C - Zimografia de Q1 purificada60
- Figura 4.11 - Determinação do pH ótimo para protease Q1 (●) após purificação. Atividade determinada a 50°C utilizando caseína como substrato62
- Figura 4.12 - Determinação de temperatura ótima para protease Q1 (●) após purificação. Atividade determinada em pH 8,5 utilizando caseína como substrato.....62
- Figura 4.13 - Determinação de Estabilidade Térmica da queratinase Q1 nas temperaturas de 37°C (●), 50°C (■) e 80°C (▲) após purificação. Atividade determinada utilizando caseína como substrato63
- Figura 4.14 - Seqüência de peptídeos resultantes de digestão trípica de Q1 de *Chryseobacterium* sp. Kr6. As seqüências foram alinhadas com outras proteases pertencentes a família M14 (↓) indica o sítio obrigatório de ligação ao metal e (*)indica o resíduo obrigatório do sítio67
- Figura 4.15 - Produto de amplificação do DNA de *Chryseobacterium* sp. Kr6 com os diversos iniciadores degenerados. MM: Marcador de massa molecular (O'Gene RulerTM-1kb DNA Ladder – Fermentas Inc. – Canadá); 1: Iniciadores 1 e 3; 2: Iniciadores 1 e 4; 3: Iniciadores 2 e 3; 4: Iniciadores 2 e 4; 5: Iniciador 1; 6: Iniciador 2; 7: Iniciador 3; 8: Iniciador 4; 9: Controle sem DNA.....68
- Figura 4.16 - Extração de RNA total de *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivado em meios com penas como única fonte de carbono e nitrogênio71
- Figura 4.17 - Produtos de amplificação utilizando par de iniciadores degenerados 1 e 3 MM: Marcador de massa molecular (O'Gene RulerTM-1kb DNA Ladder - Fermentas Inc. – Canadá); 1: DNA de *Chryseobacterium* sp. Kr6 como seqüência molde; 2: cDNA de *Chryseobacterium* sp. Kr6 como seqüência molde e 3: Controle sem fita molde.....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Características das queratinases de alguns microrganismos	25
Tabela 4.1 - Purificação da queratinase de <i>Chryseobacterium</i> sp. Kr6.....	61
Tabela 4.2 - Influência de Inibidores, metais e compostos na atividade proteolítica de Q1	65
Tabela 4.3 - Tabela da sequência dos peptídeos resultantes de digestão trípica da queratinase Q1	67

1 INTRODUÇÃO

A capacidade dos microrganismos de degradar macromoléculas insolúveis como celulose, lignina, quitina e queratina é sempre dependente da secreção de enzimas extracelulares, com habilidade de atuação na superfície destes substratos. A queratina é o principal componente dos tecidos queratináceos como a pele, pelos, unhas e penas, servindo como suporte para formação das fibras nestes tecidos. A estrutura molecular da queratina, altamente estável e resistente, é resultado de um alto empacotamento das cadeias polipeptídicas em estruturas secundárias repetitivas de α -hélices e folhas β -pregueadas, que ao mesmo tempo são estabilizadas por numerosas pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas. Em consequência desta estrutura, a degradação microbiana da queratina, limita-se a certo número de fungos, actinomicetos e bactérias que são chamados de microrganismos queratinolíticos.

As proteases, produzidas por microrganismos queratinolíticos, que possuem certa especificidade pela queratina como substrato são chamadas de queratinases. Grande parte destas enzimas é secretada nos meios de cultivo, mas há relatos também de queratinases intracelulares ou aderidas à membrana. A regulação da expressão dessas enzimas parece ser bastante complexa e a composição dos meios onde são produzidas, tem influenciado consideravelmente a sua produção. Muitas vezes, para alguns microrganismos, a presença de queratina atua como um indutor da expressão destas enzimas e a presença de outras fontes de carbono e nitrogênio podem reprimí-las

Um grande número de queratinases tem sido purificado e caracterizado até o momento. Estas enzimas têm se apresentado altamente diversas, principalmente quanto a sua estrutura, natureza catalítica, propriedades físico-químicas e especificidade de hidrólise. A expressão heteróloga dessas enzimas também tem sido bastante explorada. Os objetivos da produção de queratinases pela tecnologia recombinante têm sido de: i) facilitar o seu estudo, buscando elucidar novas seqüências, estruturas, promotores e mecanismos de ação, já que a obtenção de proteases nativas puras em grandes quantidades mostra-se bastante trabalhosa e ii) um aumento de produção e estabilidade, principalmente no caso de queratinases de interesse industrial. Um exemplo de queratinase produzida industrialmente é a queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1, atualmente comercializada pela empresa BioResource International (BRI) com o nome de VersazymeTM.

Nosso grupo teve sucesso no isolamento e caracterização da linhagem queratinolítica *Chryseobacterium* sp. Kr6, visto que as enzimas produzidas por esta bactéria têm mostrado possível aplicação biotecnológica em processos envolvendo hidrólise de penas de frango e depilação de couro. Apesar de bem caracterizada, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo de queratinólise desta linhagem e das propriedades individuais de suas proteases (queratinases). Este trabalho teve como objetivo, verificar a influência das condições nutricionais sobre o crescimento, hidrólise de queratina e a atividade proteolítica desta linhagem e a purificação e caracterização bioquímica e molecular de uma queratinase por ela produzida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

Proteases (também conhecidas como peptidases ou proteinases) são uma classe de enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. Fazendo isto, elas causam alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). As proteases modificam os substratos com grande seletividade e especificidade, como exemplificado em reações de ativação de formas zimogênicas em enzimas líticas e o processamento e transporte de enzimas extracelulares (RAO, et al., 1998). O número de proteases atualmente descritas é muito grande, estimando-se que compreendem cerca de 2% de todos os produtos gênicos e aproximadamente 10% de todas as enzimas incluídas na lista (EC) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

2.1.1 Classificação

As proteases não são facilmente inseridas nos sistemas gerais de nomenclatura de enzimas por causa de sua grande diversidade de atividade e estrutura. Atualmente as proteases são classificadas segundo três critérios principais: i) quanto ao tipo de reação catalisada, Exopeptidases e endopeptidases, que clivam respectivamente ligações peptídicas próximas ou distantes das regiões terminais das proteínas; ii) quanto à natureza química do sítio catalítico, as quais de acordo com a composição do sítio ativo, dividem-se em serina, aspartil, cisteína e metalopetidases e iii) quanto às relações evolutivas, onde são classificadas em famílias e subdivididas em clans, de acordo com a convergência ou divergência de um ancestral comum. Baseando-se nestes critérios as famílias de peptidases são denominadas com uma letra, S, C, A, M e U para os tipos serina, cisteína, aspartil, metalo e não conhecidas, quanto ao tipo de catálise realizada (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001, RAO et. al., 1998).

As serina proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina em seu sítio ativo. Elas são bastante numerosas, amplamente distribuídas entre os vírus, procariotos e

eucariotos sugerindo importância vital para todos os organismos. De acordo com suas similaridades estruturais, são divididas em 20 famílias e seis “clans”. Outro aspecto interessante é a presença de resíduos conservados de glicina (Gly) próximo ao resíduo de serina (Ser) do sítio ativo, formando o motivo característico Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly, onde Xaa e Yaa podem ser qualquer aminoácido. As serina proteases podem ser reconhecidas por sua inibição irreversível pelos compostos 3,4-dicloroisocumarina-3,4-DCI, diisopropilfluorfosfato-DFP, 3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamido e Fluoreto de fenilmetilsulfonil-PMSF (BARRET, 1994, RAO et al., 1998).

As aspartil proteases, também são conhecidas como proteases ácidas e dependem da presença de resíduos de ácido aspártico (Asp) para a atividade catalítica. A maioria delas apresenta atividade máxima em baixos valores de pH e são agrupadas em três famílias. O resíduo de ácido aspártico no sítio ativo está situado geralmente dentro do motivo Asp-X-Gly onde X pode ser o aminoácido serina ou treonina e são inibidas por pepstatina (BARRET, 1995, RAO et al., 1998).

As Cisteína proteases ocorrem em procariotos e eucariotos. Cerca de 20 famílias são conhecidas e a atividade de todas elas depende da presença de uma díade de cisteína (Cys) e histidina (His) no sítio ativo, sendo que a ordem, Cys-His ou His-Cys, difere entre as famílias. Geralmente, estas enzimas são ativas somente na presença de condições redutoras. As cisteína proteases em sua maioria são ativas em pH neutro, mas algumas que são encontradas em lisossomos têm pH ótimo na faixa ácida. Outra característica é a inibição por agentes sulfidríla como p-cloromercurilbenzoato-PCMB e Iodoacetamida.(BARRET, 1994).

As metaloproteases estão distribuídas em todos os organismos vivos e são as enzimas que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos. Elas são caracterizadas pela necessidade da presença de um íon metálico divalente para atividade e são distribuídas em cerca de 30 famílias, sendo 17 com atividade endopeptidase, 12 com atividade exopeptidase e uma contendo ambas (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 1995). As metalopetidases são agrupadas em “clans” de acordo com a natureza dos aminoácidos que compõem o sítio de ligação ao metal. Os “clans” MA e MB, os mais bem conhecidos, apresentam as seqüências HEXXH-E e HEXXH-H respectivamente onde X pode ser qualquer aminoácido. Existem também outros sítios de ligação ao metal que podem apresentar constituição diferente das até então citadas (MYOSHI; SHINODA, 2000) como mostrado na figura 1.1. As metaloproteases são inibidas por agentes

quelantes como ácido etileno diamino tetracético –EDTA, ácido etileno glicol tetra acético – EGTA e 1,10 orto fenantrolina –OP (BARRET, 1995).

Figura 1.1 - Famílias de metalopeptidases com base na estrutura do sítio de ligação ao cátion. As letras indicadas com os números representam os ligantes de Zn já identificados. Resíduos da linha **a** correspondem ao primeiro e segundo ligantes; resíduos em **b** o terceiro ligante e em **c** o provável quinto ligante (MYOSHI; SHINODA, 2000).

2.1.2 Relação Evolutiva das Proteases

As proteases estão presentes em todos os seres vivos e sugere-se que tenham surgido durante as fases iniciais da evolução biológica há alguns bilhões de anos, já que mesmo nos organismos mais primitivos, sua presença era necessária para a digestão e metabolismo de suas próprias proteínas. Considera-se que as proteínas tem origem em um ancestral comum. Essa evolução pode ser divergente, quando possuem funções, sítio ativo, sequência de aminoácidos e estrutura tri-dimensional semelhantes, ou convergente, também chamada de independente, na qual as proteínas podem apresentar função e sítio ativo semelhantes, mas a sequência e estrutura tri-dimensional diferem (NEURATH, 1983). Essas comparações de sequências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismo de ação das proteases têm ajudado na elucidação de seus cursos evolutivos, pois se considera que as diferenças na estrutura molecular surgiram por causa da necessidade de alterações de função durante a evolução (RAO et al., 1998).

A elucidação da relação estrutura-função das proteínas tem sido facilitada com o desenvolvimento da bioinformática, principalmente com o estudo da homologia entre as sequências para análise filogenética e a dedução da estrutura secundária e terciária das proteínas. As proteases, sendo um grupo bastante heterogêneo e complexo de enzimas, apresentam enormes variações em suas propriedades físico-químicas e catalíticas, e são divididas de acordo com suas linhas evolutivas em famílias e grupos de famílias (clans). As proteínas são agrupadas na mesma família quando elas apresentam uma relação evolutiva entre toda a sequência ou no mínimo entre a região responsável pela atividade catalítica. Os “clans” correspondem a grupos de famílias, onde há indicações de relação evolutiva, mas há falta similaridade comprovada estatisticamente entre as sequências. Através da análise rigorosa das sequências das proteases foram reconhecidas aproximadamente 84 famílias distintas. Algumas famílias foram alocadas em “clans”, ainda assim, mais de 60 grupos não apresentaram relação evolutiva e, portanto, concluindo haver muitas linhas evolutivas com origens independentes dentro das proteases (RAWLINGS; BARRET, 1993).

Existem proteases que possuem sua origem evolutiva bastante recente. Famílias que são encontradas em procariotos também podem ser encontradas em eucariotos como as famílias **S1** (subtilisina), **S8** (chimotripsina), **M14** (carboxipeptidase A). Existem famílias que estão presentes somente em organismos eucariotos como as famílias **S1** (tripsina), **C1** (papaína) e **A1** (pepsina).

Estas possivelmente tiveram seu desenvolvimento juntamente com a capacidade das células eucarióticas de endocitose, pois funcionam em organelas compartimentalizadas por membranas e muitas vezes em pH ácido. Todas as proteases virais encontradas são endopeptidases e a grande maioria delas não se apresenta relacionada às de outros organismos (RAWLINGS; BARRET, 1993).

Através da análise das seqüências das famílias de proteases também se descobriram exemplos de evolução divergente. Seis famílias (**S1**, **S12**, **S14**, **C1**, **M1** e **M16**) contêm proteínas sem atividade proteolítica. Algumas famílias contêm enzimas com atividade endo e exopeptidases (**S8**, **S9**, **C1**, e **M3**) e outras amino e carboxipeptidase (**S12**), ou seja, na maioria das vezes, enzimas da mesma família possuem especificidades diferentes. Por outro lado, exemplificando a convergência evolutiva, especificidades semelhantes são exibidas por enzimas de famílias diferentes, como exemplificado na especificidade por resíduos carboxiterminal básicos por ambas famílias **S10** e **M14**. Essas observações sugerem que devemos levar sempre em consideração as seqüências das proteases e utilizá-las como um recurso aditivo durante a classificação, não observando apenas o tipo catalítico (RAWLINGS; BARRET, 1993).

2.1.3 Funções Fisiológicas das Peptidases

As peptidases executam uma variedade enorme de funções fisiológicas de grande complexidade. Elas são importantes na manutenção e regulação de várias vias metabólicas, e por isto estão presentes em todos os seres vivos. As peptidases, principalmente intracelulares, apresentam-se como ponto chave nos processos de: coagulação sanguínea, crescimento e migração celular, organização tecidual, morfogênese e desenvolvimento, inflamação, crescimento tumoral e metástase, ativação de zimogênios, liberação de hormônios e precursores protéicos, morte celular programada e transporte de proteínas através da membrana. A função das peptidases extracelulares, quase sempre está ligada ao catabolismo, pois catalisam a hidrólise e despolimerização de grandes proteínas a peptídeos menores e aminoácidos, facilitando assim a absorção celular (RAO et. al., 1998).

2.1.4 Aplicações

As peptidases possuem uma grande variedade de aplicações, principalmente nas indústrias farmacêutica, de detergentes, alimentos e no desenvolvimento de tecnologias menos agressivas ao ambiente. As peptidases são um dos ingredientes padrão adicionado a todos os detergentes, principalmente por causa da especificidade para alguns substratos constituintes do material a ser removido. Na indústria de alimentos são amplamente utilizadas em laticínios, massas e na produção de hidrolisados protéicos. Na indústria farmacêutica proteases são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. Outra aplicação que vem despertando bastante interesse é a substituição de compostos químicos na indústria e a utilização em processos de tratamentos de resíduos industriais, além da grande utilização de proteases na pesquisa científica. Estima-se que são movimentados anualmente somente com enzimas de interesse industrial cerca U\$ 1,6 bilhões, destas, as proteases correspondem a 60% do total produzido (RAO et. al., 1998).

2.2 Queratinólise Microbiana

2.2.1 Queratinas

As queratinas são proteínas fibrosas, ricas em enxofre e insolúveis, que são o principal componente dos tecidos encontrados na superfície dos vertebrados superiores (peles, pêlos, penas, unhas, cascos e escamas). As queratinas foram vitais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica e despertaram interesses por sua aplicação na indústria têxtil, médico-farmacêutica e mais recentemente na indústria de polímeros e fibras sintéticas (BUSSON; ENGSTRÖN; DOUCET, 1999).

As queratinas fazem parte de uma família de proteínas denominada proteínas de filamento intermediário (FI). A estrutura protéica altamente empacotada em α -hélice (α -queratina) ou β -pregueada (β -queratina) e o super enovelamento da cadeia polipeptídica das queratinas conferem resistência mecânica e de digestão proteolítica à maioria das peptidases. As queratinas possuem também um alto índice de ligações intercadeia, consequência da grande quantidade de formação de pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (ONIFADE et al., 1998).

As queratinas são extremamente diversas em estrutura molecular. As α e β -queratinas têm sido amplamente estudadas e historicamente consideradas convergentes em termos de estrutura e função. No entanto há poucas similaridades em seqüência e muitas diferenças moleculares entre elas. As α -queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores enquanto que as β -queratinas são encontradas exclusivamente em répteis e aves. Todas as β -queratinas são menores que as α -queratinas e são produzidas por uma família de genes altamente relacionados. Suas características químicas, como a capacidade de formar filamentos, são similares, mas os mecanismos pelos quais isso ocorre diferem. Um aspecto em comum é a presença de cistina na formação das fibras, o que confere também a insolubilidade destas moléculas. As β -queratinas tendem a conter mais aminoácidos pequenos e não essenciais e o monômero apresenta um único tamanho, enquanto que as α -queratinas requerem dois monômeros de tamanhos diferentes para a formação do filamento. Conseqüentemente suas configurações terciárias e estrutura dos filamentos diferem (BRUSH, 1996).

As queratinas foram primeiramente classificadas quanto a biossíntese e características físico-químicas em “leves” e “rígidas”. As queratinas “leves”, encontradas no extrato córneo, são isentas ou contêm muito pouco conteúdo de cisteína e são constituídas principalmente de aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina. As queratinas “rígidas” são relativamente ricas em cisteína e contêm muitas ligações dissulfeto bem como a presença da maioria dos aminoácidos. Incluem-se nesta classe penas e pêlos com cerca de 10 a 14% de cisteína (HOOD; HEALY, 1994). Outra classificação foi baseada em padrões de difração de raios-X. Foram divididas em quatro classes: α , β , pena e amorfa encontradas em tecidos rígidos de mamíferos; tecidos elásticos de mamíferos; tecidos rígidos de aves e répteis e na cutícula de cabelos respectivamente (BUSSON; ENGSTRÖN; DOUCET, 1999).

A estrutura da α -queratina é conseqüência de sua estrutura primária. As regiões terminais são mais ricas em resíduos de cisteína do que a região central. Esta região, no entanto, apresenta uma estrutura com seqüências repetidas de sete aminoácidos (*a-b-c-d-e-f-g*) onde as posições *a* e *d* são ocupadas geralmente por resíduos apolares. A associação destes resíduos permite a formação de um arranjo com uma conformação de superespiralamento das cadeias em paralelo umas sobre as outras, de maneira a formar uma estrutura filamentar (JONES et al., 1997). Os domínios N e C-terminal facilitam a agregação de monômeros em dímeros (protofilamentos) que

juntos constituem uma protofibrila. Quatro protofibrilas constituem uma microfibrila que se associa a outras formando uma macrofibrila e assim a estrutura superior da queratina é formada (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

A estrutura primária da molécula da β -queratina consiste em uma longa seqüência de polipeptídeos que alternam resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Como resultado as glicinas situam-se na parte superior do plano da folha β -pregueada enquanto outros resíduos ficam abaixo do plano. Pares de folhas preguçadas, então, empacotam-se perfeitamente. Não há formação de pontes dissulfeto neste estágio sendo a estabilização permitida por pontes de hidrogênio. A associação linear de monômeros forma então os microfilamentos e a associação destes, estabilizada por pontes dissulfeto, formará as fibras de β -queratina (GARRET; GRISHAM, 1995).

2.2.2 Microrganismos Queratinolíticos

Apesar de as moléculas das queratinas serem altamente estáveis e resistentes à maioria das peptidases verifica-se que não há acúmulo na natureza. Isto confirma a existência de microrganismos decompositores naturais, capazes de utilizar a queratina como substrato para seu crescimento. Estes são chamados de microrganismos queratinolíticos e podem crescer em diferentes condições ecológicas e ambientais, demonstrando uma capacidade variada de solubilização de substratos queratinosos, bem como de outros substratos protéicos compactados. Geralmente, essa solubilização se faz através da síntese e secreção de proteases para a superfície destes substratos viabilizando a hidrólise e assim a assimilação de nutrientes (ONIFADE et al., 1998).

Existem vários microrganismos queratinolíticos isolados e caracterizados, sendo a maioria deles dermatófitos (TAKIUCHI; HIGUCHI; SEI, 1983, HÄNEL et al., 1991, WAWRZKIEWICZ; WOLSKI; LOBARZEWSKI, 1991, PAPINI; MANCIANTI, 1996), gram-positivos do gênero *Bacillus* (WILLIAMS et al., 1990; ATALO; GASCHÉ, 1993; ZAGHLOUL; ABDELAZIZ; MOSTAFA, 1998, KIM; LIM; SUH, 2001, EL-REFAI et al., 2005;) ou *Streptomyces* (NOVAL; NICKERSON, 1958, BOCKLE; GALUNSKI; MULLER, 1995, LETORNEAU et al. 1998, CHITE; NALAWADE; DEY, 1999, MOHAMEDIN, 1999; SZABO, 2000). Apesar disto, a queratinólise não tem se limitado somente a esses grupos, as gram-

negativas *Vibrio* sp. Kr2 (SANGALI; BRANDELLI, 2000), a Cythophagale *Chryseobacterium* sp. Kr6 (RIFFEL; BRANDELLI, 2003) e a Thermotogale *Fervidobacterium pennavorans* (FRIEDRICH; ANTRANIKIAN, 1996) também mostraram capacidade de degradação de queratina.

Lucas et al. (2003) observaram a diversidade de bactérias queratinolíticas ativas encontradas em solos de regiões temperadas. Foram obtidos 33 isolados capazes de crescer em penas como única fonte de nutriente e estes foram agrupados filogeneticamente em 13 grupos: quatro foram gram-positivos, dois pertencentes ao grupo *Cytophaga-Flavobacterium* e o restante ao grupo das Proteobacterias. Com isso demonstrou-se que a diversidade de microrganismos queratinolíticos é grande e bem maior do que a até então descrita, pois nenhum dos isolados ativos tinha sido até então associado a queratinólise. Portanto, o papel ecológico dos microrganismos queratinolíticos no ambiente permanece ainda a ser estudado.

2.2.3 Queratinases

As proteases específicas, intra ou extracelulares, elaboradas pelos microrganismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Estas enzimas distinguem-se das outras peptidases por uma maior capacidade de degradação de substratos compactos como, por exemplo, a queratina. A maioria das queratinases é induzida por queratina e é ativa somente no meio extracelular. No entanto, verificou-se também atividade queratinolítica associada às células do microrganismo queratinolítico *Trichophyton mentagrophytes* (ONIFADE et al., 1998).

Queratinases de vários microrganismos têm sido purificadas e caracterizadas até o momento (Tabela 1.1). Dependendo da espécie do microrganismo produtor, as propriedades físico químicas destas enzimas têm se mostrado bastante diversa. Já foram encontradas enzimas de pesos moleculares de 18 KDa (BRESSOLLIER et al., 1999) até maiores de 200 KDa (NAM et al., 2002) sendo a maioria delas pertencente à classe das serina proteases, mas tiol e metalopeptidases também têm sido caracterizadas. Os pH e temperaturas de maior atividade também variam bastante, de 5,5 (QIN; DEKIO; JIDOI, 1992) a 10 (BERNAL, CAIRÓ; COELLO, 1995) e 30°C (MUKHOPADHYAY; CHANDRA, 1990) até 100°C (NAM et al., 2002) respectivamente.

Tabela 1.1 - Características das queratinases de alguns microrganismos.

(Continua)

Espécie	Tipo	M (KDa)	pH	Temp (°C)	Substrato	Referência
<i>Streptomyces</i> sp.	–	49	7,5	30	Cabelo, penas de frango e lã	(MUKHOPADHYAY; CHANDRA, 1990)
<i>Streptomyces pactum</i>	Serina	30	7-10	40-75	Penas, albumina sérica bovina (BSA)	(BOCKLE et. al., 1995)
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Serina	18	6-9,5	40-70	Queratina	BRESSOLLIER et al., 1999)
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1	Serina	33	7,5	50	BSA, caseína, colágeno e penas	(LIN et al., 1992)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Tiol	42	8,5	52	-	(ROZS et al., 2001)
<i>Bacillus subtilis</i> KS-1	Serina	25,4	–	–	Caseína e penas	(SUH; LEE, 2001)

Tabela 1.1 - Características das queratinases de alguns microrganismos.

(Continuação)

Espécie	Tipo	M (KDa)	pH	Temp (°C)	Substrato	Referência
<i>Bacillus sp.</i> SCB3	Metalo	134	7,0	40	Caseína e queratina de Penas	(LEE et al., 2002)
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	–	38	5,5	50	Cabelo, pêlos, unhas e caseína e	(QIN et al., 1992)
<i>Kocurea Rosea</i>	Serina	240	10	40	Queratina solúvel de penas	(BERNAL; CARNÓ COELLO, 1995)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	–	–	6,5-9	45	Pena autoclavada, nativa e caseína	(SANTOS et al., 1996)
<i>Microsporum canis</i>	Metalo	43,5	8	50	Queratina, elastina e colágeno	(BROUTA et al., 2001)
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Serina	>200	9,0	100	Penas	(NAM et al., 2002)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Serina	40	8,0-9,0		Queratina e colágeno	(YAMAMURA et al., 2002)

Tabela 1.1 - Características das queratinases de alguns microrganismos.

						(Conclusão)
Espécie	Tipo	M (KDa)	pH	Temp (°C)	Substrato	Referência
<i>Lisobacter</i> sp. NCIMB-9497	Metalo	148	-	50	“Keratin Azure TM ”	(ALLPRESS; MOUNTAIN; GOWLAND, 2002)
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	Serina	36	9,0	60	Azoqueratina e Azocaseína	(De TONI et al., 2002)
<i>Kytococcus sedentarius</i> *	Serina	30/50	7,1/7,5	40/50	Queratina de calo humano	(LONGSHAW et al., 2002)
<i>Aspergillus orizae</i>	Metalo	60	8,0	50	Penas, queratina e lã	(FARAG; HASSAN, 2004)

* Duas queratinases purificadas: Q1/P2

2.2.4 Clonagem e Superexpressão de Queratinases

O isolamento e a clonagem de genes que codificam proteases têm sido usados na engenharia de melhores e mais eficientes microrganismos para produção destas. Um grande número de genes que codificam peptidases tem sido clonado e expressado em novos hospedeiros sendo os dois principais microrganismos de escolha são a *Escherichia coli* e o *Bacillus subtilis* (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

O gene (*Ker A*) da queratinase do *Bacillus licheniformis* PWD-1 foi isolado e sequenciado. A enzima foi caracterizada como sendo uma serina peptidase da grande família das subtilases (LIN et al., 1995). Com o objetivo de aumentar o rendimento da produção da queratinase, o gene *Ker A* foi clonado e expresso em *Bacillus subtilis*. Utilizaram-se, seu próprio promotor, o promotor de crescimento vegetativo P43 e a associação desses dois promotores. Todos os transformantes foram capazes de expressar a queratinase ativa com um rendimento de até três vezes com o promotor P43, mas ainda não em quantidades suficientes para utilização industrial (LIN et al., 1997). Otimizando as condições de fermentação em larga escala o mesmo recombinante não foi capaz de aumentar a expressão de *KerA* em níveis consideráveis, consequência da instabilidade do plasmídeo durante a fermentação, enquanto que no mesmo experimento, utilizando o próprio *Bacillus licheniformis* PWD-1, houve um aumento de até dez vezes a sua expressão, demonstrando que a regulação e otimização das condições de fermentação são necessárias e extremamente rigorosas (WANG; SHIH, 1999).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* também foi utilizada como sistema para expressão de *KerA* de *Bacillus licheniformis* (PORRES; BENITO; LEI, 2002). O rendimento obtido, sem otimização das condições de fermentação, foi maior do que o conseguido por Lin et al. (1997) com *B. subtilis*. As características bioquímicas da enzima se mantiveram as mesmas com a exceção do pH ótimo de atividade que pode ter sido alterado por causa das glicosilações mais frequentes dos sistemas eucariotos.

Wang, Swaisgood e Shih (2003) desenvolveram uma construção para a produção da queratinase (*Ker A*) fundida a streptavidina com o objetivo de imobilização em matriz biotinilada. Para isso foram utilizados como sistemas de expressão *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Em *B. subtilis* a proteína fundida foi produzida no meio extracelular e rapidamente imobilizada diretamente do meio. Em *E. coli* a proteína foi expressa em corpúsculos de inclusão,

requerendo ressolubilização e renaturação adicional para obtenção da queratinase ativa antes da imobilização. No entanto houve uma baixa eficiência neste processo de cerca de 24-28% para ambos sistemas. Adicionalmente, na tentativa de aumentar a expressão de *KerA*, foi a integração de múltiplas cópias do gene, juntamente com o promotor P43 no cromossomo do próprio *Bacillus licheniformis*. Com esta estratégia o gene se manteve estável, as células puderam crescer em meios com uma alta concentração de substrato e a atividade aumentou em até seis vezes (WANG; ROJANATAVORM; SHIH, 2004).

Algumas queratinases de outros microrganismos também foram clonadas. Noronha et al., (2002) purificaram, clonaram e expressaram o cDNA de uma queratinase de *Aspergillus fumigatus*, um fungo patogênico em *Pichia pastoris*. A enzima recombinante apresentou atividade proteolítica e queratinolítica, sendo capaz de hidrolisar farinha de pena em até 10%. Zaghoul et al. (1994) clonaram uma protease alcalina de *Bacillus subtilis* em um plasmídeo de alta expressão. A enzima recombinante apresentou alta estabilidade e capacidade de degradação de penas. Kluskens et al. (2002) isolaram e caracterizaram o gene *fls* da bactéria termofílica *Fervidobacterium pennivorans*, codificante da fervidolisina, uma queratinase. O gene foi clonado tanto em *E. coli* e *Bacillus sp.*, e a enzima recombinante, apesar de mesmo peso molecular da enzima nativa (FRIEDRICH; ANTRANIKIAN, 1996), não foi expressa em sua forma ativa, possivelmente por deficiências tanto no enovelamento como no processamento pós-traducional que deve ser realizado pelo hospedeiro original *Fervidobacterium pennivorans*.

2.2.5 Aplicações das Queratinases

2.2.5.1 Reaproveitamento de Penas de Frango

Penas representam cerca de 5-7% do corporal de aves domésticas. Elas constituem a mais abundante fonte de queratina encontrada. Durante o processamento de aves para consumo humano, penas são geradas em grande quantidade como resíduo que geralmente se acumula e apresenta-se como poluente ambiental. Uma grande quantidade de proteínas e aminoácidos presentes nas penas poderia ser utilizada benéficamente na alimentação de animais como alternativa para reciclagem deste produto. No entanto, ainda existem limitações para esta utilização, que são principalmente a baixa digestibilidade (consequência da composição e a

conformação molecular da queratina), o baixo valor biológico e a deficiência de alguns aminoácidos nutricionalmente essenciais como metionina, lisina, histidina e triptofano (ONIFADE et al., 1998; PAPADOPOULOS; BOUSHY; ROODBEEN, 1986, DALEV; IVANOV; LIUBOMIROVA, 1997).

Atualmente, um destino para o aproveitamento das penas, tem sido a produção de farinha de pena (FP). As penas são processadas por tratamento térmico sob pressão, secagem em estufa e moagem. A farinha quando pronta é utilizada como suplemento alimentar em rações para animais. Segundo Papadopoulos; Boushy e Roodben (1986), não existe uma condição ótima para o tratamento térmico das penas, pois a digestibilidade *in vivo* é aumentada com o tempo de processamento, mas o conteúdo de aminoácidos é influenciado pelo processamento. Os aminoácidos como valina, leucina, tirosina e fenilalanina apresentaram melhor estabilidade ao processamento térmico. Moritz e Latschaw (2001), em experimento para verificar qualidade nutricional da FP alterando a relação tempo/pressão durante o processamento, também não chegaram a uma condição ótima. O aumento destes fatores faz com que haja um aumento na digestibilidade da farinha, mas o teor de aminoácidos disponíveis sempre diminui.

Considerando o custo termoenergético do processo convencional de produção de FP combinado com a baixa digestibilidade e valor nutricional, tem-se buscado alternativas tecnológicas para otimização na utilização de penas visando o aumento do valor nutricional, diminuição do impacto ambiental e otimização destes recursos renováveis. Por isso, tem-se pensado em uma abordagem biotecnológica utilizando microrganismos queratinolíticos e queratinases como alternativa (ONIFADE et al., 1998).

Lee; Fercket e Shih (1991), em um experimento adicionando uma preparação crua da queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 em rações observaram um aumento na digestibilidade de aminoácidos totais de penas cruas, de 30% para 60% e em FP comercial de 77% para 99%. Em um segundo experimento tratando frangos durante 8 dias com farinha de soja, FP comercial e FP suplementada com queratinase. O ganho de peso diário foi de 66g, 50g e 56g respectivamente. Odetallah et al., (2003), em experimento utilizando rações suplementadas com queratinase purificada de *Bacillus licheniformis*-PW1, utilizando frangos jovens de 1 a 26 dias observaram um maior aumento na performance de crescimento, taxa de conversão alimentar e ganho de peso quando a enzima foi adicionada à ração.

2.2.5.2 Depilação do Couro

Na indústria do couro, o processamento das peles envolve uma série de operações até o produto acabado: i) ribeira, onde as peles são limpas (remolho, depilação, desencalagem, purga, desengraxe e o píquel); ii) curtimento, onde as peles são estabilizadas tornando-se resistentes a putrefação e o iii) acabamento, em que são definidas as características estéticas ao produto. Em todas estas etapas, uma grande quantidade de resíduos químicos é gerada (THANIKAIVELAN et al., 2004).

Tradicionalmente, a depilação envolve a o desenvolvimento de condições extremamente alcalinas com utilização de grandes quantidades de sulfeto de sódio, altamente tóxico, gerando cerca de 80% de toda poluição do curtume. A substituição ou adição de enzimas ao processo poderia ser uma alternativa para: redução da quantidade de sulfeto empregado, aumento na qualidade do couro, recuperação dos pêlos e eliminação da necessidade um banho extra para remoção dos agentes responsáveis pela depilação (HUANG et al., 2002). Desta forma seria possível uma redução da demanda química de oxigênio (DQO) em cerca de 50% e da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em cerca de 35% (AHUJA; FERREIRA; MOREIRA, 2004). As enzimas utilizadas no processo de depilação são geralmente peptidases, no entanto nem todas podem ser utilizadas por causa da atividade de degradação do colágeno que pode danificar a estrutura e assim diminuir a qualidade do couro (HUANG et al., 2002).

Um processo enzimático efetivo para remoção dos pêlos deve liberar os pêlos e o sistema epidérmico e abrir a estrutura fibrosa nas peles. Experimentos utilizando enzimas microbianas têm atingido esse objetivo (MALATHI; CHAKRABORTY, 1991). Experimentos utilizando sobrenadante de cultivo de *Bacillus subtilis* (VARELA et al., 1996), *Bacillus amyloliquefaciens* (GEORGE et al., 1995), *Aspergillus tomarii* (DAYANANDAN et al., 2003) e algumas bactérias queratinolíticas (RIFFEL; ORTOLAN; BRANDELLI, 2003) têm promovido resultados esperados para um processo de depilação efetivo sem dano a qualidade das peles. Experimentos utilizando enzimas puras com atividade depilatória em peles também têm sido relatados como com as proteases de *Bacillus pumilus* (HUANG et al., 2003) e a queratinase de *Bacillus subtilis* (MACEDO et al., 2005).

2.2.6 O Processo de Degradação da queratina

Sendo a queratina, constituída quase que exclusivamente de proteína (95% em peso), a queratinólise é um evento basicamente proteolítico. Apesar da grande diversidade de características físico-químicas entre queratinases, a atividade de protease e sua ação de hidrólise da queratina têm sido demonstradas. No entanto o processo exato da degradação de queratina permanece ainda não totalmente compreendido, mas uma série de prováveis processos para o entendimento desse mecanismo de ação tem sido proposta (ONIFADE, et al., 1998).

2.2.6.1 Queratinólise Mecânica

Este tipo de degradação só tem se aplicado a fungos produtores de micélio. A degradação mecânica da queratina é aquela em que ocorre como resultado da pressão ou penetração do micélio no substrato queratinoso. Presume-se que o processo mecânico procede à hidrólise enzimática, funcionando como mecanismo sinérgico, já que em alguns casos observou-se degradação de queratina antes mesmo de ser detectada a atividade proteolítica (ONIFADE, et al., 1998).

2.2.6.2 Hidrólise de Pontes Dissulfeto

A indicação de sulfitólise surge por causa do alto conteúdo de cisteína encontrado nas queratinas. Há o consenso de que a degradação completa de queratina é conseguida somente após a desnaturação por clivagem das pontes dissulfeto, que representam a principal fonte de estabilidade e resistência à digestão proteolítica (ONIFADE, et al., 1998).

De acordo com Kunert et al. (1992), fungos podem metabolizar cisteína livre ou combinada como fonte de enxofre e nitrogênio. Os produtos deste metabolismo são enxofre inorgânico (sulfato e sulfito) e outros produtos intermediários. O sulfito excretado pode reagir em pH neutro a alcalino com cistina clivando em cisteína e sulfocisteína. Essa reação pode acontecer em proteínas, inclusive queratinas, sendo assim desnaturada antes da atividade proteolítica das queratinases (ONIFADE et al. 1998).

A formação de tiol livre tem sido observada durante o crescimento em penas de frango de *Vibrio* sp. Kr2 (SANGALI; BRANDELLI, 2000), *Chryseobacterium* sp. Kr6 (RIFFEL et al., 2003), e *Streptomyces pactum* (BOCKLE; MULLER, 1997). Yamamura et al. (2002) isolaram, da linhagem queratinolítica *Stenotrophomonas* sp., uma proteína de 15 KDa com atividade redutora de pontes dissulfeto em proteínas. Esta proteína apresentou homologia muito baixa a outras proteínas conhecidas e foi sugerido, para a degradação de queratina, o sinergismo entre esta e uma protease também isolada, ou seja, a dissulfeto redutase reduz a pontes dissulfeto da queratina nativa facilitando assim o ataque proteolítico e o acesso às ligações peptídicas pela protease.

2.2.6.3 Proteólise

A fase proteolítica da queratinólise pode ser simplificada e comparada à proteólise em outras proteínas. A diversidade das queratinases, quanto a condições ótimas, pesos moleculares e ativadores e inibidores mostra o pouco conhecimento ainda sobre a especificidade de hidrólise da queratina. Várias proteases não específicas são capazes de hidrolisar queratina sulfitolisada dificultando um entendimento da especificidade e metabolismo destes substratos orgânicos complexos (KUNERT et al., 1989).

No entanto, algumas queratinases, por apresentar alta atividade proteolítica sobre queratina mostra-se diferenciadas sobre outras proteases (KUNERT, 1992, LIN et al., 1992). Portanto a preferência das queratinases purificadas por moléculas compactas como a queratina evidencia sua especificidade (LIN et al., 1992, BOCKLE et al., 1995).

2.3 O Gênero *Chryseobacterium*

O gênero *Chryseobacterium* apresenta hoje 12 espécies e foi criado por Vandamme et al. (1994) para acomodar algumas espécies que até então eram classificadas como pertencentes ao gênero *Flavobacterium*. As espécies reclassificadas foram *Chryseobacterium balustinum*, *C. gleum*, *C. indologenes*, *C. indoltheticum*, *C. meningosepticum* e *C. scophthalmum* e recentemente mais algumas espécies têm sido isoladas e adicionadas como: *Chryseobacterium defluvii* (KAMPFER et al., 2003), *C. joostei* (HUGO et al., 2003), *C. miricola* (LI et al., 2003), *C.*

daecheongense (KIM et al., 2005a), *C. formosense* (YOUNG et al., 2005), *C. taichungense* (SHEN et al., 2005), *C. shigense* (SHIMURA; KAJI; HIRASHI; 2005) e *C. vrystaatense* (BEER et al., 2005). No entanto as espécies *C. meningosepticum* e *C. miricola* foram recentemente transferidas ao novo gênero *Elizabethkingia*.(KIM et al., 2005b).

As espécies do gênero *Chryseobacterium* apresentam-se como bastonetes gram-negativos, não-móveis, não formadoras de esporos e pigmentação amarelada e têm sido isoladas de uma grande variedade de ambientes tais como: sistemas de lodo ativado (KAMPFER et al., 2003), indústria de laticínios (HUGO et al., 2003), bebidas lácteas (SHIMURA; KAJI; HIRASHI; 2005), rizosfera (YOUNG et al., 2005) sedimentos de lagos (KIM et al., 2005a), solo contaminado (SHEN et al., 2005) e abatedouro de aves (BEER et al., 2005) e têm também sido associados à atividade proteolítica (VENTER; OSTHOFF; LITTHAUER, 1999, YAMAGUCHI; YOKOE, 2000, LIJNEN et al., 2000).

Riffel et al., (2003) isolaram, em um abatedouro de aves, a linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6. Essa espécie, através da análise da sequência parcial da região do 16S rRNA, mostrou 99% de similaridade a *Chryseobacterium gleum* ATCC 35910. A linhagem isolada apresentou alta atividade proteolítica e capacidade de degradação completa de penas de frango em temperaturas mesofílicas de 22 a 37°C e nos pH de 5 a 8. Apesar da maioria das queratinases terem a atividade proteolítica associada a serina proteases a linhagem Kr6 apresentou como principal responsável pela atividade proteolítica metaloproteases. Em outro trabalho Riffel, Ortolan e Brandelli, (2003), verificaram que o sobrenadante de cultivo da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 apresentou atividade depilatória, com fácil remoção dos pêlos em peles bovina sem a necessidade da alcalinização prévia, tradicionalmente necessária, das peles. A análise microscópica das peles após o tratamento apresentou ausência de pêlos nos folículos, destruição da bainha externa e abertura das fibras sem danos à estrutura do colágeno profundo. Essas características são desejáveis e também têm sido observadas para outros microrganismos utilizados e considerados com potencial para o propósito de depilação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Influência das Condições Nutricionais sobre o Crescimento e Atividade Proteolítica de *Chryseobacterium* sp. Kr6

3.1.1 Microrganismo, Meios de Cultura e Condições de Crescimento

Utilizou-se neste estudo a linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 (Genbank AY157745). Os meios empregados foram o meio mínimo mineral (NaCl 0.5 g.L⁻¹, K_2HPO_4 0.3 g.L⁻¹, KH_2PO_4 0.4 g.L⁻¹) suplementado com as diferentes fontes de carbono e nitrogênio: CP: penas de frango (10 g.L⁻¹); CPG: penas (10 g.L⁻¹) e glicose (50mM); CPN: penas (10 g.L⁻¹) e cloreto de amônio (50mM); CGli: nitrogênio base (Difco) e glicose (50 mM); Ccas: caseína (10 g.L⁻¹); CTrip: triptona (10 g.L⁻¹). O cultivo do pré-inóculo foi em meio CP durante 16h sob agitação de 150 RPM (rotações por minuto) e temperatura de 30 °C. Para evitar o carreamento de nutrientes do pré-inóculo, 10 mL da suspensão celular foram centrifugados a 3000xg por 5 minutos e as células foram lavadas com tampão fosfato 50 mM estéril. As células foram ressuspendidas em 5 mL do mesmo tampão e inoculadas, cultivadas e monitoradas por 44 horas nas mesmas condições do pré-inóculo e em repetições de três experimentos independentes.

3.1.2 Determinação do Número de Células Viáveis

A contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹) foi realizada segundo modificação do método de Milles e Misra (1983). A suspensão bacteriana foi diluída em séries de 10 vezes com solução de NaCl 0,875% (m/v) em tubos de ensaio sucessivamente até 10⁸ vezes. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e aplicadas em três repetições de 20 µL em placas de ágar nutriente (AN). As placas foram incubadas por 24 horas em estufa à temperatura de 30 °C. A contagem foi efetuada em contador de colônias (Phoenix CP 608) para a diluição onde as colônias apresentavam-se isoladas com contagem entre de 30 e 300 colônias. Os procedimentos que requereram ambiente estéril foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical. Os resultados foram expressos em log UFC.mL⁻¹. O pH dos meios CP, CPG e CPN foram determinados ao final das 44 horas.

3.1.3 Ensaio de Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada utilizando caseína Hammerstein (Merk, Darmstadt, Alemanha) como substrato, de acordo com modificação do método de Kunitz (1947). A reação foi iniciada adicionando-se 150 µL da enzima a 500 µL de solução 0,5% (m/v) de caseína em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM e pH 8,0 e pré-aquecida na temperatura do ensaio. Após incubação por 20 minutos a 50°C a reação foi parada adicionando-se 650 µL de solução de TCA 10% (m/v), submetida a vórtex e centrifugada a 13000xg por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 280 nm. Os controles foram preparados da mesma forma exceto pela adição prévia da solução de TCA à enzima. Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 µmol de tirosina por minuto nas condições mencionadas acima. O coeficiente de extinção molar da tirosina adotado foi de 1380 a 280 nm.

Neste trabalho, caseína foi utilizada para determinação da atividade proteolítica nos ensaios de produção, monitoramento durante a purificação caracterização. A atividade queratinolítica foi confirmada com keratin azure. O ensaio com caseína é um ensaio padrão para a determinação da atividade proteolítica e segundo Cheng et al. (1995), as atividades caseinolíticas e queratinolíticas estão correlacionadas, sendo que com caseína o método mostra-se muito mais acurado e comparativo do que utilizando queratina insolúvel como substrato.

3.1.4 Ensaio de Atividade Queratinolítica

O substrato utilizado para determinação da atividade queratinolítica foi o substrato insolúvel keratin azure (Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, France). Incubaram-se 500 µL das amostras da protease em uma suspensão de 5 mg de substrato em tampão Tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM e pH 8,5 durante 1 hora a 50°C. Em seguida os tubos foram centrifugados a 13000xg por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante determinada a 595 nm. O controle foi preparado da mesma forma exceto pela adição de tampão ao invés da enzima. Uma unidade queratinolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância (A_{595}) em 0,01 unidades nas condições descritas acima.

3.1.5 Zimografia

A zimografia foi desenvolvida em gel de poliacrilamida contendo SDS e com 1mg/mL de gelatina copolimerizada segundo modificação do método de Quesada et al. (1996). As amostras de protease foram diluídas no tampão de amostra exceto a adição de agente redutor e desnaturação por calor. SDS-PAGE segundo Laemmli et al. (1970) foi desenvolvida a 4°C em gel de 7.5% de poliacrilamida com 1 mg.mL⁻¹ de gelatina que foi copolimerizada ao gel. Após a eletroforese o gel foi lavado por 30 minutos com solução de Triton X-100 2,5% (m/v) seguido de lavagem com Tris 50 mM pH 8,0 por mais 30 minutos e uma lavagem com H₂O destilada por mais 30 minutos. Após lavagem o gel foi incubado por 30 minutos a 50°C em tampão de substrato (Tris 50mM; CaCl₂ 2 mM e pH 8,0). O gel foi corado com solução de Azul de Comassie R-250 e as bandas com atividade proteolítica aparecem como bandas claras em fundo azul.

3.1.6 Efeito de inibidores de protease na atividade queratinolítica

Uma alíquota de 900 µL do sobrenadante de cultivo dos meios CP e CTrip foram incubados por uma hora a 20 °C com os seguintes inibidores a uma concentração final de: 50 mM de EDTA, e 1 mM de Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Após uma hora de incubação as soluções de sobrenadante-inibidor foram adicionadas ao substrato e a atividade proteolítica determinada juntamente com os brancos para cada tratamento em triplicata. O controle utilizado foi a adição de H₂O ao invés dos inibidores à enzima. A atividade do controle foi considerada 100% e a inibição como atividade relativa ao controle. Como a inibição para metaloproteases pode ser reversível, a mesma concentração de EDTA foi adicionada ao tampão de reação com o substrato.

3.1.7 Quantificação de proteína

Para determinação da concentração de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951) utilizando BSA como padrão.

3.1.8 Doseamento de glicose

A quantificação de glicose no sobrenadante dos meios contendo o carboidrato foi determinada segundo modificação do método descrito por Somogyi (1944) e Nelson (1952), utilizando D-glicose como padrão.

3.1.9 Análise Microscópica (Microscopia Eletrônica de Varredura)

O microrganismo *Chryseobacterium* sp. Kr6 (Genbank AY157745) foi pré-inoculado em 100 mL meio CP ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ NaCl, $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ K_2HPO_4 , $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ KH_2PO_4 e 10 g.L^{-1} de penas de frango, pH 7,5) a 150 RPM e 30°C e após 20 horas de cultivo foi inoculado em meio CP sob idênticas condições ao pré-inóculo. Foram retiradas, por filtração, alíquotas das penas em suspensão em diferentes intervalos de tempo (0; 8; 18 e 36 horas) para análise microscópica. As amostras foram pré-fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), paraformaldeído 2,5% (v/v) em tampão cacodilato 50 mM pH 7 por 24 horas. Em seguida as amostras foram equilibradas no mesmo tampão e pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) por 1 hora. Após a fixação as amostras foram desidratadas com soluções com concentrações crescentes de acetona (30,50, 70, 90 e 100%) (v/v) e submetidas a estufa a 40°C até completa evaporação da acetona. As amostras foram metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV DSM940-A).

3.2 Purificação e Caracterização de uma Queratinase de *Chryseobacterium* sp. Kr6

3.2.1 Produção da Enzima

O microrganismo *Chryseobacterium* sp. Kr6 (Genbank AY157745) foi pré-inoculado em 100 mL meio CP (NaCl $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e de penas de frango 10 g.L^{-1} , pH 7,5) a 150 RPM e 30°C . Antes de utilizadas as penas foram submetidas a lavagem com água destilada e secas em estufa a 37°C . Os meios foram esterilizados por autoclave. Para

produção da enzima inocularam-se 10 mL do inóculo em 1L de meio CP, e o cultivo foi realizado nas mesmas condições descritas acima por 20 horas.

3.2.2 Ensaios de Atividade Enzimática

3.2.2.1 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada utilizando caseína Hammerstein (Merck, Darmstadt, Alemanha) semelhante ao descrito no item 3.1.3.

3.2.2.2 Atividade Queratinolítica;

O substrato utilizado para determinação da atividade queratinolítica foi o substrato insolúvel keratin azure, semelhante ao descrito no item 3.1.4.

3.2.3 Purificação

Após 20 horas de cultivo, o meio foi centrifugado a 12000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado através de membrana com poro de 0,22 µm de poro (Millipore corp., Bedford) para remoção completa das células. O filtrado foi utilizado como fonte de enzima crua. A atividade durante a purificação foi monitorada utilizando caseína como substrato e a atividade queratinolítica em cada etapa de purificação foi confirmada utilizando keratin azure (Sigma-Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, France) como substrato. Os procedimentos de purificação quando possível foram realizados a 8°C.

3.2.3.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica

O filtrado foi ajustado a uma concentração de 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 7,2 e em seguida transferido a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ a uma coluna “Phenyl Sepharose CL 4B” (2,4 x 8,0 cm) previamente equilibrada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,2 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M. A coluna foi eluída com mesmo tampão a um fluxo de 1 mL.min⁻¹, seguido de 250 mL de um gradiente de 1 a 0M de

(NH₄)₂SO₄. Coletaram-se frações de 5 mL e a atividade foi monitorada utilizando caseína como substrato. As frações com atividade foram agrupadas, dialisadas “overnight” a 4°C contra tampão fosfato 10 mM e pH 7,2 e liofilizadas.

3.2.3.2 Cromatografia em Gel Filtração

As frações liofilizadas foram ressuspensas em tampão fosfato 10 mM pH 7,2, aplicadas a uma coluna gel filtração “Superose 12HRTM” (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) utilizando sistema HPLC-ÄKTA-Purifier (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) e eluídas com tampão fosfato 50mM e NaCl 50 mM a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. Coletaram-se frações de 500 µL e a atividade foi monitorada utilizando caseína como substrato. A coluna foi calibrada utilizando padrões de peso molecular: BSA (66 KDa), álcool desidrogenase (150 KDa), β-Amilase (200 KDa), Anidrase Carbônica (29 KDa) e Citocromo C (12,4 KDa). As frações após gel filtração foram utilizadas como enzima pura para caracterização.

3.2.4 Técnicas Eletroforéticas

3.2.4.1 Determinação de Peso Molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em gel de separação 12% e gel de empilhamento 4% de acrilamida/bisacrilamida segundo descrito por Laemmli (1970). Utilizaram-se padrões de peso molecular de 10000 a 170000 Da (Fermentas Inc. Canadá), e o método de coloração com prata (SWITZER; MERRIL; SHIFRIN; 1979). As amostras foram dessalinizadas antes da eletroforese contra água destilada quando necessário e concentradas por liofilização.

3.2.4.2 Zimografia

A zimografia foi desenvolvida em gel de poliacrilamida contendo SDS e com 1mg.mL⁻¹ de gelatina copolimerizada segundo descrito no item 3.1.5.

3.2.5 Quantificação de proteína

Para determinação da concentração de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951) utilizando BSA como padrão. A concentração de proteína foi também estimada assumindo que a absorbância de uma solução a 1% a 280 nm é igual de 10.

3.2.6 Caracterização

3.2.6.1 Determinação de pH ótimo

Para determinação do pH ótimo, utilizou-se a faixa de pH entre 6 a 10 com intervalos de 0,5 unidades. Tampão fosfato de sódio foi utilizado para pH de 5,5 a 7,5, Tris-HCl para pH de 8 a 9 e tampão carbonato-bicarbonato para pH de 9,5 a 10 em uma concentração final de 80 mM. Caseína foi dissolvida a uma concentração de 2,5% (m/v) em H₂O e 100μL desta solução foi adicionada a 400μL de cada tampão. As diferentes soluções tampão-substrato (500μL) foram incubadas com 150μL de solução de enzima e determinada atividade proteolítica. O ensaio e o branco foram realizados em triplicata para cada valor de pH. Determinaram-se as atividades relativas considerando-se como 100% o pH com maior atividade.

3.2.6.2 Determinação de Temperatura Ótima

A temperatura ótima de atividade proteolítica foi determinada em intervalos de 10°C nas temperaturas de 30 a 100°C. A mistura de reação, exceto a enzima, foi previamente incubada na temperatura requerida. O ensaio e o branco foram realizados em triplicata para cada temperatura. Determinaram-se as atividades relativas considerando-se 100% a temperatura onde houve a maior atividade.

3.2.6.3 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica foi determinada nas temperaturas de 37, 50 e 80°C em diferentes intervalos de tempo (2; 10; 30; 60; 150 e 240 min). Uma alíquota de 5 mL da enzima foi incubada em Banho Maria nas temperaturas apropriadas. Alíquotas foram retiradas nos diferentes intervalos de tempo e resfriadas em gelo. Os ensaios de atividade proteolítica foram realizados junto com os brancos para cada fração em triplicata. A fração que não sofreu tratamento térmico foi considerada como 100% de atividade.

3.2.6.4 Efeito de Interferentes na atividade proteolítica

Uma alíquota de 900 µL da enzima purificada foi incubada durante uma hora a 20 °C com os seguintes inibidores para uma concentração final de: 100 µM de Iodoacetamida; 10 mM e 50 mM de EDTA, 10 mM e 50 mM de EGTA; 1 mM de pepstatina; 1 mM de Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 10 mM de 1,10 orto-fenantrolina. 2 mM dos íons (CaCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 , AlCl_3 , CuCl_2 e CdCl_2), 5% de DMSO e SDS e 5 mM de DTT e mecaptopetanol. Após uma hora de incubação as soluções de enzima-interferente foram adicionadas ao substrato e a atividade proteolítica determinada juntamente com os brancos para cada tratamento em triplicata. O controle utilizado foi adição de H_2O ao invés dos interferentes à enzima. A atividade do controle foi considerada 100% e a inibição ou estímulo determinados como atividade relativa ao controle. Como a inibição para metaloproteases pode ser reversível, a mesma concentração de inibidor (EDTA, EGTA e 1,10 orto-fenantrolina) foi adicionada ao tampão de reação juntamente com o substrato.

3.2.6.5 Determinação do metal

A proteína purificada foi exaustivamente dialisada contra água destilada por 24 horas a uma temperatura de 4°C. Após diálise a presença do metal foi determinado em Espectrômetro Varian SpectrAA-220 com atomizador de tungstênio e lâmpada de cátodo oco. As medidas foram baseadas no comprimento de onda máximo de absorção de 324,8 e 213,9 nm para cobre e zinco

respectivamente. O branco analítico foi preparado dialisando-se, juntamente com a enzima, o tampão em que a enzima se encontrava.

3.2.7 Identificação da Proteína

Após SDS-PAGE a banda com a proteína foi recortada do gel submetida a digestão trípica *in gel* de acordo com modificação do método descrito por VIRGINIA TECH CENTER FOR GENOMICS. Os peptídeos foram extraídos, concentrados e submetidos à espectrometria de massas.

3.2.7.1 Ionização a Lazer com MS com TOF de Alta Resolução (Maldi-Tof/MS)

A análise da amostra obtida por digestão trípica foi preparada usando o método “dried droplet”. A amostra foi acidificada pela adição de água/TFA (100:0,1) e mantida a temperatura ambiente por alguns minutos até redução de volume por evaporação. A matriz, ácido α -Ciano-4-hidroxicinâmico, foi preparada a 1% (m/v) em H₂O/Acetonitrila 1/1 (v/v) contendo TFA 0,1% e adicionada a amostra a temperatura ambiente. A análise foi determinada em MALDI-TOF (Waters - Micromass, UK) espectrômetro de massas. A análise foi exclusivamente de íons carregados positivamente por reflexão. Para avaliação dos dados, incluindo identificação dos peptídeos utilizou-se Mascot Wizard (Matrix Science, London, UK) software.

3.2.7.2 Espectrometria de Massas em Tandem com Ionização por Electrospray (ESI-MS/MS)

A análise ESI-MS/MS foi desenvolvida em equipamento Q-TOF (Micromass) acoplado ao sistema cromatográfico CapLC®. Os peptídeos resultantes de digestão trípica foram dessalinizados usando uma coluna C-18 Opti-Pak (Waters). Os peptídeos foram eluídos utilizando gradiente água/acetonitrila 0,1% de ácido fórmico e separados em uma coluna capilar C-18. Os peptídeos multiplamente carregados foram submetidos a MS/MS. Os espectros MS/MS foram processados usando o programa MaxEnt3 e manualmente usando o programa PepSeq

(Micromass). As condições foram: Fluxo da cromatografia de 200 nL.min⁻¹, ionização com voltagem capilar de 3 kV, fonte a 80°C e voltagem de cone de 40V.

3.2.8 Hidrólise de Substratos Protéicos Insolúveis

A atividade proteolítica da enzima purificada foi testada também com os substratos insolúveis keratin azure e penas de frango. O ensaio de degradação de keratin azure foi desenvolvido segundo item 3.2.2.2. Para verificar a atividade de hidrólise sobre penas nativas a enzima purificada foi incubada com 0,5% (m/v) de penas moídas em tampão Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM e pH 8,5 em um volume final de 2 mL e outro tratamento adicionando 1% (v/v) de β-mercaptoetanol a reação. A reação foi conduzida a 50°C durante 24 horas e interrompida adicionando-se 500 µL de uma solução de TCA 50% (m/v), centrifugado a 13000 g. Paralelamente um controle foi preparado da mesma maneira adicionando-se TCA 50% antes da enzima. Os controle foram preparados da mesma maneira exceto pela adição de água ao invés da enzima. A atividade foi determinada pela quantificação de peptídeos e aminoácidos solúveis liberados durante a reação.

3.2.8.1 Método Colorimétrico para Quantificação e Aminoácidos Solúveis

A quantificação dos aminoácidos solúveis foi determinada adicionando-se 500 µL de tampão citrato 100 mM e pH 5, 200 µL do reagente de ninhidrina 5% (m/v) e 1 mL de solução de KCN 0,2 mM a 1 mL do sobrenadante descrito acima. A reação foi conduzida a 100°C por 20 minutos seguida de resfriamento e adição de 1 mL de etanol 60% (v/v). Fez-se a leitura a 570 nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640) e utilizou-se glicina como padrão.

3.2.8.2 Análise de Aminoácidos Solúveis por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados por HPLC de fase reversa em equipamento Akta Purifier[®] (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). A coluna utilizada foi a

Spherisorb ODS-2 C18[®] e eluída em um gradiente de metanol e tampão fosfato pH 7,5 (Acetato de Sódio 50 mM; Fosfato dissódico 50 mM; 1,5 mL de ácido acético; 20 mL tetraidrofurano e 20 mL metanol) a um fluxo de 800 µL/min. Durante o gradiente a proporção de metanol aumentou de 20 a 28% entre 0 e 5 minutos, 28 a 58% entre 5 a 35 minutos, 58 a 75% entre 35 e 40 minutos, 75 a 95% entre 40 e 56 minutos, 95 a 96% entre 56 a 60 minutos e 96 a 100% entre 60 e 61 minutos. A eluição foi monitorada por detector de fluorescência (Shimadzu RF-350) operando com um comprimento de onda de excitação e emissão de 250 nm e 388 nm respectivamente. A amostra foi injetada após 2 minutos de incubação de 30µL de o-ftaldeído (OPA) com 10 µL da amostra.

3.3 Identificação da Sequência do gene da Queratinase de *Chryseobacterium* sp. Kr6

3.3.1 Extração de DNA Total

A extração de DNA total de *Chryseobacterium* sp. Kr6 foi realizada utilizando o kit “DNA Extration Kit” (Fermentas Inc. Canadá) seguindo instruções do fabricante a partir de um cultivo da bactéria em meio LB [triptona 1% (m/v), cloreto de sódio 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v)]. O DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e mantendo a -20 °C por 2 horas. Após centrifugação a 13000xg por 5 minutos o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v), recentrifugado, secado a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl e EDTA). Adicionou-se 15 µg de RNase e a solução foi incubada por 1 hora a 37°C.

A concentração e a qualidade da extração foi monitorada em espectrofotômetro (Beckman DU-640) a 260 e 280 nm. Considerou-se 1 unidade de DO_{260} como $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de DNA e $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,72$ como DNA com bom grau de pureza (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A integridade do DNA foi monitorada através de gel de agarose 1,2% (m/v) em TBE (Tris 400mM; Ácido Bórico 400 mM; EDTA 10 mM) corado com o corante fluorescente Brometo de Etidium ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e observado em transiluminador com lâmpada de UV (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden).

3.3.2 Desenho dos Iniciadores Degenerados e Amplificação de DNA por PCR

Baseando-se na sequência de dois peptídeos da queratinase (KHSFENFIEGK e IDVEVEQGGIK) desenharam-se os seguintes iniciadores degenerados:

1. 5' -CAYTGNTTYGARAAYTTYATYGARGG-3'
2. 5' -CCYTCRATRAARTTYTCRAANCARTG-3'
3. 5' -GARGTNGARCARGGNGGNATNAAR-3'
4. 5' -YTTTTRATNCCNCCYTGYTCNACYTC-3'

As reações de PCR foram realizadas para pares de iniciadores em volume final de 25 µL contendo KCl 50 mM; Tris-HCl 20 mM e pH 8,4; MgCl₂ 1,5 mM; 50 ng de DNA; 1 mM de cada iniciador; dNTP 100 mM e 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase. As amplificações foram conduzidas em GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Norwalk, CT, EUA) com desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com 6 minutos de extensão. O resultado da reação foi monitorado através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) em TE, e o tamanho e concentração dos fragmentos amplificados foram determinados e documentados através do programa KodakTM Digital Science 1D.

3.3.3 Clonagem

O fragmento amplificado pela reação de PCR foi primeiramente extraído do gel de agarose 1,2% (m/v) através do kit “GFXTM DNA and Gel Band Purification” (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) e clonado utilizando o kit “InsT/AcloneTM PCr Product Cloning Kit” (Fermentas Inc. Canadá) segundo recomendações dos fabricantes. A relação inserto e vetor utilizada foi de 3:1.

3.3.4 Preparo de Células de *E. coli* Competentes por Cloreto de Rubídio

A linhagem foi multiplicada em meio LB até DO a 600 nm atingir valor entre 0,45 e 0,55. O cultivo foi transferido para dois tubos, mantidos em gelo por 10 minutos e centrifugado a 3000xg por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 15 mL de solução RF1 (Acetato de

Potássio 30 mM; Cloreto de Rubídio 100 mM; Cloreto de Manganês 50 mM e glicerol 15%) e incubadas em gelo por 15 minutos. A suspensão celular foi novamente centrifugada a 3000xg por 10 minutos. A massa celular foi ressuspensa em solução RF2 (MOPS 10 mM; Cloreto de Rubídio 10 mM; Cloreto de Cálcio 75 mM e glicerol 15%) e incubada em gelo por 30 minutos. Aliquotas de 100 μ L de células competentes foram transferidas a tubos de 1,5 mL e armazenadas a temperatura de -70°C.

3.3.5 Transformação de *E. coli* por Choque Térmico

Aliquotas 100 μ L contendo células competentes foram transformadas com o vetor pTZ57R contendo inserto da reação de PCR. As células congeladas foram mantidas no gelo por 5 minutos as quais 5 μ L do vetor/fragmento foi adicionado. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos e após submetidas a choque térmico a 42°C por 50 segundos, retornando imediatamente ao gelo por mais 2 minutos. Adicionaram-se às células transformantes 950 μ L de meio LB e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Após incubação as células foram inoculadas com alça de Drigalski em placas com meio LB sólido seletivo (IPTG 0,5 mM; X-Gal 80 μ g.mL⁻¹ e ampicilina 100 μ g.mL⁻¹). As placas foram incubadas entre 16 e 24 horas até o surgimento de colônias isoladas. As colônias transformadas com inserto/vetor (brancas) foram multiplicadas em meio LB líquido com 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina para isolamento plasmidial.

3.3.6 Extração de DNA Plasmidial

As colônias transformadas foram crescidas em meio LB líquido com ampicilina e utilizadas para extração do DNA Plasmidial. A extração foi realizada utilizando Kit "Concert Rapid Plasmid Purification Systems" (GibcoBRL, Life Technologies) conforme recomendações do fabricante.

3.3.7 Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit ABI Prism[®] Big Dye[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e as condições de da reação foram estabelecidas de acordo com recomendações do fabricante. Os nucleotídeos marcados incorporados foram precipitados, adicionando-se 30 μ L de isopropanol e 10 μ L de H₂O destilada estéril aos 10 μ L da reação de amplificação. A reação foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugou-se a 1000 g por 20 minutos e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) e centrifugado por 5 minutos a 10000 g. O etanol foi aspirado e evaporado e o precipitado foi ressuspendido em tampão Dextran loading solution (Promega) e utilizado para sequenciamento em ABI Prism 3100[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A sequência foi processada para retirar contaminação com vetor através do programa Vec Screen e comparadas com banco de dados GenBank utilizando os programas BLASTn e BLASTx (ALTSCHUL et al, 1997).

3.3.8 Extração de RNA Total

A bactéria foi inoculada em meio CP (0.5g.L⁻¹ NaCl, 0.3 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.4 g.L⁻¹ KH₂PO₄ e penas 10 g.L⁻¹) e cultivada por 18 horas a 30 °C e 150 RPM. Após este período o meio foi filtrado para remoção de sólidos em suspensão. As células foram coletadas pipetando-se 10 mL da cultura bacteriana em tubos contendo 1,25 mL de solução de fenol saturado 5%(m/v) e centrifugadas a 6800xg a 4°C. As células foram lisadas ressuspendendo-se o pellet em 800 μ L de TE pH 8 contendo 400 μ g de lisozima. Adicionou-se 80 μ L de solução de SDS 10% (m/v) e a amostra foi incubada a 64°C por 2 minutos. Após incubação, 80 μ L de Acetato de Sódio 1M pH 5,5 foi adicionado. Adicionou-se igual volume de fenol saturado e os tubos foram incubados a 64°C por 6 minutos, homogeneizando a cada 40 segundos. Os tubos foram resfriados em gelo e centrifugados a 20000xg por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, adicionando-se igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v:v) com posterior centrifugação a 20000xg por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi separada e adicionou-se Acetato de Sódio 300 mM pH 5,5, EDTA 1mM e 2,5 volumes de etanol absoluto “overnight” a -20°C. Os

pellets foram lavados com etanol 80% (v/v),. Secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 100 μ L de H₂O tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

As amostras de RNA total foram tratadas com 10 U de DNase I (Boehringer Mannheim), 40 U de inibidor de RNase (Stratagene), em Tris-HCL 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM e MgCl₂ 20 mM, incubando-se por 1,5 horas a 37°C. O RNA foi extraído uma vez com fenol saturado, seguido de uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v) e duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). O sobrenadante foi precipitado com acetato de sódio 300 mM pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto. Os pellets foram lavados com 1 mL de etanol 80% (v/v) secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 50 μ L de H₂O tratada com DEPC.

A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260 nm considerando-se 1 DO₂₆₀ igual a 50 μ g.mL⁻¹ de RNA. (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A qualidade do RNA foi determinada através das razões das absorbâncias A₂₆₀/A₂₈₀. A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e corados com brometo de etidium (50 μ g/mL⁻¹).

3.3.9 Síntese da Primeira Fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o kit “Superscript™ Preamplification system for first strand cDNA synthesis” (Gibco-BRL), conforme instruções do fabricante. Partiu-se de 2 μ g de RNA total extraído segundo item 3.3.3, 100 ng dos hexaoligonucleotídeos aleatórios e H₂O tratada com DEPC para um volume final de 12 μ L. A solução foi aquecida a 70°C por 10 minutos e então resfriada em gelo por 1 minuto. Adicionou-se então, tampão para PCR, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 500 μ M e DTT 10 mM. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 25°C, 50 minutos a 42 °C e, em seguida, as enzimas foram inativadas a 70°C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 2 U de RNase H às reações incubando-se a 37°C por 20 minutos para degradação das fitas de RNA dos híbridos RNA:cDNA formados.

3.3.10 Amplificação do cDNA

Para verificação da possível expressão do gene da queratinase em estudo utilizou-se o cDNA sintetizado para amplificação com os iniciadores degenerados testados na amplificação do DNA. As condições de amplificação foram as mesmas descritas no ítem 3.3.3 partindo de 25 ng de cDNA.

3.4 Análise dos Resultados

As diferenças entre as médias nos experimentos foram realizadas de acordo com o método de Tuckey, utilizando o programa SAS versão 8.2, módulo “proc glm”.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito das Condições Nutricionais no Crescimento e Atividade Proteolítica

4.1.1 Crescimento e Atividade Enzimática

Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram empregadas para avaliar o crescimento (Figura 4.1) e a atividade de proteases extracelulares (Figura 4.2) da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 durante 44 horas de cultivo. No meio com glicose como única fonte de carbono as células mantiveram-se estáveis, com crescimento lento durante o tempo de monitoramento. Com caseína (Ccas), houve um crescimento inicial nas primeiras horas, mas logo a bactéria entrou em fase estacionária. Quando utilizado o meio com penas (CP) e penas mais glicose (CPG) não houve diferença de crescimento com um máximo de aproximadamente 10^{10} UFC.mL⁻¹, entrando na fase estacionária a partir das 20 horas de cultivo. Em meio com penas suplementado com NH₄Cl como fonte extra de nitrogênio o crescimento foi um pouco mais lento que CP e CPG e com triptona (Ctrip) a fase lag foi menor em relação aos outros, porém se assemelhando à CP e CPG após 10 horas de crescimento. O pH dos meios crescendo em queratina ao final das 44 horas chegou a 8,3.

Quando monitorada a atividade enzimática (Figura 4.2) nos meios Ccas e Cgli não foi detectada atividade proteolítica durante o monitoramento. No meio Ctrip nas primeiras 5 horas de cultivo já pôde ser medida atividade proteolítica chegando a um máximo no final da fase exponencial de aproximadamente 250 U.mL⁻¹. Em CP, CPG e CPN o máximo também ocorreu no final da fase exponencial (20 horas) com uma maior atividade sempre na ordem CP>CPG>CPN, chegando a mais de 400 U.mL⁻¹ em CP. Estes resultados se confirmam através da solubilização de proteínas no meio (Figura 4.3) onde a solubilização foi maior e chegou a 946, 626 e 520 µg.mL⁻¹ para os meios CP, CPG e CPN respectivamente, no final das 44 horas de cultivo. Quando analisada a concentração de glicose residual (Figura 4.4) nos meio de cultivo em que esta foi adicionada observou-se que no meio com penas suplementado com glicose (CPG) houve um consumo de cerca de 50% durante o cultivo de 44 horas, enquanto que praticamente não houve consumo muito baixo no meio com glicose como fonte de carbono.

Figura 4.1 – Curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em diferentes meios de cultivo. (●) Triptona; (□) CPG; (◆) CP; (Δ) CPN; (x) Ccas e (▲) e CGLi a 30°C, 150 RPM e pH inicial 7.

Figura 4.2 – Atividade Proteolítica durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em diferentes meios de cultivo. (●) Triptona; (□) CPG; (◆) CP e (Δ) CPN; a 30°C, 150 RPM e pH inicial de 7.

Figura 4.3 – Liberação de proteína solúvel para o meio durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 nos meios: (♦) CP; (□) CPG e CPN(▲) cultivado a 30°C, 150 RPM e pH inicial 7.

Figura 4.4 – Concentração de glicose residual no meio de cultivo: (□) CPG e (●) Cgli durante curva de crescimento de *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivado a 30°C, 150 RPM e pH inicial 7.

Quando monitorada a atividade queratinolítica com o substrato keratin azure após 20 horas de cultivo, os sobrenadantes dos meios CP, CPG, CPN e Ctrip mostraram atividade queratinolítica de cerca de 25 U.mL^{-1} não apresentando diferença significativa entre eles. A zimografia (Figura 4.5) dos sobrenadantes de cultivo dos meios Ctrip, CP, CPG e CPN mostrou várias bandas de atividade proteolítica e com diferentes perfis destas, principalmente entre o meio Ctrip e os demais.

4.1.2 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

A inibição da atividade proteolítica total no sobrenadante de cultivo em CP com os inibidores EDTA e PMSF foi de 90 e 10% respectivamente. Quando testado o mesmo efeito no sobrenadante de cultivo em Ctrip a inibição foi de 30% para ambos inibidores.

4.1.3 Análise Microscópica

A evolução da colonização bacteriana, durante o cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 (Figura 4.6), foi avaliada também através de análise microscópicas. Primeiramente visualizou-se a integridade das fibras de queratina sem inoculação. Após as primeiras 8 horas de cultivo houve uma alteração na estrutura das fibras mas com visualização de poucas células. Após 18 horas o número de células presentes aumentou consideravelmente com pontos de degradação e presença apenas da ráquis da pena no meio. Com 36 horas visualiza-se a ráquis bastante degradada. Na figura 4.7, em outra imagem, após 18 horas, visualiza-se intensa colonização com formação de uma espécie de filme de células sobre a superfície da ráquis da pena.

4.2 Purificação e Caracterização da Queratinase de *Chryseobacterium* sp. Kr6

4.2.1 Purificação

Após cultivo em meio CP, o sobrenadante foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica. Houve resolução em três picos, HIC1, HIC2 e HIC3 (Figura 4.8), com

Figura 4.5 – Zimografia das proteases secretadas pela linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivada nos meios: **A** – Ctrip (1,2,5 e 6); **B** – CP (3,4,5 e 6); **C** – CPG (3,4,5 e 6) e **D** – CPN (3,4,5 e 6) após 20 horas de cultivo.

Figura 4.6 - Micrografia das penas em suspensão após cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em meio CP em diferentes tempos de coleta: (A)- 0; (B)- 8; (C)- 18 e (D)- 36 horas. Aumento de 2000 vezes. O tamanho das células bacterianas é de 1 μm . Q – fibra de queratina, C – célula de *Chryseobacterium* sp. Kr6 e R – Ráquis da pena.

C →

C →

Figura 4.7 - Micrografia das penas em suspensão após cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 de 18 horas em meio CP. (**A**)- aumento de 1000 vezes e (**B**)- aumento de 2000 vezes. O tamanho das células bacterianas é de 1 μm . **Q** – fibra de queratina, **C** – célula de *Chryseobacterium* sp. Kr6 e **R** – Ráquis da pena

Figura 4.8 - Perfil de eluição em cromatografia de Interação hidrofóbica em coluna Phenyl-Sepharose das proteases de *Chryseobacterium* sp. A coluna foi eluída com tampão fosfato gradiente de 1 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ (- -) e monitorada absorbância a 280 nm (○) e atividade proteolítica (●).

Figura 4.9 - Perfil de eluição da cromatografia em Gel-filtração (Superose 12 HRTM) do pico HIC1. A coluna foi eluída com tampão fosfato 100 mM e NaCl 50 mM e as frações monitoradas para absorbância a 280 nm (—) e atividade (- -).

atividade proteolítica, que foram eluídos nas concentrações aproximadas de 0,5 M; 0,17 M e 0 M de sulfato de amônio respectivamente durante o gradiente. As frações correspondentes ao pico HIC1 que foram concentradas e aplicadas a seguir na coluna de gel filtração, resultaram em um pico (Q1) com atividade proteolítica (Figura 4.9). Q1 foi submetida a SDS-PAGE e mostrou-se como uma única banda homogênea e a atividade proteolítica foi visualizada pela zimografia (Figura 4.10). As frações deste pico foram utilizadas para caracterização. Nota-se que a atividade proteolítica total no extrato cru provém de mais de uma protease, portanto cálculos de enriquecimento da enzima tornam-se um tanto ambíguos. O rendimento final de purificação foi de 1,18%, no entanto houve um aumento na atividade específica do extrato cru para a enzima purificada de 168 para 2406 U.mg⁻¹ (Tabela 4.1), com um fator de purificação de 14,26 vezes. Quando determinada a atividade queratinolítica com keratin azure como substrato a atividade específica foi de 967 U.mg⁻¹.

4.2.2 Caracterização da Queratinase

4.2.2.1 Determinação do Peso Molecular

O peso molecular relativo da protease Q1 foi estimado comparando-se a mobilidade eletroforética com os padrões de peso molecular conhecidos, através de SDS-PAGE (Figura 4.10). A enzima apresentou-se como uma banda monomérica de aproximadamente 64 KDa.

4.2.2.2 Efeitos da Temperatura e pH na atividade e Estabilidade Térmica da Protease

A enzima apresentou-se ativa numa variação de temperatura (30 a 60°C) e pH (7,5 a 9,5) com temperatura e pH ótimos de 50°C e 8,5 respectivamente (Figura 4.11 e 4.12). A enzima manteve-se estável a 37°C por mais de 3 horas com mais de 80% da atividade inicial. A 50°C, após 3 horas 50% da atividade ainda foi detectada, enquanto que a 80°C a enzima foi completamente inativada nos primeiros minutos de incubação (Figura 4.13).

Figura 4.10 - SDS-PAGE da queratinase Q1 de *Chryseobacterium* sp. Kr6. **A** - Marcador de Peso Molecular (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 e 10 KDa); **B** - Q1 purificada e **C** - Zimografia de Q1 purificada.

* Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade necessária de enzima necessária para liberar 1 μmol de tirosina por minuto, utilizando caseína como substrato.

Figura 4.11 - Determinação do pH ótimo para protease Q1 (●) após purificação. Atividade determinada a 50°C utilizando caseína como substrato.

Figura 4.12 - Determinação de temperatura ótima para protease Q1 (●) após purificação. Atividade determinada em pH 8,5 utilizando caseína como substrato.

Figura 4.13 - Determinação de Estabilidade Térmica da queratinase Q1 nas temperaturas de 37°C (●), 50°C (■) e 80°C (▲) após purificação. Atividade determinada utilizando caseína como substrato.

4.2.2.3 Efeito de Interferentes

O efeito de vários inibidores e interferentes na atividade proteolítica da queratinase Q1 foi examinado e está listado na tabela 4.2. O inibidor de serina protease (PMSF) e cisteína protease (Iodoacetamida) exerceram pouco efeito sobre a atividade enzimática com 5 e 6% de inibição respectivamente. Os quelantes de metal (EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina) exerceram efeito inibitório sobre a enzima, sendo que com 1,10 orto-fenantrolina houve inibição total. EGTA e EDTA tiveram diferentes efeitos inibitórios sobre a atividade. EDTA na concentração de 10 mM inibiu somente 35% da atividade, enquanto que a 50 mM a inibição foi de 81%. EGTA nas concentrações de 10 e 50 mM inibiu 71 e 77% da atividade. Na presença dos íons Ca^{++} , Cd^{++} e Mg^{++} a atividade relativa foi de 355, 123 e 114% respectivamente. No entanto, com Al^{++} , Zn^{++} e Cu^{++} a atividade relativa foi de 72, 64 e 24% respectivamente. A queratinase mostrou-se instável na presença de agentes redutores. Não foi detectada atividade com mercaptoetanol e, na presença DTT a atividade residual foi de 23%. O solvente orgânico DMSO causou um pequeno aumento na atividade.

4.2.2.4 Determinação do Metal

A confirmação da presença de Zn na proteína foi realizada através de Espectrometria Atômica. Através da análise qualitativa do provável metal ligado ao sítio catalítico da enzima, baseando-se no comprimento de onda máximo de absorção para cobre e zinco, a presença de Zn^{++} foi cerca de 17 vezes maior que o branco analítico, enquanto que para cobre o aumento foi de apenas 2 vezes.

4.2.2.5 Hidrólise de Substratos Insolúveis

A atividade hidrolítica sobre substratos insolúveis foi verificada com os substratos keratin azure e penas nativas. Q1 foi capaz de hidrolisar o substrato keratin azure com uma atividade específica de $967 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ conforme citado no item 4.2.1. Quando testada a capacidade de hidrólise de queratina em penas nativas, tanto o teste colorimétrico com ninhidrina quanto as análises em HPLC, não detectaram a liberação de peptídeos e aminoácidos solúveis da reação quando comparados aos controles.

Tabela 4.2 - Influência de Inibidores, metais e compostos na atividade proteolítica de Q1.

Interferente	Concentração	P1-Atividade Residual (%)
Nenhum	-	100
EDTA	10mM	65
	50mM	19
EGTA	10mM	29
	50Mm	23
Iodoacetamida	100 μ M	95
PMSF	1mM	91
1,10-fenantrolina	10mM	0
Ca ⁺⁺	2mM	355
Mg ⁺⁺	2mM	114
Al ⁺⁺	2mM	72
Zn ⁺⁺	2mM	64
Cu ⁺⁺	2mM	24
Hg ⁺⁺	2mM	0
MeSH	5mM	0
DTT	5mM	33
DMSO	5%	111
SDS	5%	0

4.2.2.6 Identificação da queratinase

A protease purificada foi extraída do gel, hidrolisada com tripsina e os peptídeos submetidos a Espectrometria de Massas. A análise de “*finger print*” dos peptídeos resultantes de digestão triptica através da espectrometria de massas não mostrou homologia significativa entre a queratinase Q1 e outras proteases dificultando a identificação da proteína. Através de Ionização por Electrospray foi gerada a sequência de 23 peptídeos (Tabela 4.3). As sequências não apresentaram similaridade significativa para identificação da proteína em pesquisas nos diversos bancos de dados de proteínas, mas algumas sequências internas de alguns peptídeos mostraram similaridade a regiões conservadas à família das metaloproteases M14 (Figura 4.14) tanto para o sítio de ligação ao metal (peptídeo 8 - KHSFENFIEGK) como para sítio ativo (peptídeo 16 - RRIDVEVEQGGIKL) (BARRETT; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). Outra observação na análise das sequências internas dos peptídeos foi a presença da sequência ácido aspártico-serina (DS*) encontrada no peptídeo 5 (KGSSADS*PNSEEK). Esta sequência tem sido referida como sequência consenso para orto-glicosilações em proteínas do gênero *Chryseobacterium meningosepticum* (PLUMMER; TARENTINO; HAUER, 1995).

4.3 Identificação do gene da Queratinase de *Chryseobacterium* sp. Kr6

4.3.1 Amplificação do DNA com os Iniciadores Degenerados

O DNA extraído foi submetido a PCR utilizando os iniciadores degenerados, desenhados com base na sequência de dois peptídeos resultantes da digestão triptica sequenciados. A figura 4.15 mostra o fragmento amplificado pela PCR. A amplificação, nas condições da reação testadas, foi positiva somente quando utilizados os iniciadores 1 e 3 e o tamanho do fragmento foi de aproximadamente 470 pares de base (pb).

Tabela 4.3 – Tabela da sequência dos peptídeos resultantes de digestão triptica da queratinase Q1

Peptídeos Obtidos por ESI - MS/MS	
1- VVTVNDKIIPK	13- EAAMRGDVPGLVK
2- QATNKPVVGVGR	14- KGSKVAVLTGNGLKD
3- EVTESCKSSQQ	15- RVGSDLTSLVPNIKT
4- THLLQDKIIVR	16- RRIDVEVEQGGIKL
5- KGSSADSPNSEEK	17- RSLQAAGLEVTLIKD
6- AEDFPFVLGQGR	18- RRLSELDNIVGVKD
7- LSLKWLAFAMAR	19- DIIETRPNGNTVSARIHR
8- KHSFENFIEGK	20- RAALEAVCYQTRDLLEAMHKD
9- RALSEAERIAAALKS	21- TVPLFQDAVN FVGKTVANGGK
10- KGLTGKLAEEVLGRA	22- KEVNALMALFMQALDLEVK
11- QKLSDLEPQER	23- NAATGDLFSAQVTRGD AEALR
12- RKMVLELLVQLNRQ	

				Família	Organismo
	↓ ↓		↓ *		
	KHSFENFIEGK - - LVQLNRQ - - NTVSARIHR - - RRIDVEVEQGG				- <i>Chryseobacterium</i> sp. Kr6
145	IHSGEIDGKDA - - NLNLNRD - - PDLYIDIHV - - KGIDYRVEQSP			M14X	- <i>Shewanella frigidimarina</i>
111	IHPGEIPGKDA - - NLNLNRD - - PDLIVDTHD - - QGFETTLELSA			M14X	- <i>Gloeobacter violaceus</i>
186	IHSREWITHAT - - GVDLNRN - - FKAMISHS - - IKYAFSFE LRD			M14A	- <i>Mus musculus</i>

Figura 4.14 - Sequência de peptídeos resultantes de digestão triptica de Q1 de *Chryseobacterium* sp. Kr6. As sequências foram alinhadas com outras proteases pertencentes a família M14. (↓) indica o sítio obrigatório de ligação ao metal e (*) indica o resíduo obrigatório do sítio ativo.

Figura 4.15 – F... ζr6 com os diversos iniciadores degenerados. **MM:** Marcador de massa molecular (O'Gene Ruler™-1kb DNA Ladder – Fermentas Inc. – Canadá); **1:** Iniciadores 1 e 3; **2:** Iniciadores 1 e 4; **3:** Iniciadores 2 e 3; **4:** Iniciadores 2 e 4; **5:** Iniciador 1; **6:** Iniciador 2; **7:** Iniciador 3; **8:** Iniciador 4; **9:** Controle sem DNA.

4.3.2 Clonagem e Sequenciamento

O fragmento amplificado pela PCR foi extraído do gel, ligado ao vetor e clonado. Seleccionaram-se 6 clones e o DNA plasmidial extraído dos clones foi utilizado para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado para ambos lados das fitas de todos os clones, efetuando comparações entre as seqüências “forward” e “reverse” para correções necessárias. Após eliminação da seqüência pertencente ao vetor obteve-se a seguinte seqüência:

```
5´—CAATGGTTCGAGAATTTTATTGAGGGGCCTGTCCTGNCTTTGGTTGGTAAATACACTCCTGA
GATTACTGCGGGCATTGAAATACGCAATAAACAGGCTGCATTCAGATCTCTGCTGAACTCTTCA
AAACCGATCGTATGGGTAAGCCCGTGTTTGGCAATTTATGAAGCTCAAGCTTTTTTGATTCATGA
ATGAACTTTTGAAGTCTTATTTTCGATCCGTTTCAAAGCCTCCATTTTTTGTTGTAACCTCTTTT
GGAAATATCCAGCCCGGCCAGTTTTCTCAGATCTTTATTAAGACGGTCGCTTCTGAAATCATTTT
GCCCGACATCCTTGCGAATGACGGGAGAACTTCATTCAGAAATGTTTCAATGCCATCTGCCGTA
TGGTAAGAACTTTCTTTTTTCACTGATCCTGAAGATTTCAATGGCTT—3´
```

Na seqüência do inserto foi localizado somente a seqüência do iniciador 1 (negrito), sendo que a ligação do iniciador 3 pode ter sido inespecífica.

Quando analisada a seqüência, os resultados de homologia foram muito baixos, sendo que utilizando o programa BLASTn apresentou maior homologia com o DNA genômico de *Bacillus clausii* KSM-K16 com um valor de “E”(e-value) de 1,4. Quando utilizado o programa BLASTx a maior homologia foi a uma proteína GGDEF de *Clostridium beijerincki* NCIMB 8052 com um valor de “E” (e-value) de 0,75.

A seqüência foi também traduzida, utilizando quadro de leitura a partir da primeira base do iniciador um, através do programa “Translator” (<http://www.justbio.com>). A partir da seqüência do transcrito alinharam-se as seqüências dos peptídeos (Tabela 4.3) resultantes da espectrometria de massas utilizando o programa “Pairwise Sequence Alignment” (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) e não houve alinhamento dos peptídeos com a seqüência traduzida.

4.3.3 Extração de RNA e amplificação do cDNA

O RNA *Chryseobacterium* sp. Kr6 foi extraído, monitorada sua qualidade em espectrofotômetro e determinada sua integridade através de eletroforese em gel de agarose como

mostrado na figura 4.16. A partir do RNA íntegro foi sintetizada a primeira fita de cDNA e esta foi submetida a PCR, utilizando as mesmas condições descritas para o DNA genômico, com o par de iniciadores 1 e 3. O produto da reação foi a amplificação de um fragmento com mesmo tamanho do amplificado com o DNA genômico, visualizado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 4.17), e sugerindo que a sequência em estudo está sendo expressa nas condições de cultivo empregadas.

Figura 4.16 – Extração de RNA total de *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivado em meios com penas como única fonte de carbono e nitrogênio.

Figura 4.17 – Produtos de amplificação utilizando par de iniciadores degenerados 1 e 3 **MM:** Marcador de massa molecular (O'Gene RulerTM-1kb DNA Ladder – Fermentas Inc. – Canadá); **1:** DNA de *Chryseobacterium* sp. Kr6 como sequência molde; **2:** cDNA de *Chryseobacterium* sp. Kr6 como sequência molde e **3:** Controle sem fita molde.

5 DISCUSSÃO

As proteases, principalmente as extracelulares, têm um papel nutricional importante para todos os organismos, pois são responsáveis pela hidrólise de polipeptídeos a peptídeos menores e aminoácidos, viabilizando sua absorção pelas células (RAO et al., 1998). Bactérias do gênero *Chryseobacterium* têm sido associadas à atividade proteolítica (VENTER; OSTHOFF; LITTHAUER, 1999, YAMAGUCHI; YOKOE, 2000, LIJNEN et al., 2000) e a linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 teve suas proteases caracterizadas quanto à hidrólise de queratina de penas de frango (RIFFEL et al., 2003). Esta bactéria pôde crescer em meio utilizando as penas de frango, de constituição quase que exclusivamente protéica, como única fonte de energia (meio CP). Essa característica mostra adaptação à utilização de queratina como nutriente, pois a proteína foi metabolizada mesmo na presença de um açúcar (Figura 4.4) no meio CPG. Uma certa especificidade por queratina também foi verificada, pois uma vez substituída por caseína (Ccas), o crescimento bacteriano foi bem menos pronunciado. Com a utilização de caseína hidrolisada (Ctrip), um substrato mais prontamente disponível, o crescimento foi o mais rápido, comprovando a possibilidade de crescimento com fonte protéica como único nutriente.

De modo similar a outros microrganismos que degradam material protéico, durante o cultivo, nos meios contendo penas, houve um aumento no pH. Esse é um mecanismo utilizado por microrganismos queratinolíticos de eliminação do excesso de nitrogênio, através da deaminação e produção de amônia, refletindo a utilização da proteína pelo microrganismo. Alguns autores inclusive classificam o grau de queratinólise é proporcional ao aumento do pH, e que essa alcalinização pode estar também auxiliando na degradação da queratina (KUNERT, 2000).

A atividade proteolítica também foi proporcional ao crescimento microbiano (Figura 4.2), sendo que os máximos de atividade foram atingidos sempre no final da fase logarítmica de crescimento, semelhante ao descrito para vários microrganismos (CHENG et al., 1995, MACFARLANE; MACFARLANE, 1992), e indicando que as proteases têm importância do ponto de vista nutricional para esta linhagem, viabilizando seu crescimento através da hidrólise protéica.

A observação da zimografia (Figura 4.5), reforça a importância das proteases secretadas. Várias bandas de atividade, com diferentes pesos moleculares, foram visualizadas na zimografia

dos sobrenadantes de cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6. Outras bactérias também produzem mais de uma protease extracelular, por exemplo, *Butyrivibrio fibrisolvens* chega a produzir mais de dez proteases (STRYDOM; MACKIE; WOODS, 1986) e no sobrenadante de cultivo de *Kytococcus sedentarius* são encontradas duas proteases com atividade queratinolítica (LONGSHAW et al., 2002). Os perfis destas bandas também se mostraram diferentes. Algumas delas apareceram diferencialmente entre os tratamentos, ou seja, diferentes proteases podem estar sendo produzidas dependendo da fonte protéica disponível. Destas não se pode afirmar o número exato de proteases correspondentes a produtos gênicos diferentes, pois uma protease pode ser modificada por proteólise extracelular e manter atividade residual. A diferença do padrão de inibição da atividade proteolítica dos sobrenadantes dos meios CP (90% de inibição por EDTA e 10 % por PMSF) e Ctrip (33% de inibição por EDTA e 31 % por PMSF) reforça a tese de que há uma composição diferente de proteases quando *Chryseobacterium* sp. Kr6 é cultivado sob diferentes condições nutricionais. Têm-se observado que, para muitos microrganismos, a síntese destas enzimas extracelulares pode ser constitutiva ou parcialmente induzida por proteínas ou peptídeos (CHENG et al, 1995, WANG; SHIH, 1999). El-Refai et al. (2005) demonstraram que proteases queratinolíticas em *Bacillus pumilus* são altamente induzidas na presença de queratina e para *Chrysosporium keratinophilum* a indução é parcial (DOZIE; OKEKE; UNAEZE, 1994), com as proteases queratinolíticas ficando aderidas às células durante expressão constitutiva. Quando a queratina está presente, como indutor, elas são secretadas para o meio extracelular. Para *Chryseobacterium* sp Kr6, as proteases foram induzidas pela queratina, pois em sua presença observou-se uma atividade proteolítica muito maior (Figura 4.2) e o padrão de bandas de atividade observado através da zimografia também apresentou-se diferente, quando comparados ao meio sem queratina.

Em meio com queratina suplementado de glicose (CPG) houve uma redução na atividade enzimática. As enzimas induzidas, quando submetidas à fonte extra de carbono, sofrem repressão catabólica. Esse comportamento é comumente encontrado em espécies do gênero *Bacillus*. Espécies desse gênero usam preferencialmente glicose como fonte de energia, portanto, a biossíntese de enzimas envolvidas no catabolismo protéico só é observado na ausência de fontes de carbono facilmente metabolizáveis, como a glicose (STULKE; HILEN, 2000). O mecanismo de repressão pode também ser parcial, onde a expressão é somente diminuída, como acontece com os microrganismos produtores de proteases, *Staphylococcus aureus* (YOSHIKAWA et al.,

1974), *Pseudomonas aeruginosa* (WHOOLEY; O'CALLAGHAN; MC'LONGHLIN, 1983) e *Vibrio sp.* SA1 (WIERSMA; HANSEN; HARDER, 1978), e inclusive com alguns produtores de proteases queratinolíticas (queratinases), *Streptomyces fradie* (NOVAL; NICKERSON, 1958), *Bacillus licheniformis* (WANG; SHIH, 1999) e *Microbacterium sp.* (THYS et al., 2004). A presença de amônio como fonte extra de nitrogênio também reduziu a atividade proteolítica, similar ao descrito para *Vibrio sp.* SA1 (WIERSMA; HANSEN; HARDER, 1978) e *Pseudomonas aeruginosa* (WHOOLEY; O'CALLAGHAN; MC'LANGHLIN, 1983) sendo a repressão amônio específica a hipótese mais provável. Verificou-se assim, que as proteases de *Chryseobacterium sp.* Kr6 são parcialmente inibidas por fontes extras de carbono e de nitrogênio durante a degradação de queratina, semelhantes ao descrito para microrganismo queratinolítico *Streptomyces fradie*, onde a repressão catabólica apenas diminui a produção de sua queratinase (NOVAL; NICKERSON, 1958).

A capacidade de produção de proteases de *Chryseobacterium sp.* Kr6, com os maiores rendimentos no meio contendo somente penas como nutriente, pode também trazer algumas implicações biotecnológicas. Estas enzimas, com potencial de aplicação em processos envolvendo queratinólise (RIFFEL et al., 2003, RIFFEL; ORTOLAN; BRANDELLI, 2003), poderiam ter sua produção, utilizando penas como única matéria-prima, portanto, um meio de baixo custo e com reaproveitamento de um resíduo industrial que atualmente se acumula no ambiente e é sub-aproveitado durante o processamento de frangos.

A partir dos resultados de produção e indução das proteases por queratina, *Chryseobacterium sp.* Kr6 foi cultivado em meio CP, com o objetivo de purificar e caracterizar uma protease queratinolítica extracelular (queratinase). A queratinase, denominada Q1, apresentou uma alta atividade específica no final da purificação, de 2406 U.mg⁻¹ (Tabela 4.1) e 967 U.mg⁻¹ para os substratos caseína e keratin azure, respectivamente. O fator de purificação foi de cerca de 14 vezes e o rendimento da purificação foi baixo, de pouco mais de 1%. Esse cálculo pode se apresentar subestimado, pois várias proteases são secretadas ao mesmo tempo no meio de cultura de *Chryseobacterium sp.* Kr6 (Figura 4.5), e pela falta de um substrato específico para a protease purificada, considerou-se a totalidade da atividade proteolítica no extrato bruto.

O peso molecular estimado de 64 KDa foi semelhante ao da queratinase de *Aspergillus oryzae* que é de 60 KDa, também determinado por SDS-PAGE (FARAG; HASSAN, 2004), mas um pouco maior do que a maioria das proteases e queratinases, que normalmente apresentam

peso molecular entre 20 e 50 KDa (BÖCKLE; GALUNSKI; MÜLLER, 1995, CHENG et al., 1999, SUH; LEE, 2001).

Q1 apresentou maior atividade em pH alcalino, com um ótimo de 8,5, como a maioria das proteases secretadas pelos microrganismos queratinolíticos (BÖCKLE; GALUNSKI; MÜLLER, 1995, SANTOS et al., 1996, BRESSOLIER et al., 1999, FARAG; HASSAN, 2002, NAM et al., 2002). A atividade em pHs alcalinos também possui algumas implicações biotecnológicas. As proteases alcalinas são as enzimas de maior comercialização mundial, e são aplicadas nas mais diversas áreas, como em formulações de detergentes, síntese de peptídeos, indústria de alimentos, indústria do couro e também em alguns processos de biorremediação (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). A temperatura ótima de 50°C foi similar à encontrada para algumas queratinases do gênero *Bacillus* (LIN et al., 1992, ATALO; GASHE, 1993) e a enzima apresentou-se bem menos termooestável do que as queratinases de *Aspergillus orizae* (FARAG; HASSAN, 2004), *Bacillus licheniformis* (LIN; SHIH; SWAISGOOD, 1996) e *Streptomyces* sp KS₁₋₀₂ (LETORNEAU et al. 1998) as quais a estabilidade foi testada.

Os inibidores de serina e cisteína protease, PMSF e iodoacetamida, não inibiram a atividade de Q1, portanto, não havendo o envolvimento de resíduos de serina e cisteína no mecanismo catalítico, apesar de a maioria das queratinases descritas até o momento pertencerem à classe das serina proteases (LIN et al., 1992; FRIEDRICH; ANTRANIKIAN, 1995; BRESSOLIER et al., 1999; SUH; LEE, 2001; NAM et al., 2002).

Os quelantes EDTA, EGTA e 1,10 orto-fenantrolina inibiram Q1. A inibição parcial pelo EDTA, na concentração de 10 mM pode ser explicada pela possível ligação do EDTA a íons presentes em locais que não o sítio ativo. Esse comportamento tem sido observado para algumas metaloproteases e, nestes casos, a adição de íons após inibição pôde inclusive deslocar o EDTA do sítio ativo e a atividade ser restabelecida. (GRINWOOD; HEACHEMY; STEVENS, 1994, VENTER; OSTHOFF; LITTHAUER, 1999). A não observação deste comportamento com o EGTA pode-se dar porque o EDTA possui as constantes de estabilidade de ligação quelante-metal sempre maiores que o EGTA, a exceção do Ca²⁺, onde são praticamente iguais (BARRET, 1995). Com o aumento na concentração de EDTA a inibição enzimática foi semelhante ao EGTA. Na presença de 1,10 orto-fenantrolina, um quelante com afinidade ao Zn²⁺ muito maior do que a outros cátions, houve inibição total de Q1 na concentração testada. Através do perfil de inibição, a queratinase Q1 pode ser classificada como uma Zn-metaloprotease. A presença de Zn à

molécula foi confirmada através da espectrometria de absorção atômica. Outras metaloproteases já foram descritas em espécies do gênero *Chryseobacterium* (TARENTINO et al, 1995, LIJNEN et al, 2000) e algumas metaloproteases também têm sido relacionadas com a atividade queratinolítica (BROUTA et al., 2001; BOCKLE et al., 1995, ALPRESS; MOUNTAIN; GOWLAND, 2002; FARAG; HASSAN, 2004).

A presença de íons Ca^{2+} no meio reacional resultou em um aumento de três vezes na atividade enzimática (Tabela 4.2). O aumento da atividade na presença dos cátions como Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} , tem sido associado a uma proteção da desnaturação térmica, estabilização conformacional da estrutura terciária e proteção contra autoproteólise para algumas metaloproteases (KUMAR; TAKAGI, 1999). Íons Cd^{2+} , como o Ca^{2+} , também resultaram em um aumento na atividade. Esses cátions podem estar exercendo o mesmo efeito sobre a enzima, pois seus raios iônicos são muito semelhantes, de 0,97 Å para Cd^{2+} e 0,99 Å para o Ca^{2+} (EXTERKATE; ALTING, 1999). Já a presença dos cátions Zn^{2+} , Al^{2+} e Cu^{2+} , causou um efeito inibitório sobre a enzima. O estímulo por Ca^{2+} e inibição por Zn^{2+} também foi demonstrada pela queratinase de *Vibrio* sp. Kr2 (SANGALI; BRANDELLI, 2002) e algumas Calpaínas (SORIMACHI; ISHIURA; SUZUKI, 1997). Os agentes redutores DTT e mercaptoetanol inibiram a atividade, portanto, a presença de pontes dissulfeto pode ser importante na manutenção da conformação molecular requerida para a atividade de Q1, semelhante ao descrito para a metaloprotease de *Flavobacterium psychrophilum* (SECADES; ALVAREZ; GUIJARRO, 2001). Outro possível mecanismo de inibição pelo DTT pode ser o de quelação dos íons necessários para manutenção da estrutura e assim da atividade (CHENG et al., 1999).

A classificação como metaloprotease possui algumas implicações biotecnológicas. Um aspecto importante é a reversibilidade da inibição por agentes quelantes. Esta característica pode ser usada como método para inativação temporária durante armazenamento, reduzindo autólise, que está sempre associada a proteases. Além disso, o caráter de metaloenzima viabiliza e facilita uma possível imobilização, que também tem sido utilizado para aumentar estabilidade enzimática (LIN; SHIH; SWAISGOOD, 1996).

As metaloproteases entre as proteases apresentam-se excepcionalmente diversas e são divididas em cerca de 16 clans, que relaciona a um ancestral comum, e em mais de 50 famílias. A classificação de proteases em famílias, através de critérios estruturais, esbarra no mesmo problema encontrado para classificar proteínas, que é a sua natureza quimérica. As moléculas de

muitas proteínas são construídas através de módulos distintos, que foram combinados durante a evolução. Cada um destes módulos tem sua própria relação estrutural e evolutiva a outras proteínas apesar de fazerem parte da mesma proteína. Para a classificação das proteases então se sugere trabalhar com as regiões da proteína que são responsáveis pela atividade hidrolítica, chamado de unidade peptidase. Nesta, é obrigatória a presença de todos os aminoácidos responsáveis pela atividade e o alinhamento destes com alguma proteína previamente conhecida dentro da família (BARRETT, RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). Quando analisados o finger print (MALDI-Tof/MS) e as seqüências dos peptídeos resultantes da digestão trípica (ESI-MS/MS) não foi encontrada homologia óbvia a qualquer proteína com seqüência já depositada nos bancos de dados disponíveis, nem a seqüências curtas ou motivos no programa PROSITE. Outras proteínas isoladas de microrganismos do gênero *Chryseobacterium* também têm apresentado pouca homologia a proteínas conhecidas. A seqüência de uma glutaminase de *Chryseobacterium proteoliticum* (YAMAGUCHI; JEENES; ARCHER, 2001) também não mostrou homologia a proteínas conhecidas e uma metaloprotease isolada de *Chryseobacterium meningosepticum* apesar da baixa homologia, apresentou a seqüência de aminoácidos correspondentes ao sítio ativo da família astacin das metaloproteases (TARENTINO et al., 1995). A análise das seqüências internas dos peptídeos resultantes da digestão trípica da queratinase Q1 mostrou algumas similaridades às metaloproteases da família M14 (Figura 4.14), principalmente entre as regiões fundamentais para catálise, como o sítio de ligação ao metal e o sítio ativo (Figura 4.14). As seqüências dos aminoácidos do sítio ativo entre os representantes das subfamílias difere, mas a família caracteriza-se por um motivo de ligação, onde o Zn é tetraedricamente coordenado por duas histidinas (H), um glutamato (E) e uma molécula de H₂O. Uma das histidinas e o glutamato são encontrados no motivo conservado HXXE (onde X é qualquer aminoácido) e o terceiro ligante está a cerca de 103 a 143 resíduos deste motivo (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004).

A família das peptidases M14 é também conhecida como família carboxipeptidase A. Os membros desta família estão amplamente distribuídos entre todos os tipos de organismos, com exceção dos vírus onde ainda não foram encontradas. É dividida em três subfamílias (M14A, B e C), mas há membros que divergem em termos de seqüência e ainda não foram classificados, sendo assim enquadrados assim na subfamília M14X. Q1 mostrou maior similaridade com membros desta subfamília. A maioria das peptidases na família são carboxipeptidases,

hidrolisando aminoácidos na porção C-terminal de proteínas, no entanto outros tipos de atividade catalítica têm sido demonstrados. Geralmente são sintetizadas sem um peptídeo sinal, mas na maioria das vezes são pró-peptídeos que devem ser processados para tornarem-se ativos. As funções biológicas destas enzimas são numerosas e diversas e incluem desde processamento de peptídeos bioativos (Carboxipeptidase E) até o metabolismo de proteínas e de parede celular bacteriana (RAWLINGS; TOLLE; BARRETT, 2004). A queratinase Q1 aparece então como a primeira protease representante desta família encontrada dentro do gênero *Chryseobacterium* e associada à atividade queratinolítica.

Outro aspecto interessante nas seqüências dos peptídeos foi a presença de um sítio consenso de orto-glicosilação DS* no peptídeo 5 (KGSSADS*PNSEEK), seqüência esta que sempre que encontrada em proteínas secretadas pela espécie relacionada *Chryseobacterium meningosepticum* (Plummer et al., 1995), apresenta uma o-glicosilação no resíduo serina. Tarentino et al. (1995) caracterizaram uma metaloprotease extracelular deste microrganismo chamada flavastacin que apresentou um heptapolissacarídeo de 1,2 KDa ligado ao sítio DS*. Considerou-se durante muito tempo que as proteínas de procariotos não apresentavam glicosilações. Hoje já está bem estabelecido que glicosilações estão presentes tanto no domínio Archae quanto no domínio Bactéria. As funções atribuídas a glicosilação tem sido a estabilidade e manutenção da conformação, adesão, reconhecimento de superfície e proteção contra o ataque proteolítico e aumento na afinidade pelo substrato (MOENZ; VANDERLEYDEN, 1997). Para a queratinase Q1 a possível glicosilação pode ter um papel na proteção contra autoproteólise bem como de proteólise por outras proteases, já que são secretadas várias proteases por esse microrganismo, conforme já visto.

Quando analisada a seqüência do fragmento do gene amplificado utilizando os iniciadores degenerados, também não se verificou homologia à proteínas conhecidas, surgindo como mais um indicativo de que Q1 trata-se de uma nova proteína. O cDNA também foi amplificado confirmando que esta seqüência corresponde a uma seqüência protéica e está sendo expressa. A queratinase Q1, apresentando um peso molecular de 64 KDa, possui aproximadamente 600 aminoácidos. Entre os peptídeos seqüenciados por espectrometria, obteve-se a seqüência de 330 aminoácidos, o que cobre pouco mais da metade da proteína Q1. O fragmento do gene corresponde a 156 aminoácidos, portanto ainda difícil relacionar as seqüências dos aminoácidos

dos peptídeos com os nucleotídeos do fragmento, sendo necessário mais estratégias para a busca da sequência gene completo.

A capacidade de hidrólise de substratos insolúveis pela enzima Q1 também foi verificada, utilizando os substratos keratin azure e penas cruas. Q1 mostrou atividade queratinolítica apenas contra keratin azure, enquanto que com penas cruas, não houve a detecção de peptídeos e aminoácidos liberados para o meio, mesmo na presença de agente redutor. Os agentes redutores exercem forte efeito inibitório sobre Q1, podendo ser necessário um poder redutor menor. As queratinases de *Doratomyces microsporus* (FRIEDRICH; KERN, 2003) e *Paecilomyces marquandii* (Gradisar et al., 2005) também se mostraram incapazes de degradação da queratina de penas de frango, apesar de apresentarem alta atividade frente a outros substratos queratinosos como pele, cabelo e unhas. A queratinase de *Streptomyces pactum* (BOCKLE; GALUNSKY; MULLER, 1995) teve atividade hidrolítica sobre keratin azure e sobre a queratina de penas, no entanto esta atividade foi extremamente baixa para ambos substratos. Na presença de um agente redutor (DTT) houve pronunciado aumento na degradação de queratina das penas, cerca de 70%, enquanto que somente com a enzima purificada a degradação foi de 10%, apesar de sucessivas adições da enzima fresca. Esses resultados mostraram que a protease não possui um efeito de hidrólise total desses substratos.

A clivagem enzimática das ligações peptídicas da molécula de queratina é difícil principalmente pela dificuldade da interação entre a enzima e a superfície das partículas de queratina. O acesso ao substrato e a atividade das proteases queratinolíticas pode estar ligada à especificidade por substratos compactos. Uma possibilidade é a presença de domínios hidrofóbicos como acontece em quitinases, celulasas e xilanases que facilitam a interação enzima-substrato (BOCKLE; GALUNSKY; MULLER, 1995). Outro fator de estabilidade mecânica e de digestão proteolítica das queratinas tem sido atribuído, entre outros, à presença de pontes dissulfeto. Portanto, a presença dos domínios de ligação e a hidrólise das pontes dissulfeto, são indispensáveis para o acesso das proteases a seu substrato. A formação de tiol livre durante os cultivos de *Vibrio* sp. Kr2 (SANGALI; BRANDELLI, 2000), *Streptomyces pactum* (BOCKLE; MULLER, 1997) e para a própria bactéria em estudo *Chryseobacterium* sp. Kr6 (RIFFEL et al., 2003) crescendo em penas foi demonstrada. A clivagem de pontes dissulfeto pode ocorrer diretamente (por um mecanismo até então não elucidado), por secreção de sulfito (causando sulfitólise) ou pode estar relacionada à atividade enzimática de dissulfeto redutase

(ONIFADE et al. 1998). Yamamura et al, (2002) estudando queratinólise por *Stenotrophomonas* sp., purificaram uma proteína com atividade de dissulfeto redutase, capaz de redução de cistina e glutatona oxidada. A combinação desta com uma protease do mesmo microrganismo, produziu alta atividade queratinolítica e quando utilizado DTT com a protease, a atividade queratinolítica foi semelhante. Sugeriu-se então que o mecanismo bacteriano e até mesmo fúngico de degradação de queratina possa ser primeiramente o ataque das pontes dissulfeto por uma dissulfeto redutase seguido da ação das proteases sob um substrato que esteja bem mais acessível.

O mecanismo de hidrólise de queratina por *Chryseobacterium* sp. Kr6 pode ser semelhante ao descrito para *Stenotrophomonas* sp. (YAMAMURA et al, 2002). Durante o cultivo de *Chryseobacterium* sp. Kr6 em penas, verificou-se a redução de pontes dissulfeto (RIFTEL et al., 2003) e as enzimas extracelulares foram capazes de hidrolisar substratos queratinosos como pele, penas e cabelo (BRANDELLI, 2005). Quando Q1 purificada foi utilizada sobre penas cruas não houve atividade hidrolítica. Além da redução das pontes dissulfeto, pode ser necessário um processo sinérgico entre as várias proteases secretadas por *Chryseobacterium* sp. Kr6 (Figura 4.5), facilitando a hidrólise da queratina e dos peptídeos formados durante a degradação. Esse comportamento tem sido demonstrado por microrganismos queratinolíticos, como em algumas espécies de *Streptomyces* (LETORNEAU et al., 1998, BOCKLE, GALUNSKY, MULLER, 1995, BRESSOILIER et al., 1999), *Xanthomonas maltophilia* (de TONI et al., 2002) e também no caso do dermatófito *Trichophyton rubrum*, onde a capacidade de degradação de queratina e a conseqüente virulência têm sido associadas à atividade conjunta de exo e endo proteases (MONOD et al., 2005).

Apesar da capacidade de hidrólise de substratos queratinosos, através da redução de pontes dissulfeto e atividade proteolítica, estes eventos não têm sido suficientes para a degradação completa de penas. Alguns autores (BOCKLE; MULLER, 1997, ONIFADE et al., 1998, RAMNANI; SINGH, GUPTA, 2005) sugerem que a colonização bacteriana das penas seja fundamental. Ramnani; Singh, Gupta (2005) encontraram aumentada a concentração de sulfeto no meio extracelular e alta atividade de dissulfeto redutase presente, principalmente no extrato celular de *Bacillus licheniformis* RG1 colonizando a superfície das penas. Nas observações microscópicas de *Chryseobacterium* sp. Kr6 observou-se que durante as primeiras horas de cultivo a colonização é baixa, mas a estrutura da fibra de queratina já apresenta alguma alteração de superfície (Figura 4.6B), quando comparada ao controle. Esta pode ser devido ao poder

reduzidor e algumas proteases secretadas pela bactéria, pois neste tempo a bactéria encontra-se em fase exponencial com alta atividade enzimática. Após 18 horas, percebeu-se um aumento substancial na colonização das penas (Figura 4.6C, 4.7) com uma quantidade maior liberação de proteína solúvel para o meio, ou seja, com uma taxa de degradação de queratina maior (Figura 4.3). Estes resultados demonstram a relação proporcional entre o aumento da colonização bacteriana das penas e a degradação da queratina, sugerindo-se mais estudos sobre poder redutor e de proteólise associado à célula de *Chryseobacterium* sp. Kr6, relacionado a esta degradação.

Queratinases possuem grande potencial de aplicação, principalmente na indústria avícola e do couro. Recentemente a queratinase de *Bacillus licheniformis* PWD-1 foi caracterizada quanto a hidrólise enzimática dos príons PrP^{Sc} (LANGEVELD et al. 2003) e SUP35NM (CHEN et al., 2005) abrindo uma nova e relevante perspectiva para a aplicação de queratinases. Este estudo apresentou a influência das condições nutricionais sobre a produção de proteases da bactéria queratinolítica *Chryseobacterium* sp. Kr6 durante a degradação de penas, bem como a purificação e caracterização de uma nova queratinase classificada como metaloprotease e pertencente a família M14. Para a avaliação da aplicação biotecnológica desta enzima são necessários maior estudos sobre os fatores que tornam esta enzima hábil por atuar em substratos compactos bem como continuar a busca de mais detalhes dos seus aspectos moleculares.

6 CONCLUSÕES

Através das análises e discussão dos resultados deste trabalho, colocou-se em evidência uma série de aspectos:

Num primeiro momento, foi estudado o crescimento e a produção de proteases extracelulares da linhagem queratinolítica *Chryseobacterium* sp. Kr6 cultivada com queratina e outros nutrientes. Verificou-se que a bactéria se desenvolve preferencialmente em meios contendo queratina e a atividade proteolítica foi induzida por esta proteína. Por outro lado, a presença de fonte extra de carbono e nitrogênio resultou em uma repressão catabólica parcial desta atividade. Esse microrganismo foi capaz de produzir várias proteases extracelulares com pesos moleculares distintos, e dependendo da constituição do meio de cultivo, perfis distintos destas proteases foram observados, reforçando o caráter indutivo e sua importância na hidrólise e metabolismo de queratina.

Depois de estabelecidas as condições de maior produção e indução das proteases, buscou-se purificar e caracterizar uma protease com atividade queratinolítica (queratinase). Purificou-se uma queratinase, denominada de Q1, através de dois passos cromatográficos, interação hidrofóbica e gel-filtração. A proteína foi purificada cerca de 14 vezes, com um rendimento de 1,18%. Através de SDS-PAGE, a proteína apresentou-se como monomérica com um peso molecular aproximado de 64 KDa. O pH e a temperatura ótimos para atividade foram de 8,5 e 50°C, respectivamente e a atividade proteolítica foi estimulada pela presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e inibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{2+} , Hg^{2+} e agentes redutores.

O perfil de inibição, permitiu classificar a queratinase com sendo uma Zn-metaloprotease, sendo a presença de Zn confirmada pela espectrometria atômica. Após a purificação, a enzima foi submetida a digestão trípica e espectrometria de massas para identificação, mas houve uma baixa homologia a proteínas disponíveis em bancos de dados conhecidos. Quando analisada a sequência dos 23 peptídeos, obtida pela espectrometria de massas, a queratinase pôde ser classificada como sendo membro pertencente à família M14 (Carboxipeptidase) das metaloproteases contendo Zn.

Através das análises microscópicas verificou-se intensa degradação de penas na presença do microrganismo, e uma intensa colonização das penas. A enzima purificada apresentou atividade queratinolítica, uma vez que foi capaz de hidrolisar o substrato keratin azure, mas foi ineficiente sobre penas cruas, sugerindo a necessidade de outras enzimas, como dissulfeto redutase e proteases, durante o processo de degradação de penas.

Baseando-se na sequência de dois peptídeos da digestão com tripsina, desenharam-se dois pares de iniciadores degenerados. A utilização destes em uma PCR, resultou na amplificação de um fragmento de cerca de 470 pares de base, utilizando DNA ou cDNA como molde. Sugeriu-se, com isso, que o fragmento faz parte de uma região do gene desta queratinase e que este gene estava sendo expresso nas condições de extração do RNA. Após sequenciamento, a sequência deste fragmento também não mostrou homologia e similaridade a seqüências de proteínas conhecidas, indicando tratar-se de uma nova metaloprotease.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, S.; FERREIRA, G.; MOREIRA, A. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 24, n. 2, p. 125-134, 2004.
- ALLPRESS, J.D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P.C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497. **Letters in Applied Microbiology**, Oxon, v. 34, n. 5. p. 337-342, 2002.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389–3402, 1997
- ATALO, K.; GASHE, B.A. Protease production by a Thermophilic *Bacillus* species (p-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 15, n. 11, p. 1151-1156, 1993.
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 244, p. 1-15, 1994.
- BARRET, A.J. Proteolytic Enzymes: aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 248, p. 183, 1995.
- BEER, H.; HUGO, C.J.; JOOSTE, P.J.; WILLEMS, A.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T. VANDAMME, P.A.R. *Chryseobacterium vrystaatense* sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2149-2152, 2005.
- BERNAL, C.; CAIRÓ J.; COELLO N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, 2005. In press.

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

BÖCKLE, B.; MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 790-792, 1997.

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

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

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

BUSSON, B.; ENGSTRÖN, P.; DOUCET, J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction, **Journal of Synchrotron Radiation**, Copenhagen, v. 6, p. 1021-1030, 1999.

CHEN, C.Y.; ROJANATAVORN, K.; CLARK, A.C.; SHIH, J.C.H. Characterization and enzymatic degradation of Sup35NM, a yeast prion-like protein. **Protein Science**, v. 14, n. 9, p. 2228-2235, 2005.

CHENG; S.W.; HU, H.M.; SHEN, S.W.; TAKAGI, H.; ASANO, M.; TSAI, Y.C. Production and characterization of keratinase of feather-derading *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v. 59, n. 12, p. 2239-2243, 1995.

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

DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, p. 242-244, 1997.

DAYANANDAN, A.; KANAGARAJ, J.; SOUNDERRAJ, L.; GOVINDARAJU, R.; RAJKUMAR, G.S. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **Journal of Cleaner Production**, Oxon, v. 11, n. 5, p. 533-536, 2003.

DOZIE, I.N.S; OKEKE, C.N.; UNAEZE, N.C. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 10, p. 563–567, 1994.

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

FARAG, A.M; HASSAN, M.A. Purification, Characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 85-93, 2004.

FRIEDRICH, 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, 1995.

FRIEDRICH, J; KERN, S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 21, p. 53-57, 2003.

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

GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M.R.V.; SUBRAMANIAN, T.V.; JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and it's application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 30, n. 5, p. 457-462, 1995.

GRADISAR, H; FRIEDRICH, J; KRIZAJ, I; JERALA, R. similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *doratomyces*

microsporus to some known proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n.7, p. 2420-2426, 2005.

GRIMWOOD, B.G.; HEACHEMY, K.; STEVENS, R.W. Purification and characterization of a neutral zinc endopeptidase secreted by *Flavobacterium meningosepticum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 311, p. 127-132, 1994.

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

HÄNEL, H.; KALISCH, J.; KEIL, M.; MARSCH, W.C.; BUSLAU, M. Quantification of keratinolytic activity from *Dermatophilus congolensis*. **Medical Microbiology and Immunology**, New York, v. 180, p. 45-51, 1991.

HOOD, C.M.; HEALY, M.G. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 179-188, 1994.

HUANG, Q.; PENG, Y.; LI, X.; WANG, H.; ZHANG, Y. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. **Current Microbiology**, New York, v. 46, p. 169-173, 2003.

HUGO, C. J.; SEGERS, P.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K. *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 53, p. 751-757, 2003.

JONES, L.N. SIMON M.; WATTS, N.R.; BOOY, F.P.; STEVEN, A.C.; PARRY, D.A.D. Intermediate filament structure: hard α -Keratin. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 83-93, 1997.

KAMPFER, P.; DREYER, U.; NEEF, A.; DOTT, W.; BUSSE, H.-J. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Berks, v. 53, p. 93-97, 2003.

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

KIM, K.K.; KIM, M.K.; LIM, J.; PARK, H.Y.; LEE, S. T. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Berks, v. 55, p. 133-138, 2005.

KIM, K. K.; BAE, H.S.; SCHUMANN, P.; LEE, S.T. *Chryseobacterium daecheongense* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Berks, v. 55, p. 133-138, 2005.

KLUSKENS, L.D.; VOORHORST, W.G.; SIEZEN, R.J.; SCHWERDTFEGER, R.M.; ANTRANIKIAN, G.; OOST, J.; van der; VOS W.M. de. Molecular characterization of fervidolysin, a subtilisin-like serine protease from the thermophilic bacterium *Fervidobacterium pennivorans*. **Extremophiles**, Tokio, v. 6, p. 185-194, 2002.

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

KUNERT, J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Sreptomyces fradie* and the fungus *Microsporum gypseum*: a comparison. **Journal Basic Microbiology**, Oxon, v. 29, p. 597-604, 1989.

KUNERT, J. Effects of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gryseum*. **Mycoses**, Berlin, v. 35, p. 343-348, 1992.

KUNERT, J. Physiology of keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, 2000.

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

LANGEVELD, J.P.M.; WANG, J.J.; VAN DE WIEL, D.F.M.; SHIH, G.C.; GARSSSEN, J.; BOSSERS, A.; SHIH, J.C.H. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 11, p. 1782-1789, 2003.

LEE, G.G.; FERCKET, P.R.; SHIH, J.C.H. Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 59, p. 1312, 1991.

LEE, H.; SUH, D.B.; HWANG, J.H.; SUH H.J. Characterization of a Keratinolytic Metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 97, p. 123-133, 2002.

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

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

LIJNEN, H.R.; HOEF, B.V.; UGVU, F.; COLLEN, D.; ROELANTS, I. Specific proteolysis of human plasminogen by a 24 kda endopeptidase from a novel *Chryseobacterium* Sp. **Biochemistry**, Washington, v. 39, p. 479-488, 2000.

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

LIN, X.; KELEMEN, D. W.; MILLER, E. S.; SHIH, J. C. H. Nucleotide sequence and expression of KerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1469-1474, 1995.

LIN, X , WONG, S.L.; MILLER, E.S.; SHIH, J.C.H. Expression of the *Bacillus licheniformis* PWD-1 keratinase gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg. v. 19, p. 134-138, 1997.

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

LI, Y., KAWAMURA, Y.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; LIU, H.; HUANG, X.; KOBAYASHI, K.; EZAKI, T. *Chryseobacterium miricola* sp. nov., a novel species isolated from condensation water of space station Mir. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Berks, v. 26, p. 523-528, 2003.

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

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

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

MACFARLANE G.T.; MACFARLANE S. Physiological and nutritional factors affecting synthesis of extracellular metalloproteases by *Clostridium bifermentans* NCTC 2914. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 4, p. 1195-1200, 2005.

MACEDO, A. J.; DA SILVA, W.O.B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* s14 exhibiting remarkable dehairing capabilities, **Applied and 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.

MILLES, A.A.L.; MISSA, S.S. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38 p. 732-749, 1938.

MIYOSHI, S; SHINODA, S; Microbial metalloproteases e pathogenesis. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 2, p. 91-98, 2000.

MOENS, S; VANDERLEYDEN, J. Glycoproteins in prokaryotes. **Archives of Microbiology**, New York, v. 168, n.3, p. 169-175, 1997

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

MOHAMEDIN, A. H. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease producing thermophilic streptomyces strain grown on chicken feather as substrate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxon, v. 49, p. 13-21, 1999.

MONOD, M; LÉCHENNE, B; JOUSSON, O; GRAND, D; ZAUGG, C; STÖCKLIN, R; GROUZMANN, E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Microbiology**, New York, v. 151, p. 140-145, 2005.

MORITZ, J.Z; LATSHAW, J.D. Indicators of nutritional value of hydrolyzed feather meal. **Poultry Science**, Savoy, v. 80, p.79-86, 2001.

NAM, G. W.; LEE, D.W.; LEE, H.S.; LEE, N.J.; KIM, B.J.; CHOE, E.A.; HWANG, J.K.; SUHARTONO, M.P.; PYUN Y.R. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1 a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Archives of Microbiology**, New York, v. 178, p. 538-547, 2002.

NELSON, N.J. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, Washington, v. 224, p. 350-356, 1984.

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

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. **Poultry Science**, Savoy, v. 82, p. 664-670, 2003.

ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their

enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 66, p. 1-11, 1998.

PAPADOPOULUS, M.C.; BOUSHY, E.; ROODBEEN, A.E. Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 14, p. 279-290, 1986.

PAPAINI, R.; MANCIANTI, F. Extracellular enzymatic activity of *Microsporum canis*. **Mycophatologia**, Dordrecht, v. 132, p. 129-132, 1996.

PLUMMER, T. H.; TARENTINO, A. L.; HAUER, C. R. Novel, specific o-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, n. 32, p. 33192-33196, 1995.

PORRES, J.M.; BENITO, M.J.; LEI, X.J. Functional expression of keratinase (*Ker-A*) gene de *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 631-636, 2002.

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

QUESADA, A.R.; FAJARDO, I.; AGUDO, D.R.; PANCHÓN, J.M.; MEDINA, M.A. Zymography of extracellular matrix proteases. **Biochemical Education**, Bethesda, v. 24, n. 3, p. 170-171, 1996.

RAMNANI, P; SINGH; R; GUPTA, R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, , p. 191-196, 2005

RAO, B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N.D.; BARRET, A.J. Evolutionary families of Peptidases. **Biochemical Journal**, London, v. 290, p. 205-218, 1993.

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**. 32 Database issue, D160-D164, 2004

RIFFEL, A.; ORTOLAN, S.; BRANDELLI, A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.78, p.855 - 859, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.29(5): 255-8, 2002.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**; New York, v. 179, n. 4, p. 258-65, 2003.

ROZS, M.; MANCZINGER, L.; VAGVOLGYI, C.; KEVEI F. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, p. 221-224, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SANTOS R.M.D.B.; FIRMINO, A.A.P.; SÁ, C.M. DE.; FELIX, C.R. Keratiolytic activity of *Aspergillus fumigatus* fresenius. **Current Microbiology**, New York, v. 33, p. 364-370, 2000.

SECADES, P.; ALVAREZ, B.; GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium- induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish patogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2436-2444, 2001.

SHEN, F.T.; KAMPFER, P.; YOUNG, C.-C.; LAI, W.A.; ARUN, A. B. *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Becks, v. 55, p. 423-436, 2005.

SHIMURA K.; KAJI S.; HIRASHI A. *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Becks, v. 55, p. 1903-1906, 2005.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda v.195, p. 19-23, 1952.

SORIMACHI, H.; ISHIURA, S.; SUZUKI, K. Structure and physiological function of calpains. **Biochemical Journal**, London, v. 328, p. 721–732, 1997.

STRYDOM, E.; MACKIE, R.I.; WOODS, D.R. Detection and characterization of extracellular proteases in *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.24, p. 214-217, 1986

STULKE, J.; HILLEN, W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 849–880. 2000

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

SWITZER, R. C.; MERRIL, C. R.; SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 98, p. 231–237, 1979.

SZABÓ, I.; BENEDEK, A.; SZABO, I.M.; BARABAS, G. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 16, p. 253-255, 2000.

TARENTINO, A.L.; QUINONES G.; GRIMWOOD B.G.; HAUER C.R.; PLUMMER T.H. Molecular cloning and sequence analysis of flavastacin: an O-glycosylated prokaryotic zinc

metalloendopeptidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 319, n. 1, p. 281-285, 1995.

TAKIUCHI, I.; HIGUCHI, D.; SEI, Y. Immunological studies of extracellular keratinase. **Journal of Dermatology**, Tokio, v.10, p.327-330, 1983.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, London, v. 22, n. 4, p. 181-188, 2004.

THYS, R.C.S.; LUCAS, F.S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.;BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.

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

VANDAMME, P.; BERNARDET, J.F.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HOLMES, B. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Becks, n. 44, p. 827–831, 1994.

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

VARELA, H.; FERRARI, M.D.; BELOBRAJDIC, L.; VASQUEZ, A.; LOPERENA, L.M. Skin unhairing peptidases of a *Bacillus subtilis*: production and partial characterization. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 18, p. 755-758, 1997.

VENTER, H.; OSTHOFF, G.; LITTHAUER, D. Purification and characterization of a metalloprotease from *Chryseobacterium indologenes* ix9a and determination of the amino acid

specificity with electrospray mass spectrometry. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 15, p. 282-295, 1999.

VIDAL, L.; CHRYSTEN, P; COELHO, M. N. Feather degradation by *Kocurea rosea* in submerged culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. New York, v. 16, p. 551-554, 2000.

VIRGINIA TECH CENTER FOR GENOMICS. Disponível em: <http://vigen.biochem.vt.edu/protocols/digestprotocol.pdf> Acesso em: 10 de jun. 2005

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

WANG, J.J.; SWAISGOOD, H.E.; SHIH J.C.H. Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 81, n. 4, p. 421-429, 2003.

WANG, J.J.; ROJANATAVORN, K.; SHIH J.C.H. Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the *Ker A* gene. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 87, n. 4, p. 459-464, 2004.

WAWRZKIEWICZ, K; WOLSKI, T.; ŁOBARZEWSKI, J. Screening the keratinolytic activity of dermatophytes *in vitro*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 114, p. 1-8, 1991.

WHOOLEY, M.A.; O'CALLAGHAN J.A.; MCLANGHLIN. A.J. Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. **Microbiology**, New York, v. 129, p. 981-988, 1983.

WIERSMA, M.; HANSEN, T.A.; HARDER W. Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzymes by *Vibrio* SA1. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, Amsterdam, v. 44, p. 129–140, 1978.

WILLIAMS, C.M.; RICHTER, C.S.; MACKENZIE, J.M.; SHIH, J.C.H. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading *Bacterium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.1509-1515 , 1990.

YAMAGUCHI, S.; YOKOE, M. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov, a newly isolated bacterium from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3337–3343, 2000.

YAMAGUCHI, S.; JEENES, D.J.; ARCHER D.B. Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. **European Journal of Biochemistry**, Oxon, v. 268, p. 1410-1421, 2001.

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

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, F.; NAKA, M.; MUROFUSHI, E.; TSUNEMATSU, J. Pleiotropic alterations of activities of several toxins and enzymes in mutants of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 119, p. 117–122, 1974.

YOUNG, C. C.; KAMPFER, P.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; ARUN, A. B. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). **International Journal of Systematic Evolution Microbiology**, Becks, v. 55, p. 423-436, 2005.

ZAGHLOUL, T.I. ABDELAZIZ, A.; MOSTAFA, M.H. High level of expression and stability of the cloned alkaline protease (aprA) gene in *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 6, p. 534-537, 1994.

ZAGHLOUL, T.I.; AL-BAHRA, M.; AL-AZMEH, H. Isolation, identification and keratinolytic activity of a several feather-degrading bacterial isolates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.72, p. 207-213, 1998.