

**THALITA RODRIGUES DUARTE**

**PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR  
ESTIRPES MUTAGENIZADAS DE *CANDIDA*  
*PARAPSILOSIS***



Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Alane Beatriz Vermelho

Colaboradora: Selma Soares de Oliveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
AGOSTO DE 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Thalita Rodrigues

Produção de queratinases por estirpes mutagenizadas de *Candida parapsilosis*/

Thalita Rodrigues Duarte – Rio de Janeiro, 2009

xiv, 81 fls.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Referências bibliográficas: f 63

1. *Candida parapsilosis* 2. mutante 3. Etil metanosulfonato 4. Peptidases 5. Queratinases 6. Queratina I. Vermelho, Alane Beatriz. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Produção de queratinases por estirpes mutagenizadas de *Candida parapsilosis*

THALITA RODRIGUES DUARTE

**PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR ESTIRPES  
MUTAGENIZADAS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS***

Rio de janeiro, 11 de Agosto de 2009

---

Dra. Alane Beatriz Vermelho (IMPPG/ UFRJ)

---

Dra. Eliana Barreto Bergter (IMPPG/ UFRJ)

---

Dra. Sônia Couri (EMBRAPA)

---

Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso (CTAA/EMBRAPA)

---

Dra. Marta Helena Branquinha (IMPPG/ URFJ)

---

Dr. Andrew Macrae (IMPPG/ URFJ)

---

Dr. Leon Rabinovitch (Fundação Oswaldo Cruz)

Trabalho realizado no Laboratório Proteases de Microrganismos e no Laboratório Genética de Alimentos do Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Professora Alane Beatriz Vermelho e colaboração da Professora Selma Soares de Oliveira.

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus** pela minha vida, pelos seus cuidados e pela sua presença constante ao meu lado.

Aos **meus pais** e **minhas avós** pelo apoio e amor que sempre me deram.

As minhas irmãs, **Thais e Thaísa**, pela alegria me trazem e por me permitir usar o computador quase em tempo integral para escrever a tese.

Ao meu namorado **Hélcio**, por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis e por toda alegria nos infinitos momentos alegres que já passamos juntos.

A minha **sogra** e meu **sogro** por me permitirem já fazer parte desta família que eu amo muito.

A minha querida orientadora **Alane**, por todo apoio e todos os ensinamentos, e pela fé que compartilhamos no Senhor Jesus.

A Professora **Selma** pelos ensinamentos, e por acreditar no meu trabalho.

A Professora **Marta**, por me permitir usar alguns equipamentos de seu laboratório e toda a sua equipe que sempre me trataram muito bem.

A equipe do laboratório 035 (**Raquel, Josiane e Micheli**) pela ajuda e amizade.

Agradeço a toda equipe do laboratório pela amizade e pelo carinho. Vocês vão sempre fazer parte da minha vida, e eu vou sentir muita falta de todas vocês.

A **Ana Cristina**, por sempre me tratar com carinho e por estar sempre disposta a me auxiliar em meus experimentos.

A **Edilma** pela amizade, por toda a ajuda e pelo carinho que me trata.

A **Ana Maria** por toda a paciência que teve em passar seus conhecimentos e pela amizade.

A **Sabrina** pelo apoio, pela ajuda, pela amizade. Obrigada, porque mesmo estando longe durante o seu mestrado, sempre esteve perto, mesmo que fosse pelo telefone. Você foi muito importante para a finalização da minha tese.

A todas as outras meninas do laboratório 031 pela (**Bárbara, Ingrid, Fabíola, Carol**) pela amizade e companhia.

A **Denise** por cantar para me alegrar e por lavar muitos tubinhos e eppendorffs.

A **Giseli (IME)** pela amizade e pelas caronas.

A **Tatiana Pinotti** pela amiga que foi desde que a conheci e pela ajuda com a biologia molecular.

A minha amiga **Giseli**, pelas disciplinas e seminários compartilhados. Espero que a distância não nos afaste e que possamos continuar com a mesma amizade sempre.

A **Fernanda** e a **Queila** pelas conversas informais e pela ajuda.

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.**

Habite Cristo no vosso coração, pela fé, estando vós arraigados e alicerçados em amor, a fim de poderdes compreender, qual é a largura, o comprimento, a altura e a profundidade, e conhecer o amor de Cristo que excede todo o entendimento, para que vocês sejam cheios de toda plenitude de Deus. Aquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós.

**Efésios 3: 17-21**

# Resumo

THALITA RODRIGUES DUARTE

## **PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR ESTIRPES MUTAGENIZADAS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS***

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Peptidases são enzimas de grande importância devido ao seu papel biológico em todos os organismos vivos e à sua aplicação industrial. Os microrganismos são uma excelente fonte de peptidases de grande diversidade estrutural e funcional. O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, e suas indústrias avícolas produzem por ano cerca de 800.000 toneladas de penas como resíduo. O descarte das penas é de grande impacto ao meio ambiente, pois sua degradação é lenta. As penas de frango contêm aproximadamente 90% de queratina, uma proteína fibrosa que apresenta pontes dissulfeto, que a tornam uma proteína altamente resistente à degradação por peptidases e estável mecanicamente. Contudo, tem sido demonstrado que as queratinases microbianas degradam queratina.

O objetivo deste estudo foi induzir em uma amostra de *Candida parapsilosis*, isolada de resíduos da indústria avícola, uma mutagênese química e selecionar os melhores produtores de queratinases usando ágar-queratina. O agente químico utilizado foi o etil metanosulfonato (3%). Foram selecionados três mutantes, denominados H36, I7 e J5, com capacidade de formação de halos em ágar-queratina. Estes mutantes selecionados foram cultivados em meio contendo penas como única fonte de carbono e nitrogênio, e demonstraram atividade queratinolítica superior à estirpe selvagem. Ensaio zimográficos com diferentes substratos protéicos demonstraram que a estirpe

selvagem e as estirpes mutantes de *C. parapsilosis* produzem peptidases que migram na faixa de 100 kDa em queratina, soro albumina bovina e caseína, uma peptidase de 35 kDa em hemoglobina, uma enzima com massa molecular de 60 kDa com capacidade de degradar gelatina, além de uma segunda peptidase de 50 kDa em caseína, porém o mutante I7 não é capaz de produzir esta enzima. As amostras apresentaram sua melhor produção de queratinases na temperatura de 37 °C e em pH 5,0, sendo o pH ótimo da atividade queratinolítica 6,0 e sua temperatura ótima 37 °C. As peptidases produzidas pela estirpe selvagem e do mutante J5 foram inibidas pela presença de PMSF (inibidor de serina-peptidase) e 1,10-fenantrolina (inibidor de metalopeptidase) quando foram usados os substratos queratina e gelatina, indicando a presença de serina- e metalopeptidases, respectivamente. Levando em consideração as múltiplas aplicações industriais das queratinases, os mutantes obtidos com etil metanosulfonato podem ser usados em vários processos biotecnológicos incluindo indústrias de detergente, farmacêuticas, para rações animais e outros setores industriais.

Palavras-chave: 1. *Candida parapsilosis* 2. mutante 3. Etil metanosulfonato 4. Peptidases 5. Queratinases 6. Queratina

Rio de Janeiro  
Agosto de 2009

# Abstract

THALITA RODRIGUES DUARTE

## **PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR ESTIRPES MUTAGENIZADAS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS***

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Peptidases are enzymes of great importance due to their biological role in all living organisms and their industrial application. Microorganisms are an excellent source of peptidases containing structural and functional diversity. Brazil is the major exporter of chicken meat in the world, and its poultry industry produces 800.000 ton of feather as agro industrial waste. The disposal of chicken feathers is of great impact to the environment, because their degradation is slow. Chicken feather contains about 90% of keratin, a fibrous protein containing disulphide bonds, which turn on the protein highly resistant to protease degradation and mechanically stable. However, it has been demonstrated that microbial keratinases degrade keratin.

The aim of this study was to induce in *Candida parapsilosis* strain, isolated from poultry industry waste, a chemical mutagenesis and select the best keratinases producers using agar-keratin medium. The chemical agent used was ethyl methanesulfonate (3%). Were selected three mutants called H36, I7 and J5 with the capacity of formation of halos on agar-keratin, and showed keratinolytic activity higher than the wild strain. These selected mutants were grown in a medium containing feather as the sole source of carbon and nitrogen. Zymogram assays with different proteic substrates showed that the wild and the mutant strains of *C. parapsilosis* produce

peptidases migrating at 100 kDa in keratin, bovine serum albumin and casein, a 35-kDa peptidase in hemoglobin, an enzyme with a molecular mass of 60 kDa that was able to degrade gelatin, besides a second peptidase of 50 kDa that was observed with casein, although the I7 mutant was unable to produce this enzyme. The samples showed the best production of keratinases at 37 °C in pH 5.0, with the optimum pH for the keratinolytic activity being pH 6.0 and the optimum temperature was 37 °C. The peptidases produced by the wild strain and the J5 mutant were inhibited by PMSF (inhibitor of serine-peptidase) and 1,10-phenanthroline (inhibitor of metallopeptidase) when keratin and gelatin were used as substrates, indicating the presence of serine- and metallopeptidases respectively. Taking into account consideration the multiple industrial applications of keratinases, these mutants obtained with ethyl methanesulfonate could be used in several biotechnology processes including detergent, pharmaceutical, animal feed and other industrial sectors.

Key-words: 1. *Candida parapsilosis* 2. Mutant 3. Ethyl methanesulfonate 4. Peptidases 5. Keratinases 6. Keratin

Rio de Janeiro  
Agosto de 2009

# Índice

<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1. Indústria avícola.....	2
2. Queratinas.....	5
3. Peptidases.....	8
4. Queratinases .....	11
5. Aplicações industriais das queratinases.....	14
6. Microrganismos queratinolíticos.....	17
7. <i>Candida</i> sp.....	19
8. Biologia molecular aplicada à produção de enzimas.....	20
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>III. Materiais e Métodos.....</b>	<b>25</b>
1. Isolamento e seleção do microrganismo queratinolítico.....	26
2. Identificação do microrganismo.....	26
3. Mutagênese da levedura.....	27
4. Obtenção do substrato queratina a partir de penas de galinha.....	27
5. Seleção dos mutantes com maior produção de queratinase.....	27
6. Cultivo dos mutantes para produção de queratinase.....	28
7. Ensaio da atividade queratinolítica.....	28
8. Efeito do pH na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo.....	29
9. Efeito da temperatura na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo.....	29
10. Ensaio da atividade gelatinolítica.....	30
11. Dosagem de proteínas.....	30
12. Cinética de crescimento e de atividade enzimática no meio com penas.....	30
13. Zimografia com gelatina, queratina, BSA, hemoglobina e caseína incorporados.....	31
14. Determinação da temperatura e pH ótimos das queratinases.....	31
	32

15. Determinação da classe proteolítica das queratinases.....	
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>33</b>
1. Isolamento e identificação do microrganismo queratinolítico.....	34
2. Obtenção da queratina a partir de penas de frango.....	35
3. Mutagênese e seleção dos mutantes .....	36
4. Efeito do pH na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo .....	38
5. Efeito da temperatura na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo.....	39
6. Cinética de crescimento e de atividade enzimática.....	40
7. Detecção de proteínas nos extratos enzimáticos da estirpe selvagem e do mutante J5 de <i>Candida parapsilosis</i> .....	43
8. Determinação do pH ótimo em zimograma com queratina incorporada....	44
9. Determinação da temperatura ótima em zimograma com queratina incorporada.....	45
10. Atividade gelatinolítica.....	47
11. Zimografia com diferentes substratos protéicos.....	47
12. Classificação das peptidases da estirpe selvagem de <i>Candida parapsilosis</i> e da estirpe mutante J5.....	50
<b>V. Discussão.....</b>	<b>53</b>
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>61</b>
<b>VII. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>63</b>

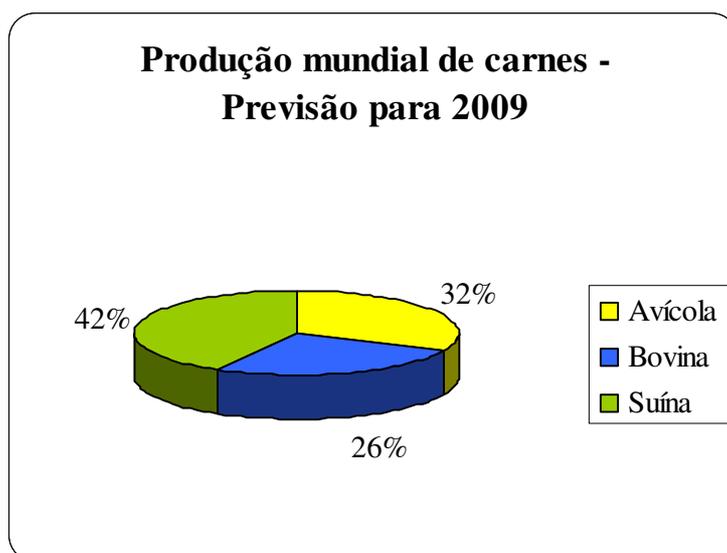
# Lista de abreviaturas

- ABEF: Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango
- AGE: Assessoria de Gestão Estratégica
- BSA: soro albumina bovina
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- E-64: L-*trans*-epoxisuccinil L-leucilamida-(4-guanidino)-butano
- EMS: Etil metanosulfonato
- INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MMS: Metil metanosulfonato
- MNNG: N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
- NC-IUBMB: Nomenclatura Enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
- nm: nanômetro
- PMSF: fenilmetil sulfonil fluoreto
- rpm: Rotação por minuto
- SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
- SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
- TCA: ácido tricloroacético
- UFC: Unidade formadora de colônia
- USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
- V: volts

# *I. Introdução*

## 1. Indústria Avícola

O relatório do *Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA)* divulgado no final do ano de 2008 trouxe as perspectivas para a produção, o consumo e o comércio internacional para as três principais carnes em 2009 (figura 1). Apesar do crescimento mais lento a ser observado neste ano, a carne de frango deve registrar o maior crescimento na produção entre as três principais carnes. Os dados do USDA sugerem que, em 2009, a produção total de carnes deve ser da ordem de 231 milhões de toneladas, contra 228 milhões em 2008. A produção mundial de carne de frango deve registrar um crescimento mais lento que em 2008, com aumento de 4%, chegando a 74 milhões de toneladas em todo o mundo. A produção de carne bovina, entretanto, deve se manter estável em aproximadamente 59 milhões de toneladas. Para a carne suína é previsto um aumento de 1% na produção, totalizando 97,9 milhões de toneladas.



**Figura 1:** Previsão para 2009 da produção mundial de carnes - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2009 (USDA).

Em novas projeções sobre as tendências brasileiras de produção, exportação e oferta interna de carne de frango em 2009, o USDA sugere que o volume produzido no ano pode aumentar cerca de 3% em relação aos 11,033 milhões de toneladas de 2008 e, assim, chegar aos 11,360 milhões de toneladas – média de quase 950 mil toneladas mensais (figura 2). Embora em um ritmo de crescimento menos acelerado que o observado em 2008 que teve um incremento de 10,95%, as exportações de carne de

frango também devem crescer neste ano e chegar aos 3,306 milhões de toneladas, média de 275,5 mil toneladas mensais. Como consequência dessas previsões, a oferta interna do produto deve ultrapassar ligeiramente os oito milhões de toneladas, aumentando cerca de 3,5% em relação a 2008. É oportuno notar que estão inclusas nessas projeções apenas as exportações de carne de frango in natura, o que significa dizer que não foi considerado o produto industrializado e a carne de frango salgada que, no ano passado, corresponderam a, aproximadamente, 11% do volume total exportado (perto de 3,646 milhões de toneladas, conforme a ABEF - Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango).

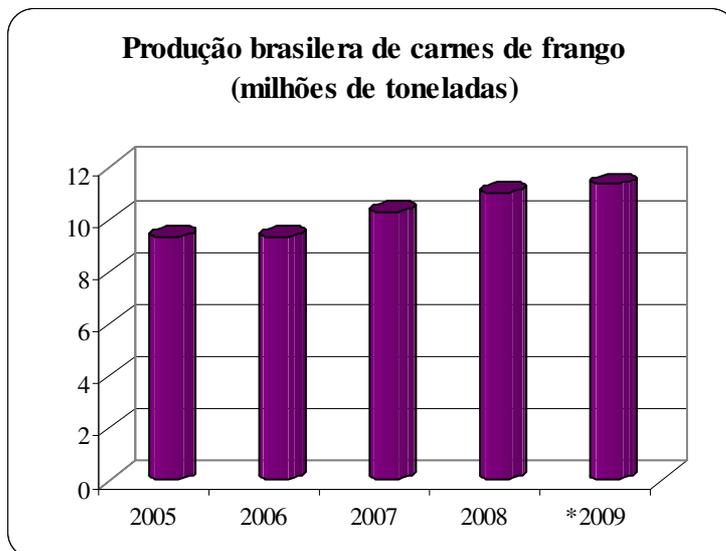
Foi divulgada recentemente a quarta versão do trabalho “Projeções do Agronegócio”, que é atualizado anualmente, abrangendo o período 2008/09 a 2018/19. Este trabalho teve como objetivo, de acordo com a Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pela elaboração do projeto, proporcionar uma visão prospectiva do setor agropecuário.

As atuais projeções da AGE/MAPA apontam que a produção brasileira de carne de frango deve aumentar bem mais de 50% nos próximos 10 anos, o que significa chegar a 2019 com um volume da ordem de 17,44 milhões de toneladas. Em 2019, a carne de frango deve continuar como a segunda carne mais consumida pelos brasileiros, mas com uma distância bem menor que a atual em relação à carne bovina, pois, pelas projeções da AGE/MAPA, é a que tem maior potencial de expansão entre as três. Assim, para incremento de 21% no consumo de carne suína e de 28% no de carne bovina, é previsto aumento de 33% para a carne de frango ([www.avisite.com.br/revista](http://www.avisite.com.br/revista) - Abril 2009).

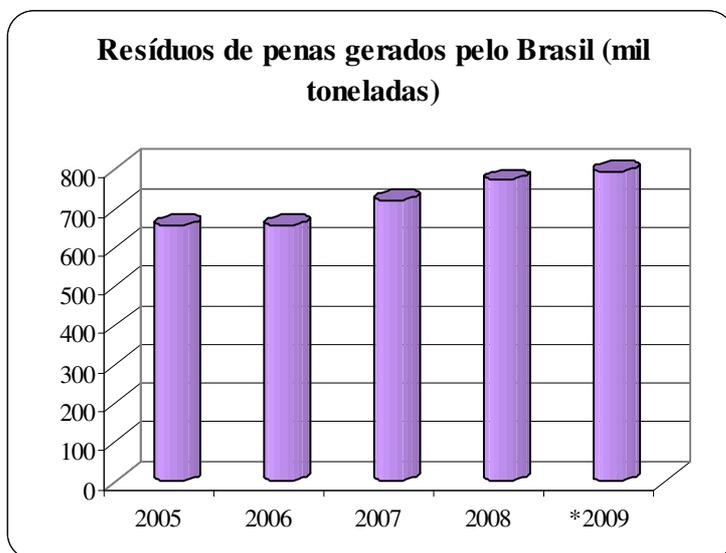
A preocupação com a proteção ambiental vem crescendo e a procura por materiais potencialmente úteis tem conduzido ao desenvolvimento de algumas tecnologias para bioconversão de resíduos queratinolíticos em outros produtos (SINGH, 1999). A utilização de microrganismos capazes de degradar a queratina, que podem ser aplicados biotecnologicamente para aumentar a digestibilidade e o valor nutricional da farinha de penas, se apresenta como uma tecnologia de baixo custo energético e favorável ao meio ambiente (ONIFADE *et al.*, 1998).

As penas representam cerca de 5 a 7% do peso total do frango (ONIFADE *et al.*, 1998). A quantidade de penas residuais durante o ano de 2008 no Brasil foi cerca 772 mil toneladas, e a expectativa para 2009 é que 795 mil toneladas de penas residuais sejam produzidas (figura 3), as quais são constituídas praticamente de queratina pura

(90%) sendo a queratina responsável pelo alto grau de recalcitração deste resíduo da indústria avícola (ALLPRESS, MOUNTAIN & GOWLAND, 2002).



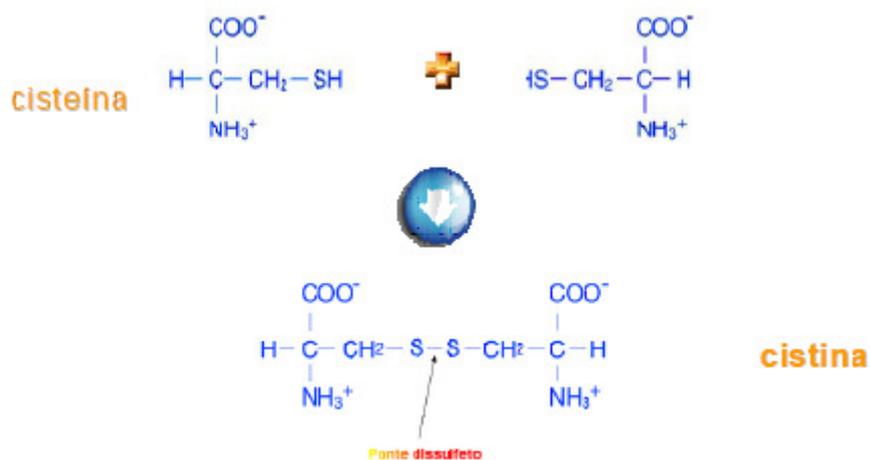
**Figura 2:** Produção brasileira de carnes de frango nos últimos anos em milhões de toneladas. \* Expectativa de produção. **Fonte:** AVISITE – [www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br), 2009; Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2009 (USDA).



**Figura 3:** Penas geradas como resíduo pelas indústrias avícolas no Brasil nos últimos anos. \* Expectativa. **Fonte:** AVISITE – [www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br), 2009; Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 2009 (USDA).

## 2. Queratinas

Queratinas são proteínas estruturais insolúveis encontradas em penas, lã, escamas, cascos, cabelo, unhas e outras estruturas epidérmicas de proteção (VIGNARDET *et al.*, 1999), conhecidas como as principais proteínas estruturais das células epiteliais, onde ocorrem como filamentos intermediários do citoesqueleto (YAMADA, WIRTZ & COULOMBE, 2002). Estas proteínas apresentam alta estabilidade mecânica devido à composição e configuração molecular dos seus aminoácidos, que garantem rigidez estrutural. A estrutura estável e rígida e a baixa solubilidade deve-se a presença de alto teor de unidades de cistina formando pontes dissulfeto intra- e inter-cadeia (figura 4). A formação destas pontes ocorre pela oxidação dos grupos SH de duas moléculas do aminoácido cisteína. Além dessas pontes, também são encontradas pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas, dentre outras interações, que resultam na estabilização da molécula (SCHROOYEN *et al.*, 2001).

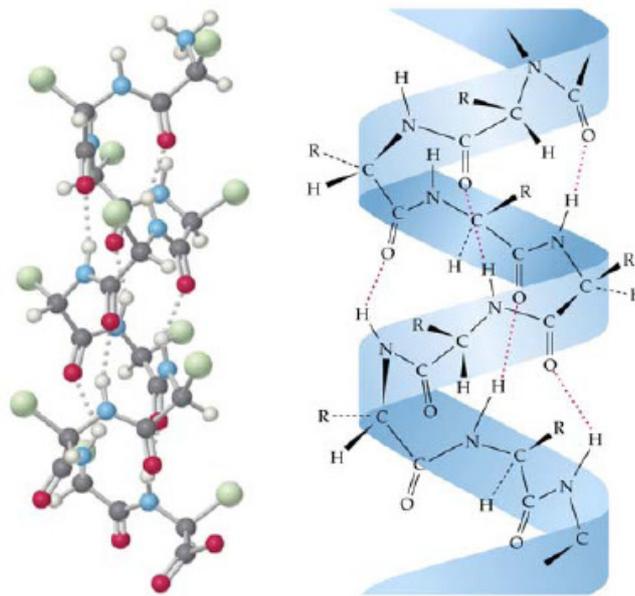


**Figura 4:** Duas unidades de cisteína, formando a cistina.

Essas proteínas são agrupadas em duras ou macias, de acordo com seu teor de cisteína. As queratinas duras contêm muitas pontes dissulfeto, e as queratinas macias, apresentam poucas pontes dissulfeto na sua constituição (VOET & VOET, 1995; SCHROOYEN *et al.*, 2001).

Com base na conformação estrutural, as queratinas são classificadas em  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -pregueada (VOET & VOET, 1995). As fibrilas da queratina em ambas as configurações de maneira paralela formam micro e macro fibrilas, que garantem a estabilidade para a fibra (KREPLAK *et al.*, 2004; ZERDANI, FAID, & MALKI, 2004).

As  $\alpha$ -queratinas são filamentos de proteínas presentes em camadas da epiderme de alguns animais, principalmente mamíferos, onde têm um papel de resistência mecânica e determinação da forma das células e suas mudanças (FUCHS & MARCHUK, 1983; STEINERT & FREEDBERG, 1991; COULOMBE & OMARY, 2002), sendo também um dos principais componentes estruturais de cabelos humanos. Apresentam estrutura terciária em  $\alpha$ -hélice (figura 5), e massa molecular em torno de 60 – 80 kDa (SIERPINSKI *et al.*, 2008).



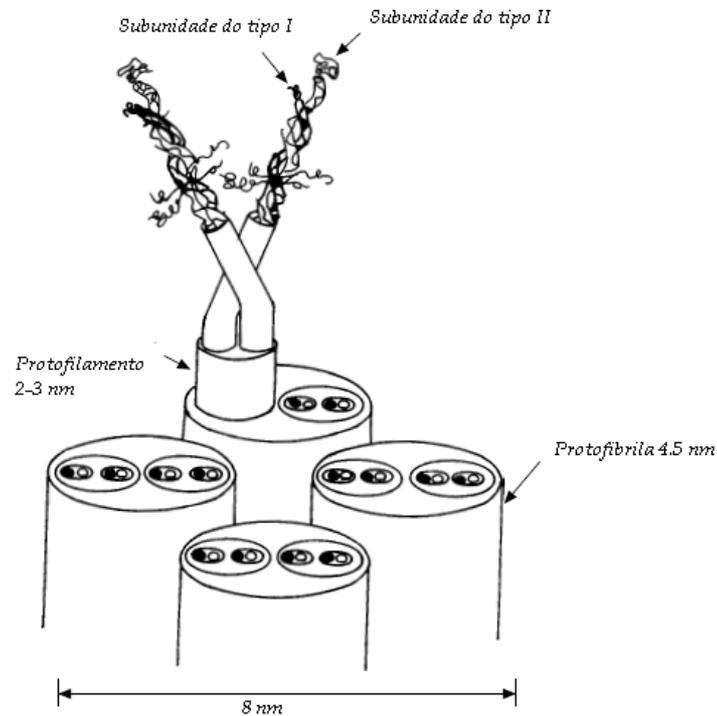
**Figura 5:** Estrutura em hélice da  $\alpha$ -queratina

FUCHS *et al.* (1987) mostraram que os tetrâmeros ou protofilamentos são formados por um arranjo antiparalelo de dois dímeros. Dois desses tetrâmeros formam uma protofibrila, e geralmente quatro protofibrilas reunidas formam um filamento de 8 - 10 nm (Figura 6).

As  $\beta$ -queratinas (figura 7) são pequenas proteínas presentes em escamas de répteis, bicos, garras e penas de aves. Sua conformação é predominantemente  $\beta$ -pregueada. Os filamentos da  $\beta$ -queratina se diferenciam dos filamentos da  $\alpha$ -queratina na composição, propriedades físico-químicas e pelo mecanismo de polimerização (ALIBARDI & TONI, 2008).

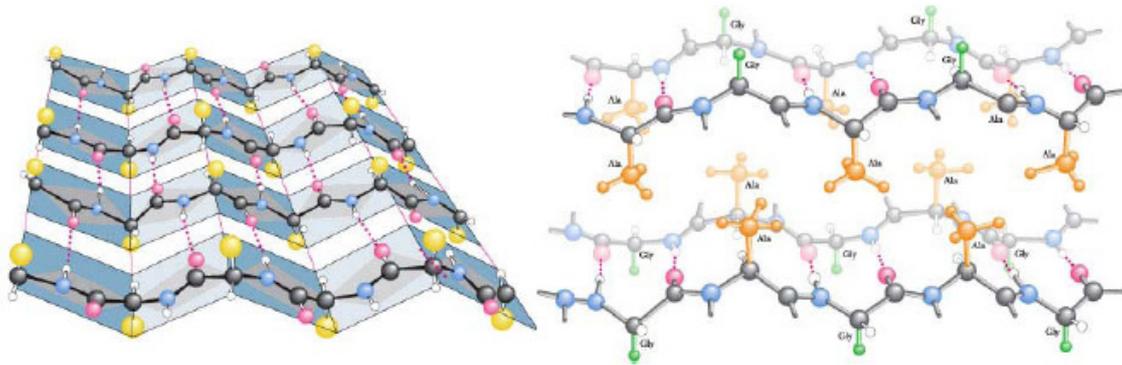
Análises proteômicas mostram que  $\beta$ -queratinas presentes em crocodilos têm massa molecular em torno de 17-20 kDa, enquanto as massas moleculares da epiderme de galinhas é de 15-20 kDa, suas garras de 12-14 kDa, e as penas de 10 kDa. Os

aminoácidos mais representativos dessas queratinas são glicina (11-15%), serina (15-17%), prolina (11-12%) e cisteína (8-8,5%).



**Figura 6:** Representação esquemática do filamento intermediário da queratina (RAO, BABU & GUPTA, 1996).

As penas são formadas principalmente por  $\beta$ -queratina, uma proteína resistente a agentes químicos e à lise enzimática (KORNILLOWICZ-KOWALSKA, 1997), resistência conferida pelas inúmeras pontes dissulfeto que apresenta (ICHIDA *et al.*, 2001). O teor de cisteína contida na sequência de aminoácidos é de 7% (ARAI *et al.*, 1983). Sua cadeia polipeptídica é composta por 40% de grupos químicos hidrofílicos e 60% de grupos químicos hidrofóbicos.



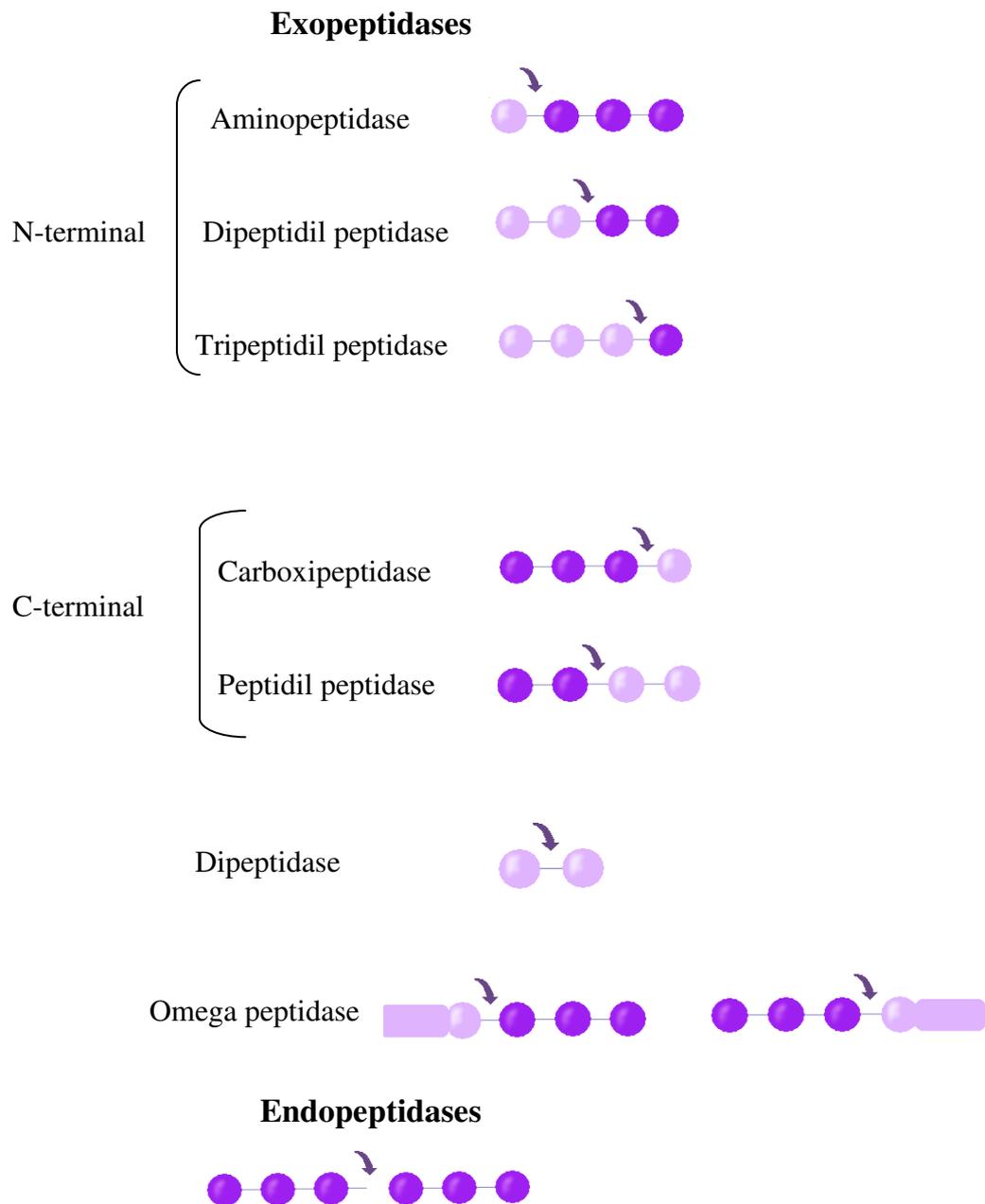
**Figura 7:** Estrutura das  $\beta$ -queratinas.

### 3. Peptidases

Peptidases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. Os termos proteases e proteinases também são usados para se referir a essas enzimas, no entanto o termo peptidase é recomendado pelo Comitê de Nomenclatura Enzimática da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB).

De acordo com o NC-IUBMB, as peptidases pertencem à classe das hidrolases (EC 3), e sub-classe EC 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). Essas enzimas são divididas em exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-24 e EC 3.4.99), segundo o tipo de reação catalisada (figura 8). As exopeptidases atuam somente nas regiões terminais da cadeia polipeptídica; quando clivam ligações peptídicas na porção amino-terminal liberando um único aminoácido, um dipeptídeo, ou um tripeptídeo são denominadas, respectivamente, aminopeptidases (EC 3.4.11), dipeptidil-peptidases, e tripeptidil-peptidases (EC 3.4.14). Exopeptidases que atuam na região carboxi-terminal são chamadas de carboxipeptidases (EC 3.4.16-18) quando liberam um único aminoácido, e peptidil-peptidases (EC 3.4.15) quando liberam um dipeptídeo. Algumas exopeptidases são específicas na hidrólise de dipeptídeos, sendo denominadas dipeptidases (EC 3.4.13). Outras podem remover resíduos de aminoácidos substituídos, ciclizados ou ligados por ligação isopeptídica, neste último caso denominadas omega peptidases (EC 3.4.19). As endopeptidases clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica, e de acordo com o grupamento químico envolvido no sítio catalítico são divididas em: serina-peptidases (EC 3.4.21), cisteína-peptidases (EC 3.4.22), aspártico-peptidases (EC 3.4.23), metalopeptidases (EC 3.4.24) e treonina-peptidases (EC 3.4.25). Endopeptidases que apresentam características diferentes, não podendo se enquadrar

nessas classificações, formam uma outra sub-subclasse, a EC 3.4.99. As carboxipeptidases também podem ser classificadas de acordo com a natureza química do sítio catalítico, sendo assim classificadas: serina-peptidases (EC 3.4.16), metalopeptidases (EC 3.4.17), e cisteína-peptidases (EC 3.4.18). Atualmente, existe um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases, que apresentam ácido glutâmico no sítio ativo, previamente classificadas como aspártico-peptidases, insensíveis à pepstatina, que ainda não foram incluídas pelo NC-IUBMB, embora sejam um família reconhecido pelo MEROPS. A figura 1 mostra a classificação das peptidases pelo tipo de reação catalisada.



**Figura 8:** Classificação das peptidases de acordo com o tipo de reação catalisada.

Com a descoberta de novas peptidases os sistemas de classificação que empregam o tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio catalítico se mostraram insuficientes para classificar todas as peptidases. Paralelamente com o avanço das técnicas para o estudo das proteínas, a estrutura primária, secundária, terciária e quaternária e o sequenciamento dos aminoácidos do polipeptídeo e do sítio ativo passaram a ser usados como mais um tipo de classificação permitindo a inclusão de um grande número de peptidases neste moderno sistema de classificação.

Dessa forma, foi criado o sistema MEROPS, uma plataforma para o estudo das peptidases, que agrupa as enzimas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. Por sua vez, as famílias de mesma origem ancestral são agrupadas em clãs, sendo este tipo de informação determinada pela estrutura terciária das peptidases.

Uma peptidase é agrupada em uma família, quando apresenta similaridade com a sequência de aminoácidos da estrutura primária. A identificação das famílias é formada de letras e números. As letras representam o tipo catalítico: A, aspártico; C, cisteína; M, metalo; S, serina; T, treonina; G, glutâmico ou U, para algum tipo desconhecido. Os números são arbitrários, não sequenciais. Algumas famílias contêm dois ou mais grupos distintos que diferem grandemente na estrutura primária. A estrutura de cada família pode ser graficamente representada na árvore filogenética, e os grupos que formam ramificações separadas por divergências são reconhecidas como subfamílias.

Os clãs são formados por grupos de famílias que apresentam evidências de um ancestral comum. Essas evidências são provenientes de similaridades nas estruturas terciárias determinadas por cristalografia ou similaridades na ordem de resíduos catalíticos na sequência linear e em sequências em torno de resíduos catalíticos. A denominação dos clãs é feita por duas letras: a primeira letra representa o tipo catalítico das peptidases do clã e a segunda letra é adicionada não sequencialmente. Um clã que contém famílias de mais de um tipo catalítico é descrito como sendo do tipo P (RAWLINGS *et al.*, 2008).

As peptidases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em todos os organismos vivos. Estas enzimas participam de processos fisiológicos essenciais como coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos (ROOSE & VAN NOORDEN, 1995) e no processo de invasão de um grande número de microrganismos patogênicos (MCKERROW, 1999). Além disto, possuem inúmeras aplicações industriais e estão entre os três maiores grupos de enzimas comercializadas.

As peptidases são utilizadas nas indústrias de detergente, couro e farmacêutica entre outras (GUPTA, BEG & LORENZ, 2002). A impossibilidade das peptidases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas peptidases de origem microbiana. Cerca de 40% das peptidases mundialmente vendidas são de origem microbiana devido a grande procura, dada à facilidade de manipulação genética dos microrganismos, à grande diversidade bioquímica encontrada e o curto tempo de geração (BON & VERMELHO, 2004).

#### 4. Queratinases

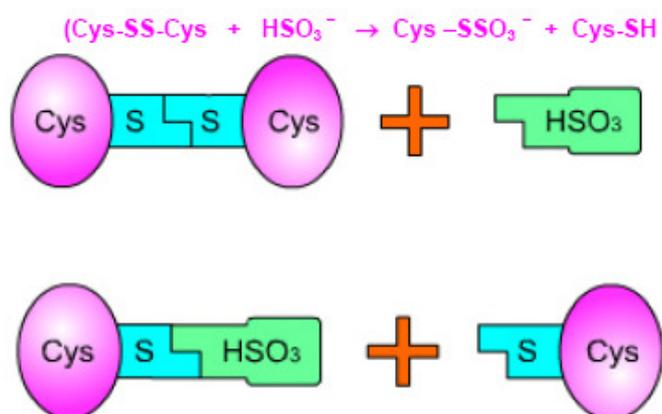
As queratinases são enzimas proteolíticas que demonstram a capacidade de degradar substratos queratinolíticos. Estas enzimas têm se tornado de grande importância nos últimos anos, apresentando aplicações potenciais na degradação de substratos ricos em queratina como bioprodutos gerados principalmente por processos agroindustriais, como por exemplo, as penas de frango descartadas pela indústria avícola (BRANDELLI, 2008).

As enzimas queratinolíticas são largamente encontradas na natureza, produzidas por vários microrganismos, principalmente isolados de resíduos da indústria avícola. Uma grande variedade de microrganismos procarióticos, como as bactérias, incluindo os actinomicetos; e organismos eucarióticos, como os fungos, são conhecidos pela capacidade de degradar a queratina (GUPTA & RAMNANI, 2006). Estas enzimas são geralmente de caráter indutível, necessitando de queratina como indutor exógeno. No entanto, alguns microrganismos apresentam produção constitutiva de queratinases, como *Candida albicans* (KAPICA & BLANK, 1957, 1958) e *Chrysosporium keratinophilum* (DOZIE, OKEKE & UNAEZE, 1994). Em relação às características bioquímicas das queratinases, a maioria destas enzimas têm sido identificada como serina-peptidases (NAM *et al.*, 2002) e metalopeptidases (FARAG & HASSAN, 2004), mas já foi encontrada em *C. albicans* uma aspártico-peptidase com atividade queratinolítica (HATTORI *et al.*, 1984).

As queratinases são predominantemente extracelulares, contudo algumas queratinases intracelulares têm sido descritas (ONIFADE *et al.*, 1998). A maior parte destas enzimas são endopeptidases, mas já foi descrito atividade de exopeptidase em

*Keratinomyces ajelloi* e *Trichophyton gallinae* (RUFFLIN *et al.*, 1979; WAWRZKIEWICZ, LOBARZEWSKI & WOLSKY, 1987).

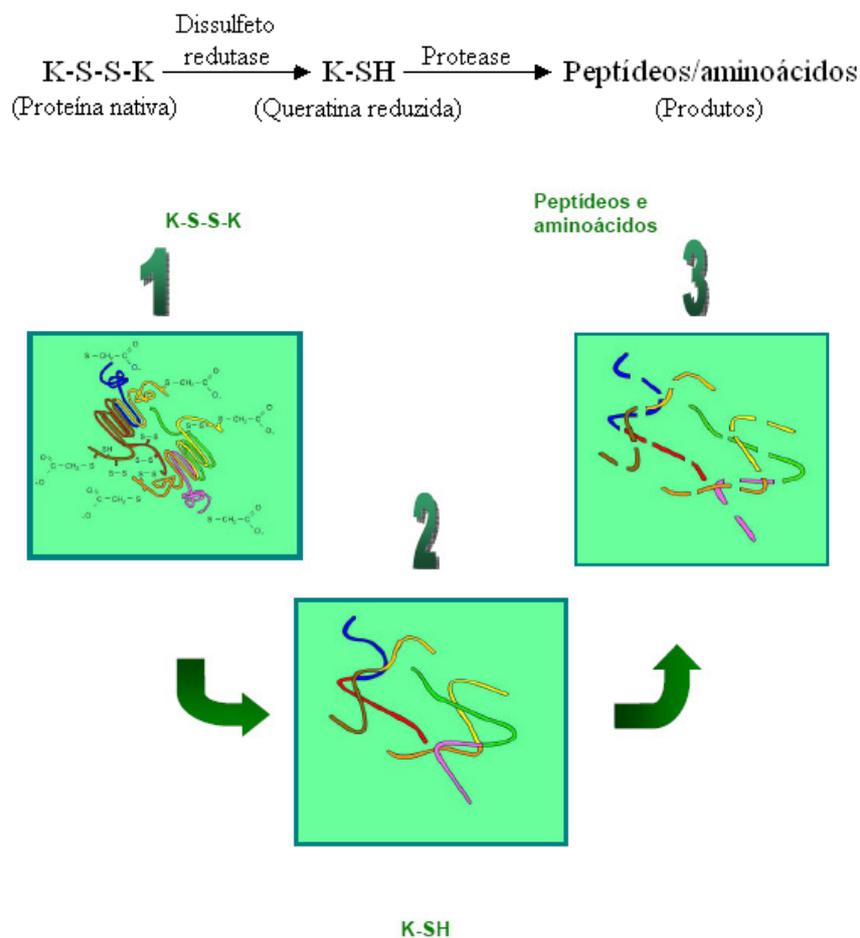
O mecanismo de hidrólise da queratina não é totalmente conhecido, sendo propostas duas teorias para explicar como ocorre esse fenômeno. KUNERT (1992) formulou a hipótese de que a completa desnaturação da queratina ocorreria somente após a clivagem de pontes dissulfeto promovida pela sulfitólise. Enzimas proteolíticas de fungos queratinolíticos, embora sejam frequentemente chamadas queratinases, são incapazes de degradar a queratina na forma nativa. A desnaturação desta proteína seria alcançada após o rompimento das pontes dissulfeto, que representam a principal fonte de resistência da queratina. KUNERT (1992) realizou experimentos que demonstraram que fungos dermatófitos crescem no meio com cistina (duas unidades de cisteína ligadas por uma ponte dissulfeto) livre ou combinada. Eles metabolizam intensamente esta substância, excretando para o meio o excesso de enxofre na forma de sulfato e/ou sulfito. O sulfito reage com a cistina em solução neutra ou alcalina, clivando em cisteína e S-sulfocisteína, segundo a reação apresentada na figura 9.



**Figura 9:** Mecanismo de sulfitólise.

Esta reação também ocorre em cistina combinada com proteínas, incluindo a queratina. A hipótese apresentada sugere que a queratina é desnaturada antes pela ação das peptidases por excreção de sulfito, que ocasiona a sulfitólise. Esta hipótese foi sustentada por experimentos que revelaram a presença de produtos de sulfitólise (peptídeos contendo S-sulfocisteína) no meio com queratina. Além disso, LLOYD (1986) demonstrou a ativação da proteólise por redução de pontes dissulfeto do substrato, e EVERETT, GORDON & WINDUS (1962) demonstraram a degradação de lã de ovelha por peptidases não-específicas na presença de agentes redutores.

YAMAMURA *et al.* (2002) isolaram e caracterizaram duas enzimas de *Stenotrophomonas* sp., cepa D-1, que atuam em cooperação para a completa hidrólise da queratina. Uma das enzimas atua na redução de pontes dissulfeto, sendo denominada dissulfeto redutase; e a outra enzima é uma serina-peptidase. O grupo testou a especificidade da dissulfeto redutase e observou que esta enzima também é capaz de clivar pontes dissulfeto de colágeno e elastina, enquanto não teve atuação em caseína, que é um substrato que não apresenta pontes dissulfeto. Após a combinação das duas enzimas houve um aumento da atividade enzimática sobre proteínas rígidas (queratina de cabelo humano, elastina e colágeno) se comparado com a atividade isolada da serina-peptidase da cepa D-1, demonstrando dessa forma a efetiva degradação da queratina realizada pela cooperação das duas enzimas (figura 10).



**Figura 10:** Mecanismo proposto da degradação da queratina pela ação cooperativa de duas enzimas (YAMAMURA *et al.*, 2002). 1- Queratina nativa; 2- Redução de pontes dissulfeto pela enzima *dissulfeto redutase*; 3- Peptidases degradam monômeros de queratina em peptídeos e aminoácidos.

## 5. Aplicações industriais de queratinases

O uso de microrganismos queratinolíticos surgiu como uma alternativa para a reciclagem de bioprodutos de queratina, gerados principalmente pelas indústrias avícolas e indústrias de couro. Sendo assim, o desenvolvimento de processos que possam converter esses resíduos em outros produtos tem sido investigado (ZAGHLOUL *et al.*, 2004; BERTSCH & COELLO, 2005; GRAZZIOTIN *et al.*, 2007).

A grande quantidade de penas geradas pelo processamento de carne de frango pode causar impacto ao meio ambiente e precisa de adequado manejo (SHIH, 1993). Atualmente, as penas são convertidas em farinha de penas por um processo de cozimento a altas temperaturas e elevada pressão, que requer muita energia. Neste processo 50-70% das pontes dissulfeto são clivadas permitindo uma melhora na digestibilidade da queratina. Essa farinha tem sido usada como ingrediente para ração animal, apesar de ser deficiente em alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina, e triptofano, resultando em um produto com baixa digestibilidade e qualidade nutricional variável (PAPADOPOULOS *et al.*, 1986; WANG & PARSONS, 1997). O uso das queratinases para aumentar o valor nutricional das penas ou farinha de penas tem sido descrito (ONIFADE *et al.*, 1998; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006).

Indústrias direcionadas a alimentação animal são os principais consumidores de hidrolisados de queratina provenientes de penas, visto que a degradação da pena é de grande interesse para a nutrição animal por causa de seu potencial como um recurso protéico alternativo e barato (WILLIAMS *et al.*, 1991).

A suplementação dietética de queratinase em frangos de corte tem sido estudada, sendo relatado que a dieta milho-soja suplementada com queratinase aumentou significativamente o crescimento dos frangos em diferentes estágios de vida (ODETALLAH *et al.*, 2003, 2005). WANG, GUO & SHIH (2007) confirmaram os resultados descritos acima, além disso, demonstraram que a dieta de frangos suplementada com queratinase aumenta o peso dos frangos e a taxa de conversão alimentar das dietas compostas de milho e soja ou milho, soja e sementes de algodão.

POOPATHI & ABIDHA (2008) descreveram o uso de penas de frango para o cultivo de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* sorotipo *israelensis*, com o objetivo da produção de endotoxinas capazes de matar larvas de mosquitos. Essas espécies de *Bacillus* têm ganhado importância em programas de controle de insetos,

como uma alternativa ao uso de inseticidas convencionais. A atividade larvicida é devido a toxinas intracelulares sintetizadas durante a esporulação. O custo da produção de toxinas por *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* sorotipo *israelensis* utilizando meio de cultura convencional é muito alto, então a utilização de penas descartadas da indústria avícola para a produção das toxinas bacterianas em cultura tem sido proposta. Além disso, essa abordagem contribui para a diminuição do impacto ambiental causado por estes resíduos.

A produção das queratinases usando farinha de penas ou penas como base de meios de cultivo tem sido demonstrada. Contudo, vários fatores como pH, concentração da pena, do inóculo e a temperatura podem influenciar a atividade enzimática, que pode ser aumentada até quarenta vezes após otimização (WANG & SHIH 1999; BRANDELLI & RIFFEL, 2005).

O processamento do couro envolve uma série de processos que são altamente poluentes, e o principal causador da poluição gerada nos curtumes é o sulfeto de sódio, que gera gás sulfídrico. A depilação enzimática é vista cada vez mais como uma alternativa para evitar impactos ambientais (CANTERA, 2001; THANIKAIVELAN *et al.*, 2004). Contudo, esse processo ainda não é muito utilizado, pois o uso das enzimas torna o processo mais caro do que o uso de agentes químicos (SCHRAEDER, ERVIN, & EBERRSPACHER, 1998). O potencial das queratinases para uso comercial na produção de couro é considerável pelas suas propriedades, como alta eficiência e catalisadores seletivos. Uma característica importante do processo de depilação enzimática é a completa remoção de pêlos e o uso de quantidades mínimas de sulfeto. Dessa maneira, a substituição de agentes químicos depilatórios na indústria de couro por enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos tem importância econômica e ambiental.

Amostras queratinolíticas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* têm sido bem caracterizadas, apresentando propriedades desejáveis para o processamento do couro (GEORGE *et al.*, 1995; VARELA *et al.*, 1997; MACEDO *et al.*, 2005; GIONGO *et al.*, 2007). O fato de que essas queratinases podem degradar queratina evitando danos a outras proteínas estruturais como colágeno, fazem destas enzimas excelentes candidatas para serem usadas na indústria de couro (RIFFEL, ORTOLAN, & BRANDELLI, 2003).

Com o avanço do conhecimento sobre as queratinases e sua ação na degradação da queratina, novas aplicações têm sido sugeridas para estas enzimas (figura 11). As queratinases apresentam características atrativas para serem usadas em cosméticos e produtos farmacêuticos, onde o colágeno não pode ser destruído. Além disso, também podem ser usadas em formulações tópicas para eliminação de acne e psoríase (BRANDELLI, 2008).

Recentemente, o uso de enzimas queratinolíticas para melhorar a absorção de medicamentos foi investigado. A eficácia de terapias tópicas para doenças de unhas é geralmente limitada pela baixa permeabilidade dos medicamentos através de placa ungueal. A presença da queratinase de *Paecilomyces marquandii* aumentou significativamente a absorção de drogas através da unha humana (MOHORCIC *et al.*, 2007).

Príons são agentes causadores de doenças degenerativas, transmissíveis e fatais, incluindo o tumor epizoótico, que afeta o sistema nervoso central de ovinos e caprinos e também a encefalopatia espongiforme bovina, mais conhecida como doença da vaca louca. A queratinase PWD-1 demonstra um grande espectro de atividade e também hidrolisa o príon PrP<sup>sc</sup>, o agente responsável pela encefalopatia espongiforme bovina (LANGEVELD *et al.*, 2003).

Há um grande interesse na conversão de queratinas em filmes e revestimentos biodegradáveis para aplicações agrícolas e biomédicas. A queratina é quimicamente ou enzimaticamente tratada e a queratina modificada resultante é convertida em produtos aplicados em filmes comestíveis ou para agricultura (YAMAUCHI *et al.*, 1996; SCHROOYEN *et al.*, 2001; ZAGHLOUL *et al.*, 2004).

BÁLINT *et al.* (2005) descreveram um sistema de fermentação em dois estágios, para converter resíduos queratinolíticos no gás biohidrogênio. Inicialmente, uma amostra de *Bacillus* é usada para degradar materiais contendo queratina. Nesta etapa, esses materiais são convertidos em produtos ricos em peptídeos e aminoácidos. A mistura pode ser subsequentemente usada como recurso de nutrientes para o anaeróbico termofílico *Thermococcus litoralis*, que é capaz de produzir H<sub>2</sub> como produto fisiológico.

A queratina presente em resíduos agroindustriais também tem sido considerada como um fertilizante de solo. As penas são constituídas de aproximadamente 15% de nitrogênio, apresentando potencial para serem usadas como fertilizantes de lenta liberação de nitrogênio (BRANDELLI, 2008).



**Figura 11:** Aplicações industriais da queratinases. Baseado em BRANDELLI (2008).

A aplicação das queratinases em detergentes é uma aplicação recente destas enzimas, e as peptidases alcalinas de *Bacillus* já têm sido utilizadas há várias décadas dessa forma. Estas enzimas podem remover resíduos de queratina que são frequentemente encontrados nas golas e colarinhos. Também podem ser usadas como aditivos para a drenagem e desentupimento de tubulações com resíduos de queratina (GUPTA & RAMNANI, 2006).

## 6. Microrganismos queratinolíticos

As enzimas queratinolíticas são produzidas por uma grande variedade de microrganismos, frequentemente isolados de solos ricos em substratos com queratina. No entanto, as queratinases melhor caracterizadas são as de fungos dermatófitos isolados de humanos e animais, importantes por estarem relacionadas com os mecanismos de patogenicidade destes microrganismos (RIFFEL & BRANDELLI, 2006; GRADISAR, KERN & FRIEDRICH, 2000). As queratinases têm sido isoladas e caracterizadas nas espécies de *Microsporum* sp. (MIGNON *et al.*, 1998; BROUTA *et al.*, 2001), *Trichophyton* sp. (ABDEL-RAHMAN, 2000) e *Scopulariopsis brevicaulis*

(MALVIYA, RAJAK & HASIJA, 1992). Amostras de *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* também foram descritas como amostras queratinolíticas (SANTOS *et al.*, 1996). Além disso, uma amostra de *Aspergillus orizae* foi isolada de sedimento marinho demonstrando a capacidade de produzir queratinases (FARAG & HASSAN, 2004). Fungos não dermatófitos também têm sido caracterizados como queratinolíticos pela sua capacidade de degradar a queratina, e suas enzimas têm sido bem estudadas e caracterizadas (MALVIYA 1993 a,b; DOZIE; OKEKE & UNAEZE, 1994).

Como muitas espécies de fungos queratinolíticos são patogênicas, os estudos mais recentes concentram-se em bactérias queratinolíticas como fonte destas enzimas para uso industrial (VERMELHO *et al.*, 2008). Embora grande parte das bactérias queratinolíticas isoladas de solos e resíduos de indústrias avícolas sejam pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, alguns estudos indicam que a diversidade de bactérias queratinolíticas é grande. Entre as bactérias Gram-positivas, algumas novas espécies produtoras de queratinases estão sendo descritas, como *Arthrobacter* sp. (LUCAS *et al.*, 2003), *Microbacterium* sp. (THYS *et al.*, 2004), e *Kocuria rosea* (BERNAL, CAIRÓ, & COELLO 2006).

A atividade queratinolítica tem sido descrita para várias espécies de *Streptomyces*, sendo muitas destas termofílicas isoladas de solo, que podem crescer e degradar queratina a temperaturas acima de 50 °C (CHITTE *et al.*, 1999; MOHAMEDIM, 1999). Um novo isolado de *Streptomyces gulbargensis* termotolerante foi descrito como produtor de queratinases. O máximo da sua atividade queratinolítica foi encontrado na temperatura de 45 °C e em pH 9,0 (SYED *et al.*, 2009). Contudo, algumas amostras mesofílicas também são descritas como queratinolíticas, como *Streptomyces pactum* DSM 40530 (BÖCKEL, GALUNSKI, & MÜLLER, 1995) e *S. albidoflavus* K<sub>1-02</sub> (BRESSOLIER *et al.*, 1999). Em adição *S. pactum* pode reduzir pontes dissulfeto durante o crescimento em penas (BÖCKLE & MULLER, 1997).

O gênero *Bacillus* apresenta atividade queratinolítica bem caracterizada. Várias amostras de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* são descritas como produtoras de queratinases (LIN *et al.*, 1999; SUH & LEE, 2001), mas outras espécies também já foram descritas como queratinolíticas, como o *Bacillus pumilis* e *Bacillus cereus* (KIM, LIM & SUH, 2001; WERLANG & BRANDELLI, 2005).

Recentemente, bactérias Gram-negativas estão sendo associadas com a produção de queratinases. As amostras de *Vibrio* sp. (SANGALI & BRANDELLI, 2000), *Xanthomonas maltophilia* (DE TONI *et al.*, 2002), *Stenotrophomonas* sp.

(YAMAMURA *et al.*, 2002) e *Chryseobacterium* sp. (RIFFEL & BRANDELLI, 2002) foram isoladas de penas de aves em decomposição.

## **7. *Candida* sp.**

No gênero *Candida* se encontram espécies que são patógenos principalmente em pacientes imunocomprometidos, particularmente HIV-positivos, transplantados, entre outros. Estudos anteriores mostram que *Candida albicans* é a espécie mais isolada (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2007). Embora a grande maioria dos estudos sobre leveduras do gênero *Candida* relatem estes microrganismos sendo isolados de humanos e animais, VITAL *et al.* (2002) isolaram várias espécies de leveduras, inclusive do gênero *Candida*, do solo da Estação Ecológica de Maracá em Roraima.

Geralmente os estudos sobre isolamento de leveduras no ambiente focam ecossistemas terrestres, mas ambientes aquáticos também podem conter altas concentrações de nutrientes para suportar populações de leveduras. SOARES *et al.* (1997) descreveram várias espécies de *Candida* isoladas de estuários do sudeste do Brasil. Acredita-se que estas possam estar envolvidas na decomposição, ciclo de nutrientes e biotransformação do petróleo e outros compostos complexos (AHEARN & MEYERS, 1972; MACGILLIVRAY & SHIARIS, 1993). As leveduras do gênero *Candida* possuem tanto importância clínica como diversas aplicações industriais, principalmente na indústria de alimentos. A levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 tem sido muito estudada, objetivando seu uso em um processo biotecnológico para a produção de xilitol. Estes fungos têm sido usados para produção de emulsificantes para fermentação de substratos insolúveis, como óleo de babaçu na indústria de alimento e bebidas (SARUBBO, PORTO & TAKAKI, 1999). O impacto das leveduras na produção, qualidade e segurança de alimentos e bebidas está intimamente ligado a sua ecologia e atividades biológicas, onde se destacam as peptidases (FLEET, 2007).

Devido ao aumento de infecções causadas por *Candida* sp., há um grande interesse nos possíveis fatores envolvidos durante a interação levedura-célula hospedeira. Dentre estes fatores destacam-se as peptidases, cujo papel fisiológico durante a interação microrganismo-célula hospedeira pode ser a degradação de mucosas, facilitando a invasão do patógeno, hidrólise de proteínas do hospedeiro com

fins nutricionais, e a degradação de proteínas envolvidas no sistema de defesa do hospedeiro (HUBE, 2000). Recentemente, nosso grupo demonstrou uma atividade extracelular de aspártico-peptidase em *C. rugosa*, assim como uma atividade de metalopeptidase no sobrenadante de cultura de *C. lipolytica* capaz de clivar algumas proteínas do soro humano (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2007). Estes resultados demonstram a participação de peptidases extracelulares de *Candida* na degradação de proteínas do hospedeiro, sugerindo um possível papel para estas enzimas durante o mecanismo de interação da levedura com a célula hospedeira.

As leveduras do gênero *Candida* estão envolvidas com onicomicoses, e as espécies envolvidas com este tipo de infecção são *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii* (EVANS, 1998; THAPPA, 2007). Infecções de unhas causadas por fungos não têm sido muito estudadas, porque tradicionalmente essas infecções têm sido consideradas muito mais um problema cosmético do que um problema de saúde, e por isso de menor importância (TORRES-RODRÍGUEZ, & LÓPEZ-JODRA, 2000). A terapia tópica de onicomicoses é limitada pela baixa permeabilidade das drogas através da placa ungueal. Para aumentar a absorção da droga, a integridade da placa ungueal deve ser comprometida de certa forma. Enzimas queratinolíticas podem diminuir as propriedades de barreira da unha, e assim aumentar a permeabilidade da droga (MOHORCIC *et al.*, 2007).

Poucos estudos têm mostrado a presença de atividade queratinolítica em *Candida* sp. Porém, já foi descrita uma queratinase em *C. albicans* do tipo aspártico-peptidase (HATTORI *et al.*, 1984). Além disso, nosso grupo detectou no sobrenadante de cultura de *C. parapsilosis* e *C. lipolytica* serina-peptidases com atividade queratinolítica (dados não publicados).

## **8. Biologia molecular aplicada à produção de enzimas**

Pesquisas que utilizam a mutagênese para aumentar a expressão de peptidases com o objetivo de possíveis aplicações industriais estão sendo cada vez mais encontradas na literatura. Na maioria das vezes a mutagênese é realizada com a utilização de agentes alquilantes, como o etil metanosulfonato (EMS) e o N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina, NTG, ou MNNG) (SHU-FEI *et al.*, 2008;

NANMORI, NUMATA & SHINKE, 1987). A luz ultravioleta também pode ser utilizada para aumentar a expressão de enzimas através da mutagênese (WU *et al.* 2006).

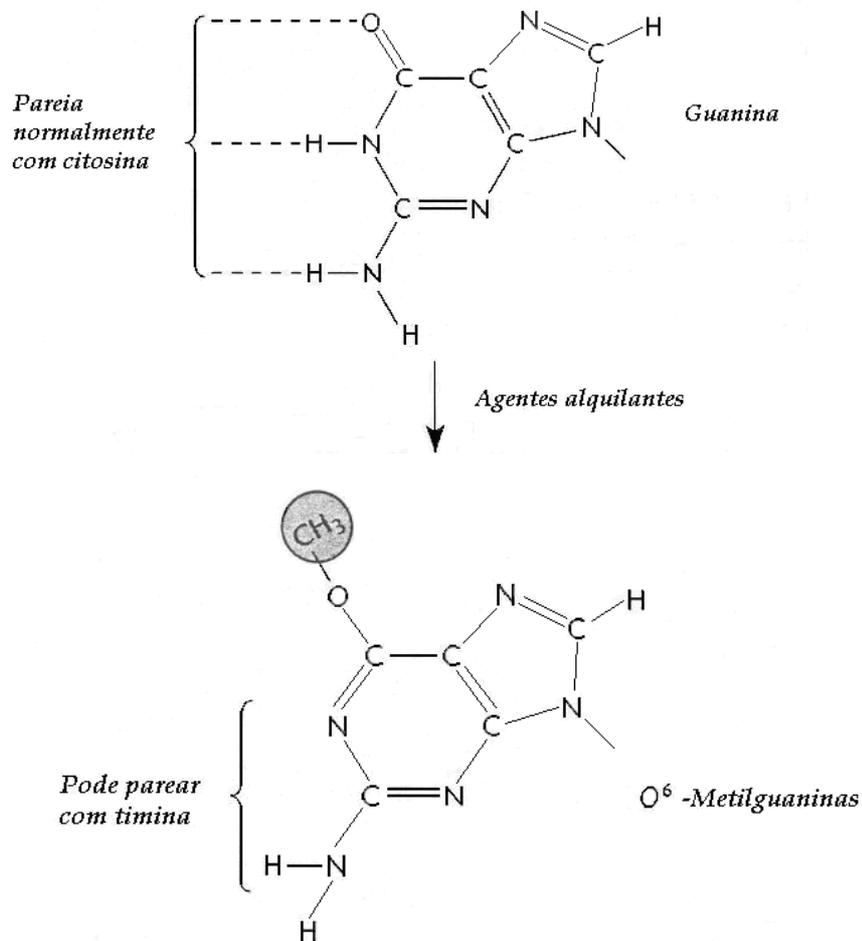
Os agentes alquilantes adicionam grupamentos alquil ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ , etc.) nas bases nitrogenadas ou nos fosfatos da cadeia nucleotídica. Muitos grupos reativos das bases nitrogenadas podem ser modificados por esses agentes, sendo os grupos mais reativos o  $\text{N}^7$  das guaninas e o  $\text{N}^3$  das adeninas. Esses átomos de nitrogênio podem ser alquilados, resultando em bases metiladas ou etiladas como a  $\text{N}^7$ -metilguanina e  $\text{N}^3$ -metiladenina. A alquilação das bases nessas posições pode ocasionar o pareamento destas bases com outras inadequadas, causando principalmente distorções na hélice do DNA. Outros átomos das bases nitrogenadas também podem ser modificados, incluindo o  $\text{O}^6$  das guaninas e o  $\text{O}^4$  das timinas. A adição de um grupamento metil nesses átomos ocasiona a formação de  $\text{O}^6$ -metilguaninas (figura 12) e  $\text{O}^4$ -metiltiminas, respectivamente. Bases alteradas com grupamento alquil nessas posições são mutagênicas, porque a hélice não é significativamente distorcida, então estas lesões podem não ser reparadas pelos sistemas gerais de reparo (SNYDER & CHAMPNESS, 1997).

CAI, LOU & ZHENG (2008) trataram uma amostra de *B. subtilis* produtora de queratinase com o agente mutagênico MNNG visando obter mutantes com elevada atividade queratinolítica. Este grupo isolou um mutante denominado KD-N2 com níveis de atividade queratinolítica na pena de 2 vezes maior que a estirpe selvagem, sendo capaz de degradar vários materiais queratinolíticos, incluindo penas, cabelo, seda e lã.

Uma outra técnica que tem sido uma importante ferramenta de estudo é a técnica do DNA recombinante, que oferece novas oportunidades para construção de organismos geneticamente modificados com propriedades desejáveis. O isolamento e a clonagem dos genes das queratinases são importantes para garantir o aumento da produção da enzima, permitindo sua comercialização. RADHA & GUNASEKARAN (2007) clonaram e expressaram o gene da queratinase de *B. licheniformis* MKU3 em *Bacillus megaterium*. Além disso, utilizaram a metodologia de resposta de superfície com sucesso para otimização das condições de fermentação para produção de queratinase pelo *Bacillus megaterium* recombinante, resultando em aumento de aproximadamente 3 vezes o nível de produção de queratinase.

A queratinase produzida pelo *B. licheniformis* PWD-1 é bem caracterizada, sendo uma serina-peptidase e codificada pelo gene *kerA* (LIN *et al.*, 1995). O gene *kerA*

é expressado especificamente para a hidrólise da pena, por isso a presença da queratina da pena como única fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultura pode resultar na expressão preferencial de enzimas queratinolíticas. Este gene tem sido clonado e expressado em microrganismos heterólogos como *B. subtilis* e *Escherichia coli*, mas a produção da enzima nesses microrganismos é inferior à produção enzimática da amostra parental (WANG & SHIH, 1999; WANG, SWAISGOOD, & SHIH, 2003). Contudo, o aumento da produção de queratinase pôde ser observado a partir de uma integração cromossômica de múltiplas cópias do gene *kerA* em *B. licheniformis* e *B. subtilis* (WANG, ROJANATAVORN, & SHIH, 2004). O gene *kerA* também foi clonado para expressão extracelular em *Pichia pastoris*, resultando em uma enzima recombinante que foi glicosilada e ativa em azoqueratina (PORRES, BENITO, & LEI, 2002).



**Figura 12:** Alquilação da guanina, produzindo uma O<sup>6</sup> metilguanina. A alteração da base pode ocasionar o pareamento errôneo com a timina (SNYDER & CHAMPNESS, 1997).

## *II. Objetivos*

O presente estudo teve como objetivo principal obter estirpes de *Candida parapsilosis* com alta produção de queratinases, através de mutagênese com o agente químico etil metanosulfonato (EMS). Foi avaliado também o perfil das peptidases com ênfase nas queratinases extracelulares das amostras obtidas, em comparação com a estirpe selvagem.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Aumentar a expressão de queratinases por uma amostra de *C. parapsilosis* isolada de resíduos da indústria avícola, através do tratamento com EMS.
- Analisar qualitativamente, por meio de zimografia com diferentes substratos protéicos, as peptidases extracelulares de *C. parapsilosis* e seus respectivos mutantes.
- Analisar quantitativamente, através de dosagens espectrofotométricas com os substratos gelatina e queratina, as peptidases extracelulares de *C. parapsilosis* e seus respectivos mutantes.
- Caracterizar bioquimicamente as peptidases quanto ao melhor pH e temperatura e o efeito de diferentes inibidores proteolíticos para a atividade das enzimas.

### *III. Materiais e Métodos*

## 1. Isolamento e seleção do microrganismo queratinolítico

Neste trabalho foi utilizada uma amostra de *C. parapsilosis* previamente isolada de resíduos da empresa avícola RICA (VERMELHO *et al.*, 2009). Este resíduo, composto por penas descartadas e restos de farinha de penas, foi imerso em meios de cultura para enriquecimento: meio Sabouraud (glicose 2%; peptona 1% e extrato de levedura 0,5%) e meio extrato de levedura (extrato de levedura 0,5%; peptona 05%, KCl 2,0% e sacarose 2,0%) e incubado a 37 °C por 4 dias. A técnica utilizada foi o esgotamento em estrias: as culturas foram semeadas nos mesmos meios com ágar para o isolamento das amostras. As colônias isoladas foram selecionadas pela sua capacidade de crescimento em tampão fosfato pH 7,2 (72 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06M e 28mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04M) suplementado com 1% de penas inteiras durante 20 dias a 28 °C.

## 2. Identificação do microrganismo

A amostra foi identificada no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), na Fundação Oswaldo Cruz. A identificação da levedura foi realizada de acordo com o método descrito por WICKERHAM (1952), através de observação macroscópica e microscópica, termotolerância de 25 °C a 40 °C, testes de fermentação (glicose, D-galactose, sacarose, maltose, trealose, lactose, celobiose, e rafinose), testes de assimilação (glicose, D-galactose, L-sorbose, D-glicosamina, D-ribose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose, sacarose, maltose, trealose,  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, celobiose, melibiose, lactose, rafinose, melezitose, salicina, arbutina, glicerol, eritritol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, *myo*-inositol, D-glucoronato, DL-lactato, succinate, citrato, nitrato de potássio e L-lisina) e crescimento isento de vitaminas.

### **3. Mutagênese da levedura**

A levedura *C. parapsilosis* foi semeada em meio Sabouraud durante 24 horas a 37 °C. Em seguida, foi adicionado uma 3% de EMS à cultura, que permaneceu sob agitação por 1 hora para a realização da mutagênese, de acordo com LINDEGREN *et al.* (1965). A cultura foi centrifugada a 2800 x g por 15 minutos e lavada com solução salina (0,85% NaCl) em condições estéreis para remoção dos componentes do agente mutagênico. Logo após, as células lavadas foram inoculadas novamente em meio Sabouraud. A cultura então foi diluída com solução salina e semeada em ágar Sabouraud para obtenção de colônias isoladas.

### **4. Obtenção do substrato queratina a partir de penas de galinha**

O substrato foi obtido de penas brancas de galinhas cedidas pela empresa avícola RICA, que foram previamente lavadas com detergente e delipidadas com clorofórmio : metanol (1:1 v/v) à temperatura ambiente, sob agitação (300 rpm) por 1 hora. A queratina foi extraída a 100 °C com dimetil sulfóxido (DMSO), de acordo com a metodologia descrita por WARZKIEWICZ, LOBAREWSKI, & WOLSKI (1987) com algumas modificações. A queratina solubilizada foi precipitada com dois volumes de acetona gelada e a mistura incubada a 4 °C por 48 horas, então a reação foi centrifugada a 700 x g por 15 minutos. Em seguida, a queratina permaneceu sob refrigeração a 4 °C para sua completa secagem, sendo macerada logo após.

### **5. Seleção dos mutantes com maior produção de queratinase**

As colônias isoladas de mutantes e crescidas em ágar Sabouraud foram transferidas para placas contendo meio ágar-queratina (queratina 2% obtida de acordo com o item 3; extrato de levedura 0,01%; ágar 2%) onde ficaram à temperatura de 37 °C durante 15 dias para verificar a liberação da enzima através da produção de halos de degradação. Os halos foram visualizados corando as colônias com Coomassie Blue R-250 [5mL de solução estoque (Coomassie blue 2%); 4mL de ácido acético; 20 mL de

metanol e 11 mL de água destilada], e o diâmetro dos halos comparado com a estirpe selvagem. As estirpes que tiveram a produção da enzima aumentada em comparação com a estirpe selvagem foram selecionadas e posteriormente cultivadas em meio tampão ácido cítrico pH 5,5 com penas 1% por 6 dias a 37 °C. O extrato enzimático foi obtido por centrifugação a 2800 x g durante 15 minutos e a atividade queratinolítica medida por dosagem segundo o método de GRYWNOWICZ *et al.*, (1989), descrito no item 7.

## **6. Cultivo dos mutantes para produção de queratinase**

As amostras foram cultivadas em meio Sabouraud durante 72 horas a 37 °C para a obtenção de massa celular. Estas células foram lavadas com solução salina em condições estéreis para a remoção dos componentes do meio e 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) foram inoculadas em meio tampão ácido cítrico pH 5.5 suplementado com penas 1% e extrato de levedura 0,01% durante 6 dias a 37 °C. Os extratos enzimáticos foram centrifugados a 2800 x g durante 15 minutos, para separação das células, e foram concentrados 20 vezes em membrana de diálise com limite de exclusão de 9000 Da contra polietilenoglicol 4000.

## **7. Ensaio da atividade queratinolítica**

A atividade queratinolítica foi medida conforme a metodologia descrita por GRYWNOWICZ *et al.*, (1989), usando o substrato de queratina extraída de penas (conforme o item 4). Em 500 µl dos extratos enzimáticos foram adicionados uma solução de queratina [0,5 mg de queratina em 750 µL de tampão fosfato pH 7,4 (80mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06M e 20mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04M)], e a mistura foi incubada por 1h a 37 °C. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. A solução foi então centrifugada 700 x g por 10 minutos e o extrato enzimático não concentrado foi lido em espectrofotômetro a 280 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica foi definida como a quantidade da enzima que aumenta a absorvância em 0,01 no comprimento de onda de 280 nm.

## **8. Efeito do pH na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo**

A estirpe selvagem e o mutante de maior produção queratinolítica foram inoculados em meio Sabouraud durante 72 horas a 37 °C para a obtenção de inóculo. Posteriormente, estas células foram lavadas com solução salina em condições estéreis para a remoção dos componentes do meio, e  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas em meio tampão ácido cítrico pH 4,0 (61,45 mL de ácido cítrico 0,1M e 38,55 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M) e pH 5,0 (48,50 mL de ácido cítrico 0,1M e 51,50 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M), e tampão fosfato pH 6,0 (12 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,06M e 88 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,04M), todos contendo extrato de levedura 0,01% e penas 1%. A incubação ocorreu a 37 °C durante 6 dias. Ao final do tempo de incubação, foi realizada a centrifugação do meio de cultivo para a retirada das células e o extrato enzimático foi coletado para verificação da atividade queratinolítica (de acordo com item 7).

## **9. Efeito da temperatura na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo**

A estirpe selvagem e o mutante de maior produção queratinolítica foram inoculados em meio Sabouraud durante 72 horas a 37 °C para a obtenção de inóculo. Posteriormente, estas células foram lavadas com solução salina em condições estéreis para a remoção dos componentes do meio, e  $10^8$  UFC/mL foram inoculadas em meio com penas 1% e extrato de levedura 0,01% no pH ótimo de crescimento previamente obtido com a realização do item 8. A incubação ocorreu separadamente nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 46 °C durante 6 dias, e ao final do tempo de incubação foi realizada a centrifugação do meio de cultivo para a retirada das células e o extrato enzimático foi coletado para verificação da atividade queratinolítica (de acordo com item 7).

## **10. Ensaio da atividade gelatinolítica**

A atividade enzimática foi verificada nas estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e do mutante com maior produção queratinolítica para a análise da produção de peptidases.

Para a realização da dosagem, 400 µL dos extratos enzimáticos das amostras foram acrescidos de 100 µL de tampão fosfato pH 7,4 (80mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06M e 20mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04M) e de 750 µL de uma solução de gelatina a 1% segundo metodologia descrita por JONES *et al.* (1998). As misturas foram incubadas por 1 hora a 37 °C, e alíquotas de 375 µL foram retiradas das misturas de reação, às quais foram adicionados 500 µL de isopropanol, a fim de precipitar as proteínas. Após centrifugação (8000 x g/ 10 min), foram retirados 100 µL do sobrenadante centrifugado dessa reação, para a realização da dosagem segundo o método de LOWRY *et al.* (1951), descrito no item 11. Uma unidade de atividade de gelatinase foi definida como a quantidade da enzima que aumenta a absorbância em 0,01 no comprimento de onda de 660 nm.

## **11. Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método de LOWRY *et al.* (1951), usando soro albumina bovina como padrão. A leitura foi realizada a 660 nm em espectrofotômetro.

## **12. Cinética de crescimento e de atividade enzimática em meio com penas**

A estirpe selvagem e o mutante com maior produção queratinolítica foram inoculados em meio Sabouraud durante 72 horas a 37 °C para a obtenção do inóculo. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina em condições estéreis para a remoção dos componentes do meio, e 10<sup>9</sup> UFC/ mL foram inoculadas em meio

tampão ácido cítrico pH 5.0 suplementado com penas 1% e extrato de levedura 0,01%, durante 6 dias a 37°C.

Diariamente foi retirada uma alíquota para contagem das células da estirpe selvagem e mutante em Câmara de Neubauer para observação do crescimento das estirpes, e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade queratinolítica (item 7) e análise zimográfica com queratina co-polimerizada (item 13).

### **13. Zimografia com gelatina, queratina, BSA, hemoglobina e caseína incorporados**

Aos extratos enzimáticos concentrados (item 6) foi adicionado o tampão de amostra para peptidase para SDS-PAGE (tampão Tris-HCl 0,32M, pH 6,8; glicerol 48% v/v; SDS 8% p/v e azul de bromofenol 0,06% p/v) na proporção 9:1 (90 µL de amostra para 10 µL de tampão da amostra para peptidase). As amostras foram aplicadas no gel de poliácridamida a 12,5% contendo 1% (p/v) de gelatina, queratina, BSA, hemoglobina ou caseína co-polimerizadas. A corrida foi realizada a 170 V por 3 horas a 4 °C. Após a corrida, os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% (v/v) duas vezes por 15 minutos sob agitação para a remoção do SDS. Em seguida, os géis foram incubados por 48 horas a 37 °C em tampão ácido cítrico pH 5,0. Para detecção da atividade proteolítica, os géis foram corados overnight com Comassie blue R-250 (preparado como descrito no item 5) e descorados com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v) sob agitação até o aparecimento de bandas de degradação (HEUSSEN & DOWDLE, 1980).

### **14. Determinação da temperatura e pH ótimos das queratinases**

A temperatura e o pH ótimos das queratinases foram determinados usando análise zimográfica com queratina incorporada à malha do gel (item 13), no qual a temperatura da reação foi variada na faixa em 28 °C, 37 °C, 50 °C e 70 °C. Foram analisadas as faixas de pH de 3,0 a 9,0, usando os seguintes sistemas de proteólise:

- Tampão ácido cítrico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M e Ácido Cítrico 0,1M) nas faixas de pH 3, 4, 5.

- Tampão fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,06M e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,04M) nas faixas de pH 6, 7 e 8.
- Tampão glicina (glicina 0,2M e NaOH 0,2M) com pH 9,0.

## 15. Determinação da classe proteolítica das queratinases

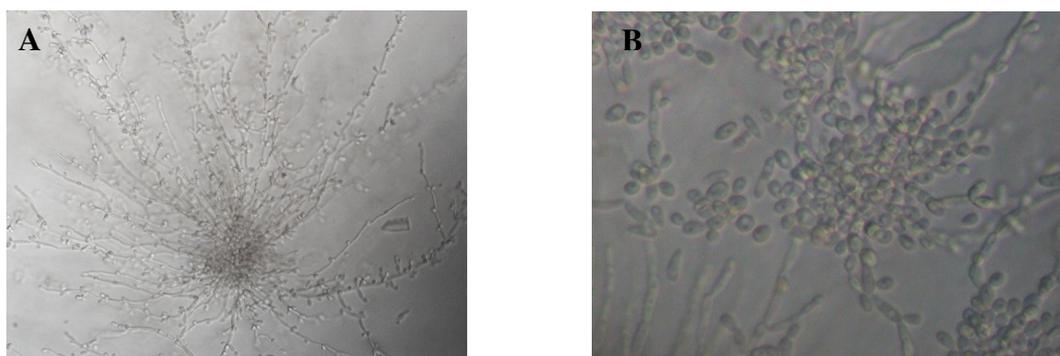
Para a determinação da classe proteolítica das queratinases, foi realizada enzimografia (NOGUEIRA DE MELO *et al.* 2007), onde 20 $\mu\text{L}$  dos extratos enzimáticos concentrados das amostras foram incubados com 20 $\mu\text{L}$  de uma solução de queratina (10mg/mL) e gelatina (5 mg/ mL) por 16 horas a 37 °C. Os seguintes inibidores foram utilizados: fenilmetil sulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM, inibidor de serina-peptidases; *L-trans*-epoxisuccinil L-leucilamida-(4-guanidino)-butano (E-64) 10  $\mu\text{M}$ , inibidor de cisteína-peptidases; 1,10-fenantrolina 10 mM, inibidor de metalopeptidases; e pepstatina 1 mM, inibidor de aspártico-peptidases. Estes inibidores foram incubados separadamente nas reações juntamente com a solução de queratina ou gelatina, mais os sobrenadantes concentrados. Após a incubação foi adicionado à mistura reacional 5 $\mu\text{L}$  de tampão da amostra para SDS-PAGE [300  $\mu\text{L}$  de tampão da amostra (Tris-HCl 0,15% pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,5%, glicerol a 10,8%), 10  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol e 10  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol 0,1%] na proporção 9:1 – sobrenadante: tampão. As misturas então, foram aquecidas a 100 °C por cinco minutos para desnaturação das proteínas. A corrida foi realizada a 170 V (volts) por 2h e a coloração utilizada foi a impregnação pela prata (GONÇALVES, NEHME, & MOREL 1984).

## *IV. Resultados*

## 1. Isolamento e identificação do microrganismo queratinolítico

A levedura foi previamente selecionada a partir de uma coleção de microrganismos isolados de resíduos de uma indústria avícola (VERMELHO *et al.*, 2009). A seleção foi realizada em tampão fosfato pH 7,2 suplementado com penas 1%. Foi observado visualmente que houve crescimento neste meio e uma degradação parcial das penas em 20 dias a 28 °C.

Para a identificação, o microrganismo foi submetido à análise do perfil de fermentação de açúcares e testes de assimilação de carboidratos. O perfil de assimilação de carboidratos foi detectado usando meio de cultivo isento de vitaminas, de acordo com WICKERHAM (1952). Nesse teste as células da levedura foram capazes de assimilar glicose, D-galactose, L-sorbose, D-xilose, L-arabinose, sacarose, maltose, trealose,  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, melizitose, glicerol, ribitol, D-manitol, D-glucitol, citrato, succinato, L-lisina. A levedura foi capaz de fermentar glicose e galactose de forma lenta, e mostrou incapacidade de fermentar maltose, sacarose, trealose, lactose, rafinose e celobiose, e apresentou melhor crescimento em 37 °C. Observações do isolado em microscópio óptico, após crescimento em meio de cultivo sólido Dalmau com farinha de milho durante 7 dias, mostraram pseudohifas ramificadas de células com cadeias de blastoconídios (Figura 13). Esses resultados mostraram que a amostra queratinolítica de *Candida* isolada de resíduos da indústria avícola corresponde à espécie *Candida parapsilosis*.

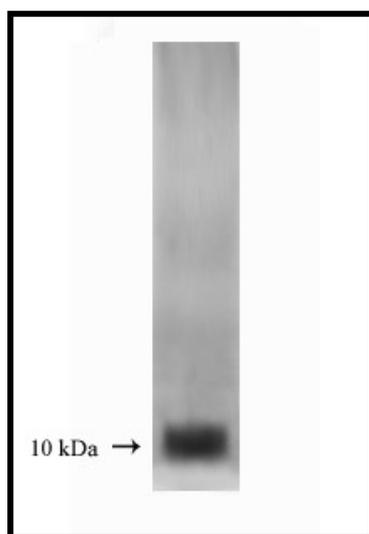


**Figura 13:** Identificação da amostra de *Candida parapsilosis* isolada de resíduos da indústria avícola por microscopia óptica. A levedura foi crescida em meio de cultivo sólido Dalmau contendo farinha de milho durante 7 dias: (A) microscopia óptica com aumento de 200X e (B) microscopia óptica com aumento de 400X de *Candida parapsilosis* mostrando pseudohifas ramificadas por células com cadeias de blastoconídios.

## 2. Obtenção da queratina a partir de penas de frango

O substrato queratina foi obtido usando penas de frango lavadas e delipidadas a 100 °C e imersas em DMSO por aproximadamente duas horas. O substrato obtido nesta extração apresentou homogeneidade, solubilidade parcial e uma única banda com massa molecular de 10 kDa em SDS-PAGE (figura 17). Para a determinação da massa molecular, os seguintes padrões foram utilizados: fosforilase b (94 kDa), soro albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa) (Sigma).

Esse substrato (figura 18) foi utilizado em dosagens da atividade queratinolítica, incorporado à malha do gel em zimografias, em placas de ágar-queratina para seleção dos mutantes e em uma solução de incubação utilizada na enzimografia para determinação da classe proteolítica das queratinases.



**Figura 17:** Queratina em pó submetida à análise por SDS-PAGE e coloração pela impregnação com nitrato de prata. O valor à esquerda refere-se à massa molecular da proteína.



**Figura 18:** Esquema de extração do pó de queratina a partir de penas de frango.

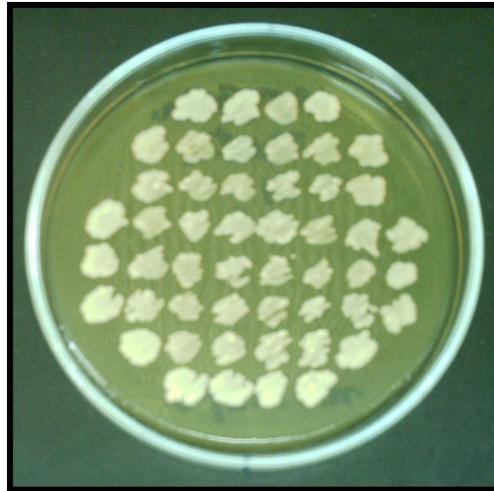
### 3. Mutagênese e seleção dos mutantes

A levedura foi tratada com o agente mutagênico (EMS). As células ( $1 \times 10^7$  UFC) foram semeadas em ágar Sabouraud para a obtenção de colônias isoladas, sendo em seguida transferidas para outras placas, que foram nomeadas com uma letra para identificação das colônias. Cada uma dessas placas continha 50 colônias (figura 14), e as seguintes placas foram testadas: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P, Q.

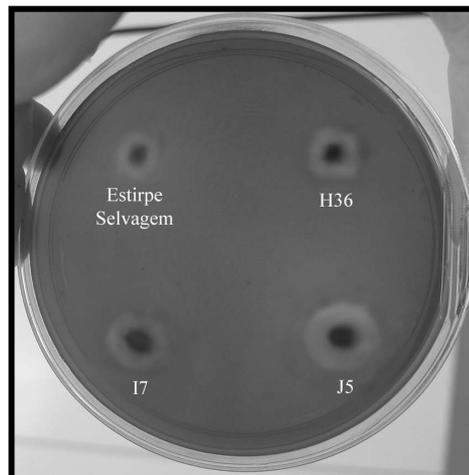
As colônias de mutantes que estavam nas placas classificadas com letras foram transferidas para placas de ágar-queratina contendo 25 colônias cada uma, sendo classificadas da seguinte maneira: A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2, E1, E2, F1, F2, G1, G2, H1, H2, I1, I2, J1, J2, L1, L2, M1, M2, N1, N2, O1, O2, P1, P2, Q1 e Q2. As placas de ágar-queratina foram incubadas durante 15 dias a  $37^\circ\text{C}$ , e foram coradas com Comassie blue e descoradas com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v). Os halos de degradação formados em torno das colônias pela degradação enzimática da queratina pelos mutantes puderam ser observados. Os mutantes que formaram halos com diâmetro maior que o da estirpe selvagem foram selecionados (figura 15).

Três mutantes apresentaram halos de degradação superior ao da estirpe selvagem, sendo denominados H36, I7 e J5 de acordo com a letra da placa em que se encontravam e a numeração correspondente da sua colônia nesta placa. Estes mutantes foram submetidos ao crescimento em meio tampão ácido cítrico pH 5,5 com penas 1% por 6 dias a  $37^\circ\text{C}$  e submetidos a ensaio da atividade queratinolítica (figura 16). Os três

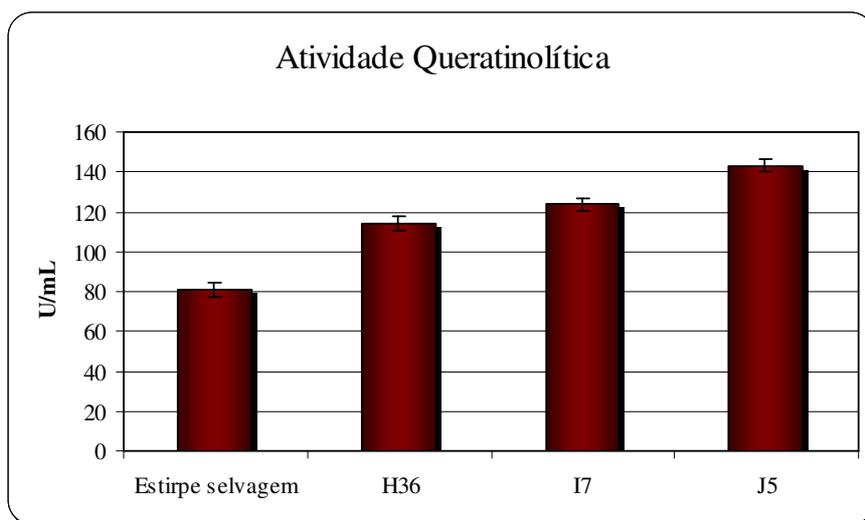
mutantes demonstraram produção de queratinase relativamente superior à produção da estirpe selvagem, sendo o mutante J5 o mais promissor dentre os três, apresentando uma atividade cerca de 70% maior que a estirpe selvagem.



**Figura 14:** Placa de ágar Sabouraud contendo 50 colônias de mutantes de *Candida parapsilosis*.



**Figura 15:** Placa de ágar queratina corada com Comassie blue permitindo a visualização dos halos de degradação formados pela estirpe selvagem e seus mutantes devido à produção de queratinase pelas amostras de *C. parapsilosis*.

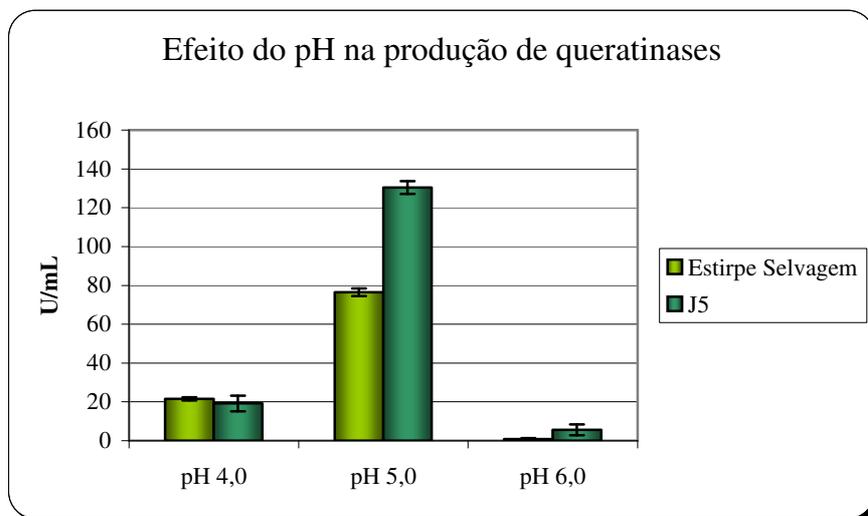


**Figura 16:** Ensaio da atividade queratinolítica das amostras crescidas em pH 5,5 a 37 °C, demonstrando uma maior atividade queratinolítica pelos mutantes da *Candida parapsilosis*.

#### 4. Efeito do pH na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo

A estirpe selvagem de *C. parapsilosis* selvagem e o mutante J5 foram cultivados por 6 dias em meio tampão com penas 1% em diferentes faixas de pH (4,0 5,0 e 6,0) para análise da produção de queratinase pelas leveduras de acordo com a variação de pH do meio de cultivo (figura 19). As amostras demonstraram uma atividade queratinolítica em pH 5,0 muito superior à atividade enzimática encontrada nas outras faixas de pH testadas. Em pH 5,0 o mutante apresentou uma atividade de 130,4 U/mL de queratinase enquanto a estirpe selvagem teve uma atividade de 76,4 U/mL da enzima, confirmando a produção cerca de 70% superior do mutante quando cultivado nessa faixa de pH. Quando cultivados em pH 4,0, as amostras demonstraram uma atividade queratinolítica muito inferior em relação ao cultivo em pH 5,0: a estirpe selvagem apresentou uma atividade aproximadamente quatro vezes mais baixa e o mutante teve uma produção de queratinases de apenas 19 U/mL, o que corresponde a 1/6 da atividade queratinolítica quando cultivados em pH 5,0. A atividade queratinolítica em meio tampão fosfato com penas em pH 6,0 foi muito reduzida tanto

na estirpe selvagem quanto no mutante, permitindo concluir que a produção de queratinases nesse pH é praticamente nula.

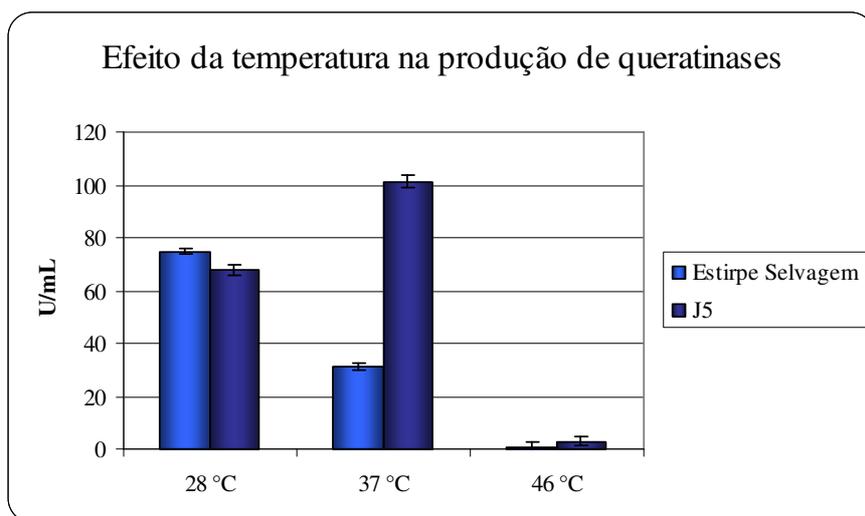


**Figura 19:** Dosagem da atividade queratinolítica das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e mutante J5 em meio de cultivo nas faixas de pH 4,0; 5,0 e 6,0.

## 5. Efeito da temperatura na produção de queratinases durante o cultivo do microrganismo

A estirpe selvagem de *C. parapsilosis* selvagem e o mutante J5 foram cultivados por 6 dias nas temperaturas de 28 °C, 37 °C e 46 °C em frascos independentes. O pH utilizado nesse experimento foi pH 5,0, previamente descrito no item 4 como o mais promissor para a produção de queratinases nas amostras. Na figura 20, pode ser observado que tanto a estirpe selvagem quanto o mutante não demonstraram atividade queratinolítica na temperatura de 46 °C.

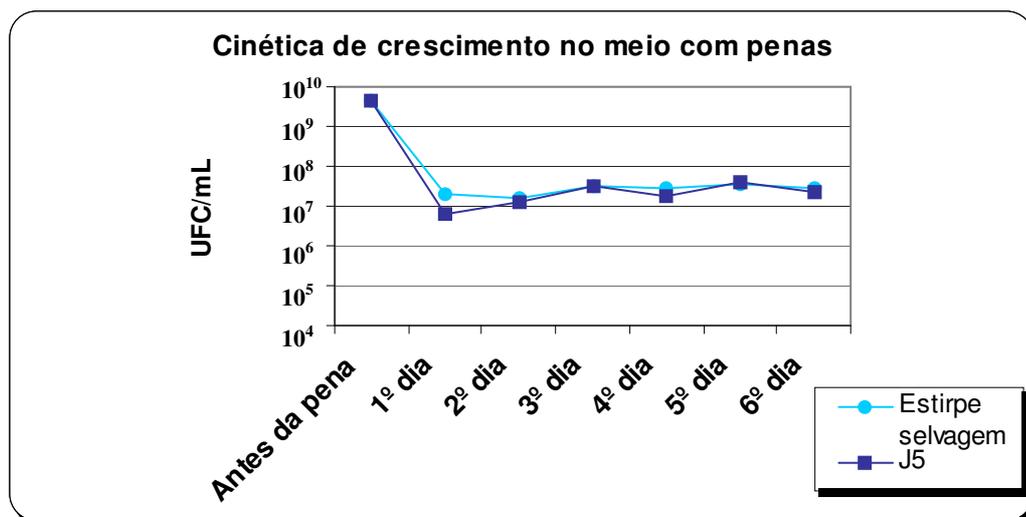
O mutante J5 apresentou a melhor produção de queratinases na temperatura de 37 °C. Quando cultivado em 28 °C teve uma redução na sua atividade queratinolítica. A estirpe selvagem apresentou a melhor produção de queratinases a 28 °C, e quando cultivada em 37 °C apresentou redução da produção de enzimas. Na temperatura de 46 °C ambas as leveduras não apresentaram produção de queratinases.



**Figura 20:** Dosagem da atividade queratinolítica das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e do mutante J5 em meio de cultivo nas faixas de temperatura de 28 °C, 37°C e 46 °C.

## 6. Cinética de crescimento e de atividade enzimática

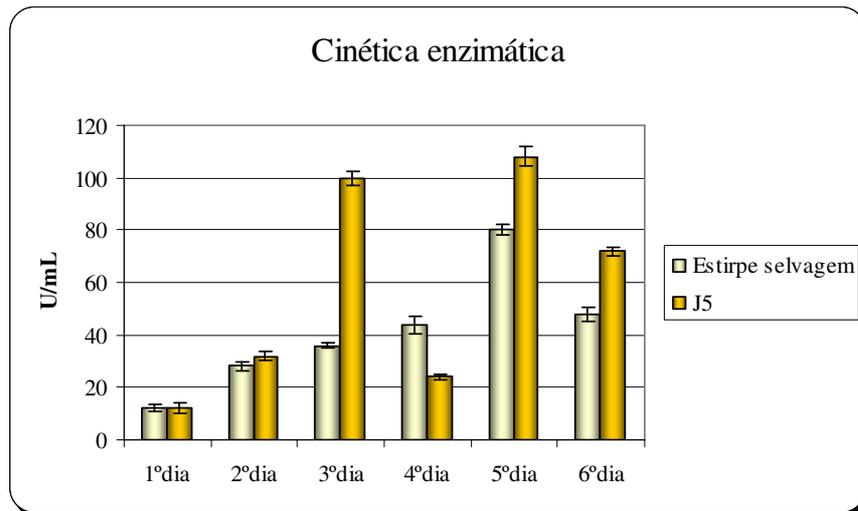
Para a realização da cinética de crescimento e enzimática das amostras de *C. parapsilosis*, foi utilizado o meio tampão ácido cítrico em pH 5,0 e temperatura de 37 °C, previamente observados como as melhores condições para produção de queratinases pelo mutante J5. Foram inoculados  $10^9$  UFC/mL das estirpes selvagem e do mutante J5 nos frascos contendo penas 1%, e diariamente alíquotas foram retiradas para a contagem de células em Câmara de Neubauer. A cinética de crescimento foi analisada (figura 21), e pode-se observar uma queda da quantidade de células de ambas as amostras quando inoculadas no meio com penas, seguido por um pequeno crescimento até o terceiro dia, onde as leveduras mantiveram um crescimento estável até o sexto dia de cultivo.



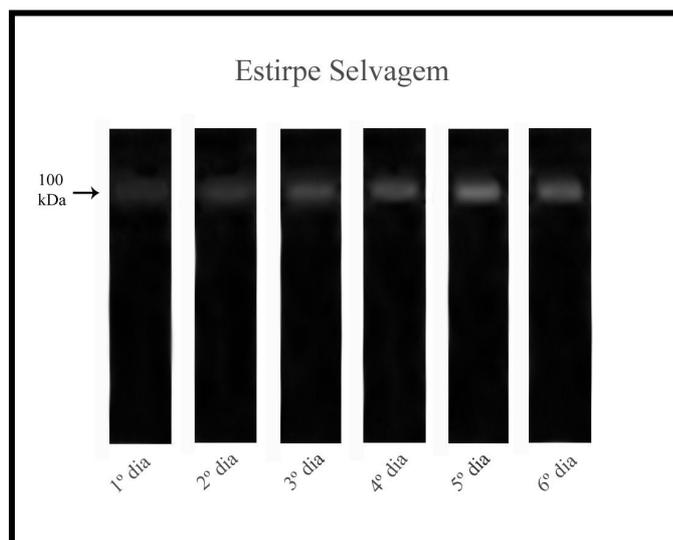
**Figura 21:** Cinética de crescimento da *C. parapsilosis* selvagem e do mutante J5 em meio com penas 1% como única fonte de carbono e nitrogênio.

O extrato enzimático foi utilizado para a realização da cinética enzimática através do ensaio da atividade queratinolítica. Ambas as amostras demonstraram a maior atividade no 5º dia de cultivo, apesar do 3º dia de cultivo apresentar uma atividade queratinolítica quase equivalente ao 5º dia para o mutante J5. No 6º dia de cultivo pôde-se observar uma queda na atividade enzimática para as duas amostras (figura 22).

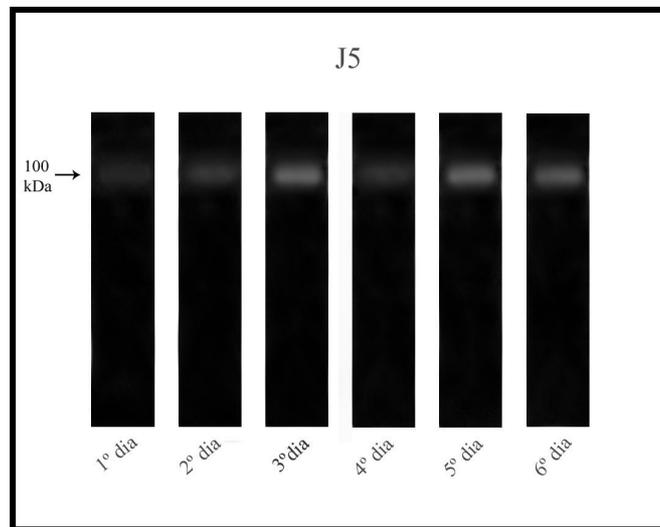
Análises zimográficas com a queratina co-polimerizada ao gel também foram realizadas para a observação da atividade das queratinases durante 6 dias de cultivo. As figuras 23 e 24 permitem a visualização de bandas de degradação da queratina em gel de poliacrilamida pelas queratinases de *C. parapsilosis* selvagem e do mutante J5, onde as amostras apresentaram somente uma banda de 100 kDa. Esses resultados confirmam a atividade das queratinases através do ensaio da atividade queratinolítica demonstrado pela figura 22, onde no 5º dia de cultivo a maior atividade queratinolítica é encontrada em ambas as leveduras.



**Figura 22:** Cinética enzimática das leveduras *C. parapsilosis* e mutante J5 demonstrando a atividade queratinolítica das amostras durante 6 dias de cultivo no meio com penas pH 5,0 a 37 °C



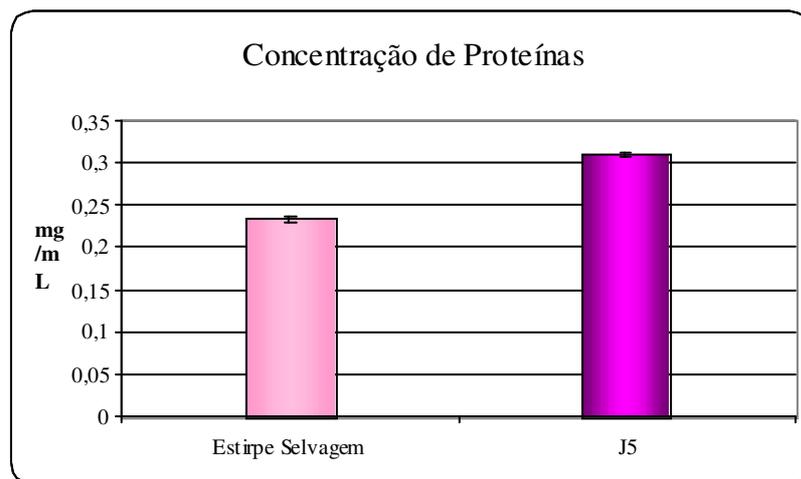
**Figura 23:** Zimograma com queratina co-polimerizada do extrato enzimático da estirpe selvagem concentrado 20 vezes, durante os seis dias de cultivo. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.



**Figura 24:** Zimograma com queratina co-polymerizada do extrato enzimático da estirpe de *C. parapsilosis* mutante J5 concentrado 20 vezes, durante os seis dias de cultivo. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.

## 7. Detecção de proteínas nos extratos enzimáticos da estirpe selvagem e do mutante J5 de *Candida parapsilosis*

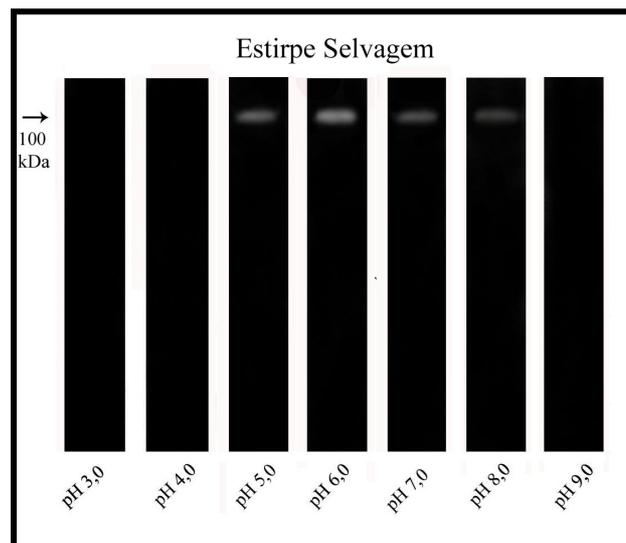
Os extratos enzimáticos da estirpe selvagem e do mutante J5 foram analisados através de dosagem, e a concentração de proteínas do sobrenadante foi verificada. O mutante J5 apresentou uma concentração de proteínas superior à estirpe selvagem (figura 25).



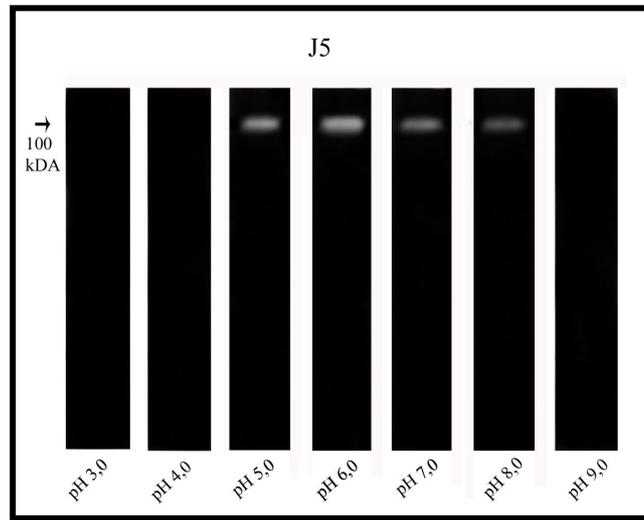
**Figura 25:** Concentração de proteínas nos extratos enzimáticos das estirpes de *Candida parapsilosis* selvagem e do mutante J5.

## 8. Determinação do pH ótimo em zimograma com queratina incorporada

Para realizar a determinação do pH ótimo das queratinases da estirpe selvagem e do mutante J5, foram realizadas zimografias com o substrato queratina incorporado. Os géis foram incubados em tampões com diferentes valores de pH (3,0 – 9,0) e as bandas de degradação podem ser visualizadas na figura 26 e 27. As duas amostras apresentaram o mesmo perfil de atividade queratinolítica em todas as faixas de pH, porém a intensidade das bandas de degradação da queratina geradas pelas queratinases do mutante J5 foi superior às bandas da estirpe selvagem. Em valores de pH 3,0 e 4,0 as amostras não apresentaram atividade queratinolítica. O pH 6,0 possibilitou a melhor atividade enzimática para ambas as leveduras, também sendo possível observar as bandas em pH 5,0; 7,0 e 8,0, com intensidades menores. Na faixa de pH 9,0 não foi possível a observação de bandas de degradação.



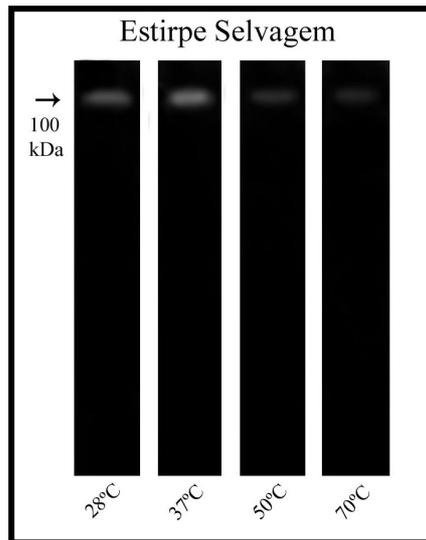
**Figura 26:** Análise das queratinases da estirpe de *C. parapsilosis* selvagem em zimograma com queratina incorporada em diferentes faixas de pH. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.



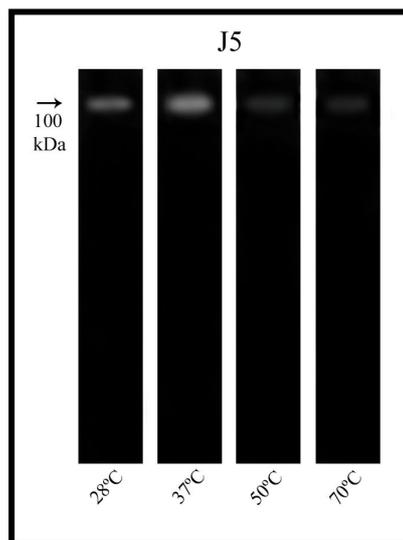
**Figura 27:** Análise das queratinases da estirpe mutante de *C. parapsilosis* J5 em zimograma com queratina incorporada em diferentes faixas de pH. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.

### **9. Determinação da temperatura ótima em zimograma com queratina incorporada**

Foram realizadas zimografias com queratina co-polimerizada ao gel para determinar a melhor temperatura para atividade queratinolítica das amostras de *Candida parapsilosis*. Os géis foram incubados nas temperaturas de 28 °C, 37 °C, 50 °C e 70 °C durante 48 horas. As estirpes selvagem e mutante apresentaram o mesmo perfil de atividade queratinolítica nas diferentes temperaturas, porém o mutante J5 apresentou bandas mais intensas (figuras 28 e 29). A temperatura de 37 °C foi a melhor para a atividade queratinolítica das amostras.



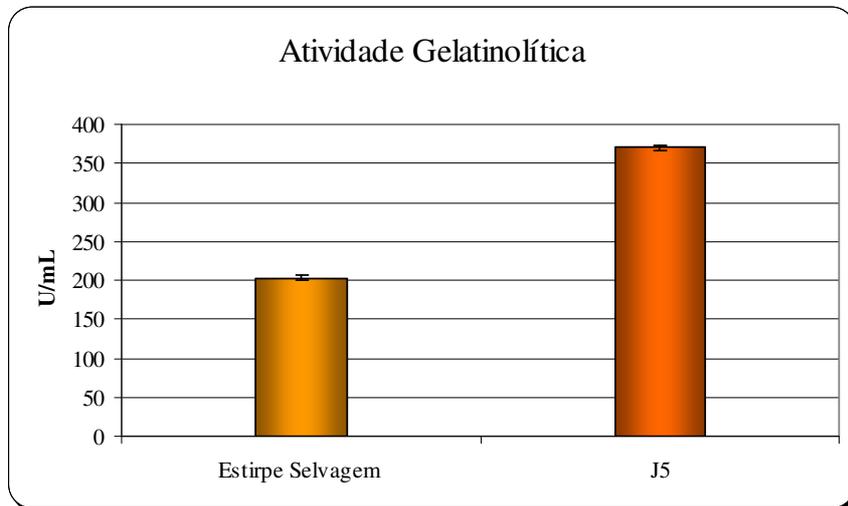
**Figura 28:** Análise zimográfica com queratina da estirpe selvagem da estirpe de *C. parapsilosis* selvagem em diferentes temperaturas. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.



**Figura 29:** Análise zimográfica com queratina da estirpe mutante de *C. parapsilosis* J5 em diferentes temperaturas. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade queratinolítica.

## 10. Atividade gelatinolítica

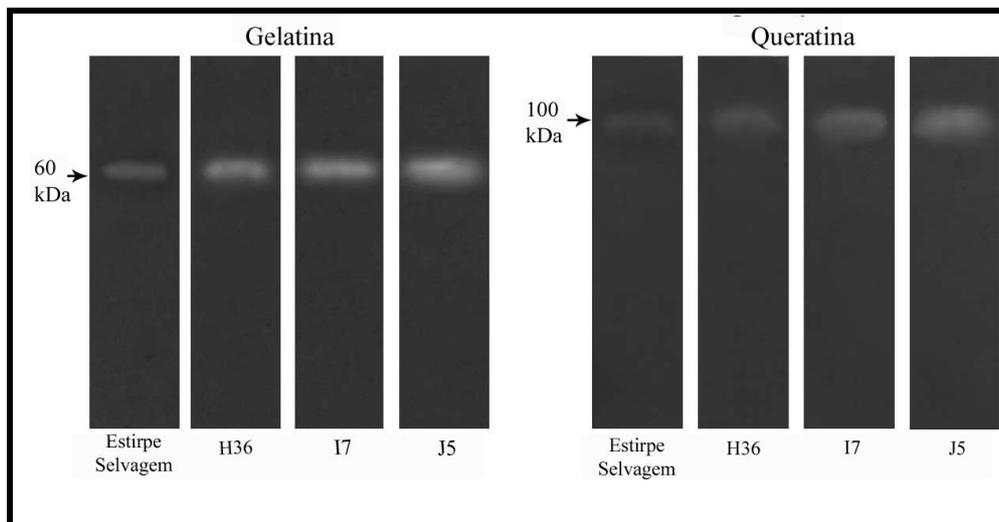
A atividade enzimática foi verificada através de dosagem utilizando como substrato a gelatina. A estirpe mutante de *C. parapsilosis* J5 demonstrou uma atividade enzimática superior à atividade apresentada pela estirpe selvagem (figura 30).



**Figura 30:** Atividade enzimática usando o substrato gelatina nos extratos enzimáticos de *C. parapsilosis* selvagem e do mutante J5.

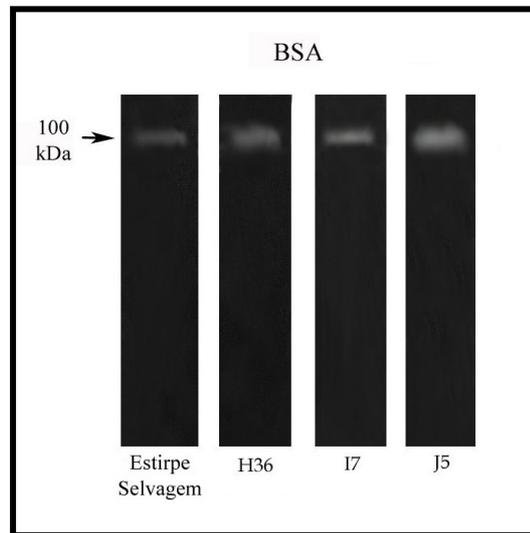
## 11. Zimografia com diferentes substratos protéicos

Foram realizadas zimografias com diferentes substratos protéicos incorporados para a análise da produção de diferentes peptidases pelas estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e dos mutantes H36, I7 e J5. As peptidases das estirpes mutantes de *C. parapsilosis* apresentaram massas moleculares de tamanhos iguais ao tamanho das peptidases da estirpe selvagem. Com o substrato gelatina incorporado ao gel, as amostras apresentaram bandas de degradação na faixa de 60 kDa, sendo os mutantes H36, I7 e J5 superiores nesta ordem em produção enzimática do que a estirpe selvagem. O zimograma com queratina incorporada apresentou o mesmo perfil que o substrato gelatina em relação à superioridade da produção de enzimas pelos mutantes quando comparado com a estirpe selvagem, porém a massa molecular desta enzima ficou na faixa de 100 kDa (figura 31).

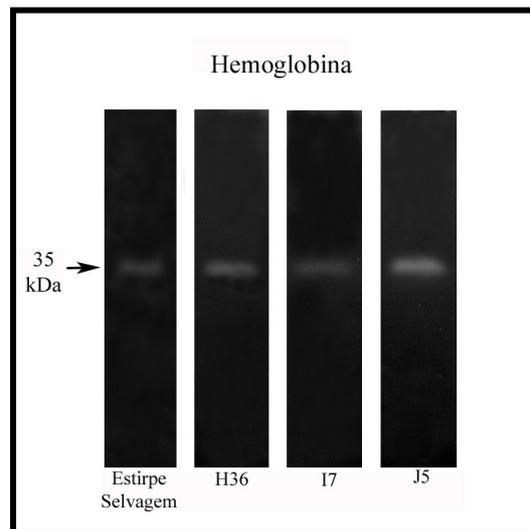


**Figura 31:** Análise zimográfica com os substratos gelatina e queratina dos extratos enzimáticos das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e dos mutantes H36, I7 e J5. Os valores à esquerda se referem, à massa molecular das bandas com atividade proteolítica.

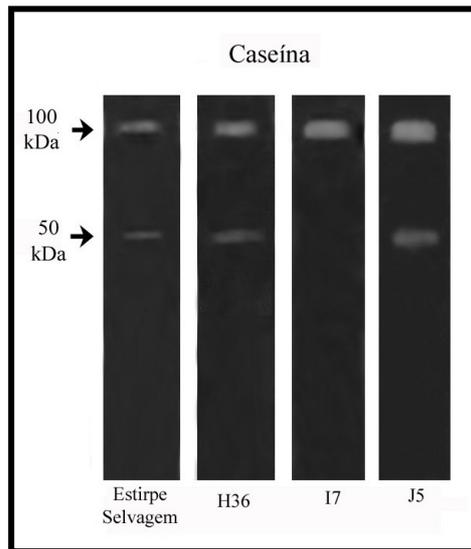
Os substratos BSA, hemoglobina e caseína também foram utilizados nas zimografias. Com o substrato BSA, as bandas de degradação apresentam cerca de 100 kDa, sendo o mutante J5 o maior produtor da enzima responsável pela degradação desse substrato, seguido pelo mutante H36 e pelo mutante I7 (figura 32). Com o substrato hemoglobina ocorreu o mesmo perfil de degradação detectado para BSA, porém a massa molecular da enzima foi de 35 kDa (figura 33). Utilizando caseína incorporada à malha do gel, pode-se observar um perfil mais complexo de degradação do que os observados nos outros substratos: bandas de degradação de 100 kDa foram encontradas apresentando uma superioridade na produção de enzimas pelo mutante J5, e além disso, a estirpe selvagem, o mutante H36 e o mutante J5 demonstraram uma peptidase com massa molecular em torno de 50 kDa (figura 34).



**Figura 32:** Análise zimográfica com BSA dos extratos enzimáticos das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e dos mutantes H36, I7 e J5. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade proteolítica.



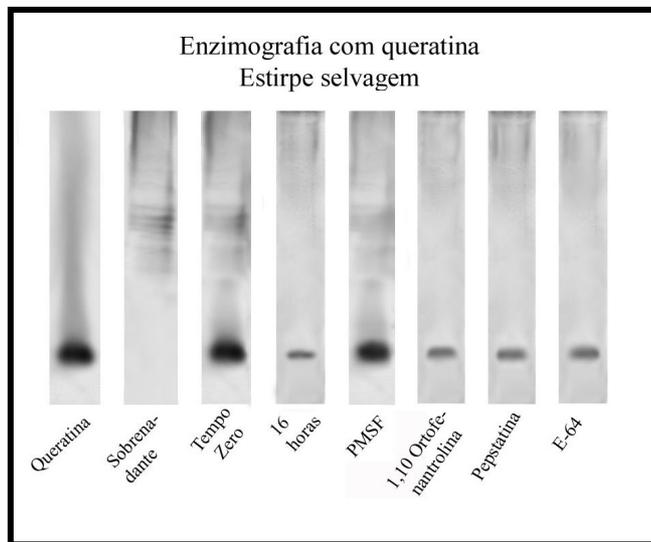
**Figura 33:** Análise zimográfica com hemoglobina dos extratos enzimáticos das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e dos mutantes H36, I7 e J5. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade proteolítica.



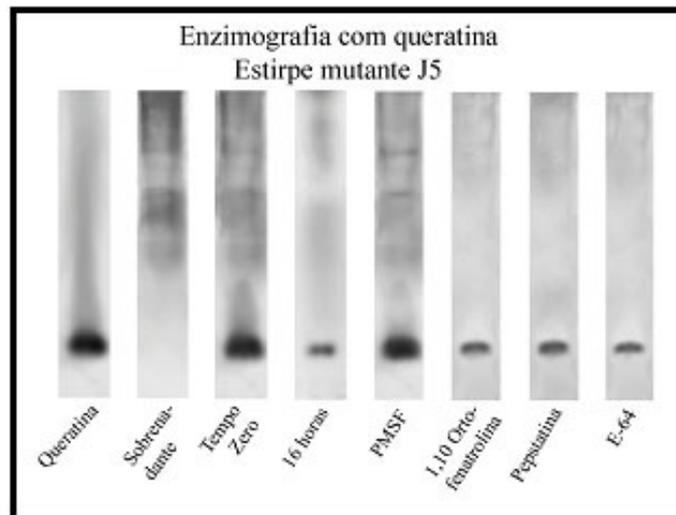
**Figura 34:** Análise zimográfica com caseína dos extratos enzimáticos das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e dos mutantes H36, I7 e J5. O valor à esquerda se refere à massa molecular da banda com atividade proteolítica.

## 12. Classificação das peptidases da estirpe selvagem de *Candida parapsilosis* e da estirpe mutante J5

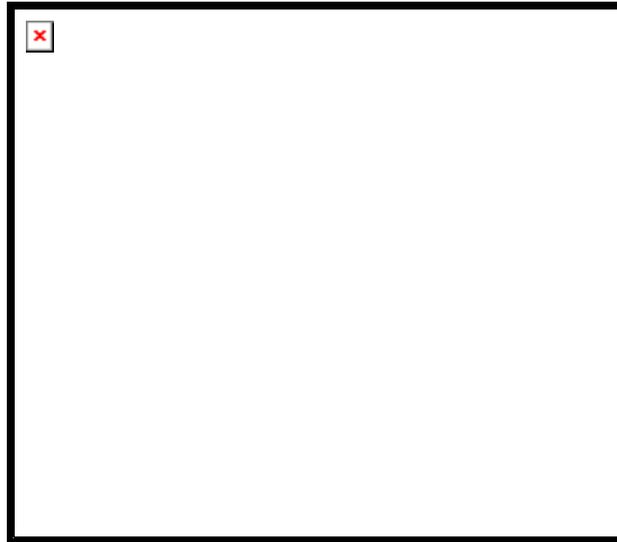
A determinação da classe das peptidases das estirpes de *C. parapsilosis* selvagem e do mutante J5 foi realizada por meio de enzimografias. Os extratos enzimáticos concentrados foram submetidos à incubação em uma solução contendo queratina e em outra contendo gelatina por 16 horas; além disso, inibidores de peptidases foram adicionados às misturas de reações. As peptidases das duas estirpes testadas, quando foram incubadas em solução de queratina, apresentaram inibição de suas atividades enzimáticas quando PMSF, inibidor de serina-peptidases, estava presente nas misturas de reações (figuras 35 e 36). No entanto, quando as peptidases das estirpes selvagem e do mutante J5 foram submetidas à incubação com gelatina, a atividade gelatinolítica foi completamente inibida pelo inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina (figuras 37 e 38).



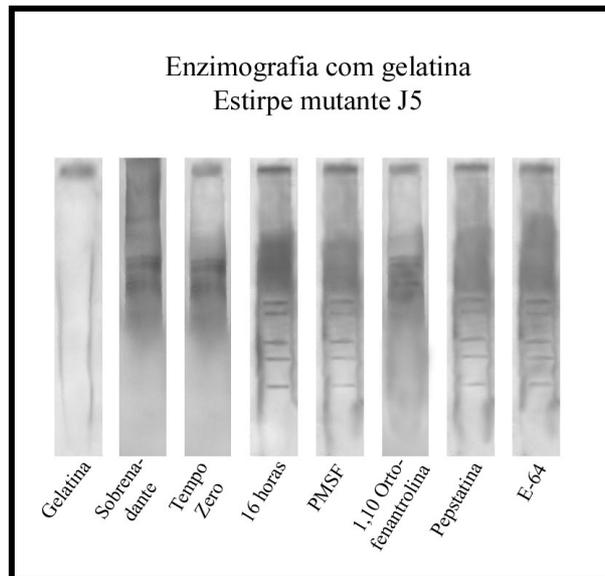
**Figura 35:** Enzimografia demonstrando a inibição da atividade queratinolítica das queratinases da estirpe selvagem de *C. parapsilosis* selvagem pelo PMSF. Tempo 0, queratina + extrato enzimático sem tempo de incubação.



**Figura 36:** Enzimografia demonstrando a inibição da atividade queratinolítica das queratinases da estirpe mutante de *C. parapsilosis* J5 pelo PMSF. Tempo 0, queratina + extrato enzimático sem tempo de incubação.



**Figura 37:** Enzimografia demonstrando a inibição da atividade de gelatinase das peptidases da estirpe selvagem de *C. parapsilosis* pela 1,10-fenantrolina. Tempo 0, queratina + extrato enzimático sem tempo de incubação.



**Figura 38:** Enzimografia demonstrando a inibição da atividade de gelatinase das peptidases da estirpe mutante de *C. parapsilosis* J5 pela 1,10-fenantrolina. Tempo 0, queratina + extrato enzimático sem tempo de incubação.

## *V. Discussão*

As peptidases são enzimas hidrolíticas encontradas em todos os organismos vivos e essenciais para alguns processos fisiológicos; além disso, apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas. Dentre as peptidases encontram-se as queratinases, que apresentam aplicações potenciais na degradação de substratos ricos em queratina, como bioprodutos gerados principalmente por processos agroindustriais (BRANDELLI, 2008). As enzimas queratinolíticas são largamente encontradas na natureza, produzidas por vários microrganismos, principalmente isolados de resíduos da indústria avícola (GUPTA & RAMNANI, 2006). Sendo assim, o desenvolvimento de processos que possam converter grandes quantidades desses resíduos em outros produtos tem sido investigado (BERTSCH & COELLO, 2005; GRAZZIOTIN *et al.*, 2007). O Brasil é o maior exportador de frango do mundo, sendo grande o descarte de resíduos não comestíveis desta atividade. O descarte das penas é de grande impacto ao meio ambiente, pois sua degradação é lenta, porém apresentam cerca de 90% de queratina (ONIFADE *et al.*, 1998), uma proteína fibrosa com estabilidade mecânica que pode ser degradada por microrganismos produtores de queratinases.

Os microrganismos são excelentes fontes de peptidases com grande diversidade estrutural e funcional, além de poderem ser manipulados geneticamente. Um grande número de bactérias e fungos é conhecido pela sua capacidade de degradar a queratina, porém as queratinases de leveduras são pouco estudadas. Uma queratinase do tipo aspártico-peptidase foi descrita em *Candida albicans* (HATTORI *et al.*, 1984). Esta espécie é responsável por infecções na epiderme de frangos, causando perda de suas penas. Esta patologia pode estar relacionada à capacidade destes microrganismos de produzirem queratinases (KUTTIN, BEEMER, & MEROZ, 1976). No entanto, os estudos da produção de queratinases nas espécies de *Candida* são raros, o que dificulta a compreensão dos mecanismos de produção dessas enzimas por estas leveduras.

Foi utilizada neste estudo uma estirpe de *C. parapsilosis* queratinolítica isolada da indústria avícola. Visando um possível aumento da produção de queratinases por esta levedura, foi realizada a mutagênese com o agente alquilante etil metanosulfonato (EMS).

A eficácia da mutagênese com agentes químicos e físicos para o isolamento de mutantes com capacidade aumentada para a produção de enzimas, tem sido demonstrada em alguns estudos. SHU-FEI *et al.* (2008) utilizaram irradiação de microondas e EMS para aumentar a produção de  $\beta$ -mananase, enzima capaz de clivar ligações  $\beta$ -1,4 entre unidades de manose, em *Aspergillus niger* LW-1. NANMORI,

NUMATA & SHINKE (1987) trataram uma estirpe de *Bacillus cereus* produtora de  $\beta$ -amilase com MNNG e selecionaram um mutante que apresentou uma atividade de  $\beta$ -amilase cerca de cinco vezes maior que a estirpe selvagem. A luz ultravioleta foi usada como ferramenta para aumentar a secreção de proteínas em *Ophiostoma floccosum*, um fungo ascomiceto frequentemente isolado de madeira. Para confirmar o aumento da secreção de proteínas pelo mutante, a atividade da amilase foi usada como parâmetro, e foi observado um aumento de seis vezes na secreção de proteínas em relação à estirpe selvagem (WU *et al.*, 2006). Para o aumento da expressão de  $\alpha$ -galactosidase, WANG *et al.* (2004) empregaram a mutagênese utilizando EMS e MNNG.

No presente estudo, o isolamento de três mutantes de *Candida parapsilosis* foi realizado, os quais foram denominados H36, I7 e J5 apresentando um aumento na expressão de queratinases em torno de 40%, 50% e 70% respectivamente, em relação à estirpe selvagem. Os mutantes obtidos com esta metodologia também passaram a expressar uma maior quantidade de outras peptidases capazes de degradar gelatina, caseína, BSA e hemoglobina.

O único relato na literatura que trata de mutagênese química para o aumento da expressão de queratinases, além do presente estudo, descreve o tratamento de uma estirpe de *Bacillus subtilis* com o agente mutagênico MNNG, tendo como resultado o isolamento de um mutante denominado KD-N2 com atividade queratinolítica duas vezes superior à estirpe selvagem (CAI, LOU, & ZHENG, 2008). Os resultados do presente trabalho com a levedura *C. parapsilosis* foram similares aos resultados obtidos com o *B. subtilis*, o que reforça a importância do uso de uma técnica simples como a mutagênese química para aumentar a atividade enzimática dos microrganismos. CAI, LOU, & ZHENG (2008) realizaram a seleção dos mutantes através de placas contendo ágar-caseína para avaliar a produção de queratinase, ao contrário deste estudo, no qual os mutantes foram selecionados em ágar contendo queratina extraída de penas de frango.

Nos resultados apresentados no presente trabalho, os zimogramas com o substrato caseína incorporado à malha do gel demonstraram a presença de uma peptidase migrando na faixa de 100 kDa. Nas zimografias com queratina e BSA incorporados ao gel, as peptidases encontradas apresentaram a mesma massa molecular de 100 kDa. É possível que a mesma peptidase esteja envolvida na degradação dos três

substratos, contudo não se pode fazer esta afirmação, pois testes comprobatórios teriam que ser realizados.

Através dos zimogramas realizados nesse estudo, foi observado que o agente químico EMS permitiu a produção de mutantes com atividade enzimática superior à estirpe selvagem através de bandas de degradação mais intensas. Em geral, as estirpes mutantes apresentaram as mesmas massas moleculares das peptidases da estirpe selvagem. Embora peptidases com massa molecular de 100 kDa tenham sido encontradas com queratina, BSA e caseína, uma outra peptidase com massa molecular de 50 kDa foi detectada com o substrato caseína em todas as amostras testadas, com exceção do mutante I7.

Quando gelatina e hemoglobina foram incorporadas na malha do gel, foram observadas enzimas de 60 kDa e 35 kDa, respectivamente. Segundo GUPTA & RAMNANI (2006), as queratinases apresentam massa molecular entre 18 e 200 kDa. O menor valor, 18 kDa, foi descrito para *Streptomyces albidoflavus* SK 1-02 (CHITTE *et al.*, 1999) e o maior, 200 kDa, para *Kocuria rosea* e *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (NAM *et al.*, 2002; BERNAL *et al.*, 2003).

As queratinases podem degradar muitos substratos protéicos e podem ser ativas contra substratos solúveis e insolúveis. Entre os substratos solúveis, são capazes de hidrolisar a caseína, gelatina, BSA e hemoglobina. Entre os substratos insolúveis já reportados na literatura estão as penas, lã, seda, colágeno, elastina, cabelo, azoqueratina e unhas (GUPTA & RAMNANI, 2006). A levedura *C. parapsilosis* mostrou neste trabalho a produção de peptidases com habilidade para degradar muitos substratos solúveis, além da queratina em pó, que é um substrato parcialmente insolúvel.

A presença de atividade proteolítica foi descrita em *Candida lipolytica* e *Candida rugosa*, sendo estas espécies importantes do ponto de vista clínico (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2007). No estudo citado anteriormente, os substratos protéicos gelatina, caseína, BSA e hemoglobina foram usados em zimografias. *C. lipolytica* apresentou uma peptidase de 60 kDa em gelatina como substrato, enquanto *C. rugosa* apresentou bandas de 50 kDa, 94 kDa e 120 kDa com gelatina, caseína e BSA como substratos protéicos. As estirpes de *C. parapsilosis* utilizadas neste trabalho apresentaram uma peptidase de 60 kDa em zimograma com gelatina incorporada, semelhante à amostra de *C. lipolytica* do trabalho citado anteriormente.

Diferentes substratos protéicos também foram utilizados para analisar peptidases de *Pseudallescheria boydii*, e duas bandas de degradação foram observadas

em BSA, caseína e hemoglobina, com massa molecular de 35 e 28 kDa nos substratos descritos acima, enquanto que em gelatina as peptidases não demonstraram atividade (SILVA, *et al*, 2006).

Neste trabalho, foi demonstrado que a levedura *C. parapsilosis* isolada de resíduos da indústria avícola apresenta peptidases capazes de degradar, além da queratina, a caseína, o BSA, a hemoglobina e a gelatina. Estudos anteriores descrevem a produção de peptidases intimamente ligada a fatores ambientais, principalmente quando relacionados a leveduras do gênero *Candida* em casos clínicos, sugerindo que a produção dessas peptidases esteja envolvida com fatores de virulência desses microrganismos (SANTOS *et al*, 2005). Em 1993, FUSEK *et al.* descreveram duas aspártico-peptidases de *C. parapsilosis* com capacidade de degradar BSA.

Para a realização da degradação completa ou parcial da queratina, a literatura apresenta microrganismos que precisam permanecer no meio de cultivo por até 10 dias, como a *Thermoanaerobacter keratinophilus* e o *Bacillus licheniformis* PWD1 (WILLIAMS *et al.*, 1990; RISSEN & ANTRANIKIAN, 2001). Outros microrganismos conseguem degradar a queratina em até 48 horas como *Fervidobacterium pennavorans* (FRIEDRICH & ANTRANIKIAN, 1996) e *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (NAM *et al.*, 2002). As leveduras utilizadas neste trabalho permaneceram por 6 dias no meio de cultivo contendo penas inteiras, porém mesmo sendo capazes de produzir uma quantidade razoável de queratinases não são capazes de degradar completamente as penas.

A estirpe selvagem e o mutante J5 de *C. parapsilosis* estudados neste trabalho apresentaram a melhor atividade queratinolítica no 5º dia de cultivo. Porém, no 3º dia de cultivo esta estirpe também apresentou uma excelente atividade. As amostras testadas se encontravam na fase estacionária no pico de sua atividade queratinolítica. SUNTORNSUK & SUNTORNSUK (2003) relataram que a amostra de *Bacillus* sp. FK 46 isolada de solo demonstrava sua melhor produção de queratinases no 5º dia de cultivo em fermentação submersa, com penas como única fonte de carbono e nitrogênio.

Os mecanismos de degradação da queratina não são ainda completamente conhecidos. Entretanto, sabe-se que, provavelmente, muitos componentes podem estar envolvidos incluindo as peptidases. Não é conhecida a produção de enzimas que clivam as pontes dissulfeto nas espécies de leveduras do gênero *Candida*, nem a produção de compostos, como o sulfito, que auxiliam na hidrólise das pontes dissulfeto. Outros

estudos precisam ainda ser feitos no gênero para uma melhor compreensão do mecanismo queratinolítico nestes microrganismos.

Os parâmetros físicos são importantes fatores para a produção de queratinases, e são específicos de acordo com a espécie estudada. A temperatura de cultivo para a produção de queratinases pode variar de 70 °C no caso de *Fervidobacterium pennavorans* (FRIEDRICH & ANTRANIKIAN, 1996) a 20 °C para o cultivo de *Stenotrophomonas* sp. D1 (YAMAMURA *et al.*, 2002), mas a faixa de temperatura mais relatada na literatura varia de 28 à 50 °C. A maioria dos estudos sobre a produção de queratinases relata a produção dessas enzimas em pH alcalino de 6 a 9 para a maioria dos microrganismos. (GUPTA & RAMNANI, 2006). No entanto, a produção de queratinases já foi descrita na faixa de pH de 5 a 6 para *Bacillus pumilus* (PISSUWAN & SUNTORNSUK, 2001).

A estirpe selvagem e a estirpe mutante J5 de *C. parapsilosis* demonstraram a melhor produção de queratinases em pH 5,0, ou seja, em pH ácido, diferentemente da maioria dos microrganismos. Em pH 4,0, as amostras também apresentaram atividade queratinolítica, mas muito reduzida se comparada com o cultivo em pH 5,0.

A temperatura de cultivo que mais favoreceu a produção de queratinases na estirpe mutante J5 foi 37 °C, sendo esta produção queratinolítica 70% superior à produção da estirpe selvagem na mesma temperatura. Em 28 °C a atividade queratinolítica do mutante foi um pouco reduzida, enquanto a atividade queratinolítica da estirpe selvagem aumentou duas vezes se comparada com o cultivo em 37 °C. Na temperatura de 46 °C, as queratinases não apresentaram atividade, talvez porque essa temperatura tenha inibido também o crescimento da levedura, mas como as células não foram contadas, pois o objetivo do experimento era apenas analisar a produção de queratinases em diferentes temperaturas, não podemos fazer esta afirmação.

Geralmente o pH ótimo para a atividade queratinolítica é neutro ou alcalino, como os descritos para *Microbacterium* sp. Kr10 e *Bacillus pseudofirmus* FA30-10, que são respectivamente na faixa de 7,5 e 9-10 (THYS & BRANDELLI, 2006; KOJIMA *et al.*, 2006). Através de zimogramas com queratina co-polimerizada à malha do gel, as queratinases das estirpes selvagem e do mutante J5 apresentaram pH ótimo em torno de 6,0, se diferenciando da maioria das queratinases. A temperatura ótima das queratinases varia de 30 °C a 80 °C. Excepcionalmente, a enzima do termófilo *Fervidobacterium islandicum* AW-1 apresenta sua temperatura ótima em 100 °C (NAM *et al.*, 2002). No

presente trabalho, as peptidases das amostras testadas apresentaram sua melhor atividade em 37 °C.

A maioria das queratinases descritas pertence à classe das serina peptidases ou metalopeptidases, independentemente do microrganismo. Logo, PMSF e 1,10-fenantrolina são potenciais inibidores dessas peptidases (DOZIE, OKEKE & UNAEZE, 1994; RIFFEL *et al.*, 2003). *Chryseobacterium* sp. kr6 produz uma peptidase com atividade queratinolítica que é inibida na presença de 1,10-fenantrolina, indicando sua classificação como metalopeptidases (RIFFEL *et al.*, 2007). Uma queratinase do tipo serina-peptidase foi encontrada em *Trichophyton* sp. HA-2, e a amostra queratinolítica foi selecionada através da utilização do meio ágar-queratina (ANBU *et al.*, 2008). *B. subtilis* RM-01 apresenta a produção de uma serina-peptidase dependente de ferro caracterizada como uma  $\beta$ -queratinase de 20 kDa (RAI, KONWARH & MUKHERJEE, 2009). As queratinases da estirpe selvagem e do mutante J5 foram fortemente inibidas por PMSF, indicando que seriam serina peptidases, como a maioria das queratinases. No entanto, quando o substrato gelatina foi utilizado, a atividade proteolítica foi inibida por 1,10-fenantrolina, enquanto o PMSF não foi capaz de impedir a degradação do substrato. Dessa forma, pode-se sugerir que as leveduras utilizadas neste trabalho produzem pelo menos duas peptidases diferentes, uma pertencente à classe das serina peptidases com habilidade para degradar queratina e outra da classe das metalopeptidases com capacidade de degradar gelatina.

A diversidade dos mecanismos catalíticos, incluindo serina e metalopeptidases, pode ter um importante efeito no meio ambiente, onde consórcios de microrganismos podem hidrolisar queratina mais facilmente que um único microrganismo (ICHIDA *et al.*, 2001). Em adição, a clivagem das pontes dissulfeto pode ocorrer para uma melhor degradação da proteína (KUNERT, 1992). As queratinases são endopeptidases que apresentam atividade para diversos substratos protéicos e sua habilidade para degradar a queratina pode estar associada com a ação cooperativa de várias enzimas (YAMAMURA *et al.*, 2002; GIONGO *et al.*, 2007).

O uso dos microrganismos queratinolíticos surgiu como uma alternativa para a reciclagem de bioprodutos que contenham queratina, gerados principalmente pelas indústrias avícolas e de couro.

No presente trabalho, conseguiu-se aumentar em 70% a produção de queratinases de uma estirpe de *C. parapsilosis*, e tendo em vista que essas enzimas apresentam diversas aplicações industriais, o mutante J5 pode ser utilizado para

produzir queratinases que atuem em diversas áreas biotecnológicas. Exemplos de aplicações, seriam o melhoramento do valor nutricional de rações animais, formulação de cosméticos que contenham essa enzima, e formulações tópicas para eliminação de acne e psoríase, além de poderem ser utilizadas para aumentar a absorção de drogas através da placa ungueal, já que é grande a dificuldade de tratamento de onicomicoses.

## *VI. Conclusões*

As queratinases são peptidases importantes para o tratamento de resíduos ricos em queratina. O aumento da informação sobre microrganismos queratinolíticos e sobre as propriedades bioquímicas das queratinases é importante para um melhor entendimento sobre a degradação da queratina. Essa grande quantidade de informações que estão sendo disponíveis leva ao desenvolvimento de produtos e processos relacionados ao adequado manejo de resíduos através da reciclagem de bioprodutos agroindustriais. Sendo as queratinases de leveduras do gênero *Candida* muito pouco estudadas, o presente trabalho conseguiu caracterizar peptidases de uma amostra de *Candida parapsilosis* e gerar mutantes através do uso do agente mutagênico etil metanosulfonato com uma maior expressão de queratinases e peptidases.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- A mutação com o agente mutagênico etil metanosulfonato foi capaz de aumentar a produção de queratinases pela estirpe de *Candida parapsilosis* isolada de resíduos da indústria avícola.

- Os três mutantes de *Candida parapsilosis* denominados H36, I7 e J5 apresentam uma atividade queratinolítica respectivamente 40%, 50% e 70% superior à estirpe selvagem.

- As queratinases do mutante J5 e da estirpe selvagem apresentaram uma melhor atividade queratinolítica no 5º dia de cultivo quando foi realizada uma cinética enzimática através de dosagens queratinolíticas e zimografias com queratina copolimerizada.

- Foram determinados o pH e a temperatura ótimos para a atividade queratinolítica dos sobrenadantes de cultura das amostras de *C. parapsilosis*, onde as duas estirpes tiveram seu máximo de atividade em pH 6,0 e temperatura de 37°C.

- A mutagênese foi capaz de aumentar a produção de outras peptidases além da queratinase, como peptidases capazes de degradar BSA, gelatina, caseína e hemoglobina.

- As amostras apresentaram a produção de metalopeptidases com capacidade de degradar gelatina e serina peptidases com atividade queratinolítica.

- Tendo em vista o enorme potencial das queratinases em aplicações industriais, as queratinases dos mutantes de *C. parapsilosis* podem apresentar aplicações em diversas áreas como em cosméticos, formulações tópicas para onicomicoses, entre outras aplicações.

*VII. Referências  
Bibliográficas*

- ABDEL-RAHMAN, S.M. **Polymorphic protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans***. Mycopathologia 150, 117–120, 2000.
- AHEARN, D. G.; & MEYERS, S. P. **The role of fungi in the decomposition of hydrocarbons in the marine environment**. Biodeterioration of Materials, Vol. 2, London, Applied Science, 1972.
- ALIBARDI, L.; TONI, M. **Cytochemical and molecular characteristics of the process of cornification during feather morphogenesis**. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 43:1–69, 2008.
- ALLPRESS, J. D.; MOUTAIN, G.; & GOWLAND, P. C. **Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIMB 9497**. Letters in Applied Microbiology, 34: 337-342, 2002.
- ANBU, P.; HILDA, A.; SUR, H.; HUR, B.; JAYANTHI, S. **Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil**. International Biodeterioration & Biodegradation, 62: 287–292, 2008.
- :
- ARAI, K. M.; TAKAHASHI, R.; YOKOTE, Y.; AKAHANE, K. **Amino acid sequence of feather keratin from fowl**. European Journal of Biochemistry. 132: 501–507, 1983.
- BÁLINT, B.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; PEREI, K.; & KOVÁCS, K. L. **Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen**. Applied Microbiology and Biotechnology, 69: 404–410, 2005.
- BERNAL, C.; CAIRÓ, J.; & COELLO, N. **Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea***. Enzyme and Microbial Technology, 38: 49–54, 2006.
- BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. **Keratinolytic activity of *Kocuria rosea***. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 255-261. 2003.

- BERTSCH, A.; & COELLO, N. **A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient.** *Bioresource Technology*, 96: 1703–1708, 2005.
  
- BÖCKLE, B.; GALUNSKI, B.; & MÜLLER, R. **Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530.** *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3705–3710, 1995.
  
- BÖCKLE, B.; & MÜLLER, R. **Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers.** *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 790–792, 1997.
  
- BON, E. P.; & VERMELHO, A. B. **Queratinases. Em Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** 1ªed., Rio de Janeiro, Legis Summa, Ltda, 2004.
  
- BRANDELLI, A.; & RIFFEL, A. **Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium sp.* growing on raw feathers.** *Electronic Journal of Biotechnology*, 8: 35–42, 2005.
  
- BRANDELLI, A. **Bacterial Keratinases: Useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond.** *Food and Bioprocess Technology*, 1: 105-116, 2008.
  
- BRESSOLIER, P. ; LETOURNEAU, F. ; URDACI, M. ; VERNEUIL, B. **Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2570–2576, 1999.
  
- BROUTA, F.; DESCHAMPS, F.; FETT, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C. **Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*.** *Medical Mycology*, 39: 269-275, 2001.

- CAI, C. G.; LOU, B. G.; & ZHENG, X. D. **keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis***. Journal of Zhejiang University Science B 9(1):60-67, 2008.
  
- CANTERA, C. S. **Hair shaving unhairing process. Parte 4. Remarks on the evolution of the investigation on enzyme unhairing**. Journal of the Society of Leather Technology Chemists, 85: 836– 841, 2001.
  
- CHITTE, R. R.; NALAWADE, V. K.; & DEY, S. **Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8**. Letters in Applied Microbiology, 28:131–136, 1999.
  
- COULOMBE, P.A.; & OMARY, M. B. **‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments**. Current Opinion in Cell Biology, 14:110-122, 2002.
  
- DE TONI, C. H.; RICHTER, M. F.; CHAGAS, J. R.; HENRIQUES, J. A. P.; & TERMIGNONI, C. **Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophila* strain**. Canadian Journal of Microbiology, 48:342–348, 2002.
  
- 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, 10:563-567, 1994.
  
- EVANS, E. G. V. **Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: A review**. Journal of the American Academy of Dermatology, 38: 32-36, 1998.
  
- EVERETT, A. L.; GORDON, T. C.; & WINDUS, W. **Assay of proteolytic depilatory enzymes on keratin: activation with metabisulphite**. Enzymologia, 24:14-24, 1962.

- FARAG, A. M.; & HASSAN, M. A. **Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus orizae*.** *Enzyme and Microbial Technology*, 34:85–93, 2004.
- FLEET, G. H. **Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety.** *Current Opinion in Biotechnology* , 18:170-175, 2007.
- FRIEDRICH, A. B.; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2875-2882, 1996.
- FUCHS, E.; & MARCHUK, D. **Type I and type II keratins have evolved from lower eukaryotes to form the epidermal intermediate filaments in mammalian skin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80:5857-5861, 1983.
- FUCHS, E.; TYNER, A.L.; GIUDICE, G.J.; MARCHUK, D., RAYCHAUDHURY, A.; ROSENBERG, M. **The human keratin genes and their differential expression.** *Current Topics in Developmental Biology*, 22: 5–34, 1987.
- FUSEK, M; SMITH, E. A.; MONODB, M; FOU DLING, S. I. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *Federation of European Biochemical Societies*, vol. 327 n°1, 108-112. 1993.
- GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M. R. V.; SUBRAMANIAN, T. E.; JAYRAMAN, K. **Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins.** *Process Biochemistry*, 30: 457–462, 1995.

- GIONGO, J. L.; LUCAS, F. S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. **Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 375–382, 2007.
  
- GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; & MOREL, C. M. 1984. **Trypanosomatid characterization by Schizodeme Analysis.** In Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual (C. M. Morel, Ed.), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 1984.
  
- GRADISAR, H.; KERN, S.; & FRIEDRICH, J. **Keratinase of *Doratomyces microsporus*.** Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 196–200, 2000.
  
- GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; DE JONG, E. V.; BRANDELLI, A. **Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase.** Animal Feed Science and Technology, 126: 135–144, 2006.
  
- GRAZZIOTIN, A.; PIMENTEL, F. A.; SANGALI, S.; DE JONG, E. V.; BRANDELLI, A. **Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2.** Bioresource Technology, 98:3172–3175, 2007.
  
- GRYWNOWICZ, G.; LOBARZEWSKI, J.; WAWRZKIEWICZ, K.; & WOLSKI, T. **Comparative characterization of proteolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and *Trichophyton verrucosum*.** Journal of Medical and Veterinary Mycology, 27: 319-328, 1989.
  
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 15-32, 2002.
  
- GUPTA, R.; RAMMANI, P. **Microbial keratinases and their prospective applications: an overreview.** Applied Microbiology and Biotechnology, 70:21–33, 2006.

- HATTORI, M.; YOSHIURA, K.; NEGI, M.; & OGAWA, H. **Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans***. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 22:175-183, 1984.
  
- HEUSSEN, C. & DOWDLE, E. B. **Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates**. Analytical Biochemistry, 102: 196-202, 1980.
  
- HUBE, B. **Extracellular proteinases of human pathogenic fungi**. Contributions to Microbiology, 5: 126–137, 2000.
  
- ICHIDA, J. M.; KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C. A.; KEENER, H. M.; ELWELL, D. L.; BURTT JR, E. H. **Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost**. Journal of Microbiological Methods, 47:199–208, 2001.
  
- JONES, B. L.; FONTANINI, D.; JARVINEN, M.; PEKKARINEN, A. **Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin**. Analytical Biochemistry, 263: 214-220, 1998.
  
- KAPICA, L.; & BLANK, F. **Growth of *Candida albicans* on keratin as a sole source of nitrogen**. Dermatologia, 115:81-105, 1957.
  
- KAPICA, L.; & BLANK, F. **Growth of *Candida parapsilosis* on keratin as a sole source of nitrogen**. Dermatologia, 117:433-454, 1958.
  
- KIM, J. M.; LIM, W. J.; & SUH, H. J. **Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste**. Process Biochemistry, 37, 287–291, 2001.
  
- KOJIMA, M.; KANAI, M.; TOMINAGA, M.; KITAZUME, S.; INOUE, A.; HORIKOSHI, K. **Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01**. Extremophiles, 10: 229-235, 2006.

- KORNILLOWICZ-KOWALSKA, T. **Studies on the decomposition of keratin wastes by saprophytic microfungi: I. Criteria for evaluating keratinolytic activity.** *Acta Mycologica*, 32 (1): 51-79, 1997.
  
- KREPLAK, L.; DOUCET, J.; DUMAS, P.; BRIKI, F. **New aspects of the  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet transition in stretched hard  $\alpha$ -keratin fibers.** *Biophysical Journal*, 87: 640-647, 2004.
  
- KUNERT, J. **Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*.** *Mycoses*, 35: 343-348, 1992.
  
- KUTTIN, E. S.; BEEMER, A. A. M.; & MEROZ, M. **Chicken dermatitis and loss of feathers from *Candida albicans*.** *Avian Diseases*, vol.20 n°1, 1976.
  
- LAEMMLI, V. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227: 680-685, 1970.
  
- LANGEVELD, J. P. M.; WANG, J. J.; VAN DE WIEL, D. F. M.; SHIH, G. C.; GARSSEN, G. J.; BOSSERS, A. **Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep.** *Journal of Infectious Diseases*, 188: 1782–1789, 2003.
  
- LATSHAW, J. D.; MUSHARAF, N. & RETRUM, R. **Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry.** *Animal Feed Science and Technology*, 47: 179-188, 1994.
  
- LIN, X.; INGLIS, G. D.; YANKE, L. J.; & CHENG, K. J. **Selection and characterization of feather degrading bacteria from canola meal compost.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 149–153, 1999.
  
- 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 and Environmental Microbiology*, 61: 1469–1474, 1995.

- LINDEGREN, G.; HWANG, Y. L.; OSHIMA, Y.; LINDEGREN, C. C. **Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in *Saccharomyces***. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 7: 491-499, 1965.
  
- LLOYD, J. B. **Disulphide reduction in lysosomes**. The role of cysteine. Biochemical Journal, 237: 271-272, 1986.
  
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL R. J. **Protein measurement with the folin phenol reagent**. Journal of Biological Chemistry, 193: 264-275, 1951.
  
- LUCAS, F. S.; BROENNIMANN, O.; FEBBRARO, I.; & HEEB, P. **High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil**. Microbial Ecology, 45: 282–290, 2003.
  
- MACEDO, A. J.; SILVA, W. O. B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J. A. P.; TERMIGNONI, C. **Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 showing remarkable dehairing capabilities**. Applied and Environmental Microbiology, 71: 594–596, 2005.
  
- MACGILLIVRAY, A. R.; & SHIARIS, M. P. **Biotransformations of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments**. Applied and Environmental Microbiology, 59: 1613-1618, 1993.
  
- MCKERROW, J. H. **Development of cysteine peptidase inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanisms of action**. International Journal for Parasitology, 29:833-837, 1999.
  
- MALVIYA, H. K.; RAJAK, R. C.; & HASIJA, S. K. **Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of gelatin factory**. Mycopathologia, 120: 1-4, 1992.

- MALVIYA, H. K.; TIWARI, S.; RAJAK, R. C.; & HASIJA, S. K. **Keratinolysis by four fungi isolated from the soil and effluent of gelatin factory at Jabalpur.** *Crypt. Bot.*, 3: 108-116, 1993 a.
  
- MALVIYA, H. K.; RAJAK, R. C.; & HASIJA, S. K. **In vitro degradation of hair keratin by *Graphium penicillodeus*: evidences for sulfitolysis and peptidolysis.** *Crypt. Bot.*, 3: 197-201, 1993 b.
  
- MCKERROW, J. H. **Development of cysteine peptidase inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanisms of action.** *International Journal for Parasitology*, 29:833-837, 1999.
  
- MIGNON, B.; SWINNEN, M.; BOUCHARA, J. P.; HOFINGER, M.; NIKKLES, A.; PIERARD, G.; GERDAY, C.; LOSSON, B. **Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats.** *Medical mycology*, 36:395-404, 1998.
  
- MOHAMEDIN, A. H. **Isolation, identification and some cultural conditions of a protease-producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as substrate.** *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43:13–21, 1999.
  
- MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. **An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery.** *International Journal of Pharmaceutics*, 332: 196–201, 2007.
  
- NAM, G. W.; LEE, D.W.; LEE, H. S.; LEE, N. J.; KIM, B. J.; CHOE, E. A. **Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolating keratinase-producing thermophilic anaerobe.** *Archives of Microbiology*, 178: 538–547, 2002.

- NANMORI, T.; NUMATA, Y.; & SHINKE, R. **Isolation and Characterization of a *Bacillus cereus* mutant strain hyperproductive of exo-3-amylase.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 53: 768-771, 1987.
  
- NOGUEIRA DE MELO, A. C.; DORNELAS-RIBEIRO, M.; DE SOUZA E. P.; MACRAE, A; FRACALANZZA, S. E. L., VERMELHO, A. B. **Peptidase profiles from non-*albicans* *Candida* spp. isolated from the blood of a patient with chronic myeloid leukemia and another with sickle cell disease.** FEMS Yeast Research, 7: 1004–1012, 2007.
  
- ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. **Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks.** Poultry Science, 82: 664–670, 2003.
  
- ODETALLAH, N. H.; WANG, J. J.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. **Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance.** Poultry Science, 84: 858–864, 2005.
  
- ONIFADE, A. A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL- ZARBAN, S. **A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources.** Bioresource Technology, 66: 1-11, 1998.
  
- PAPADOPOULOS, M. C. **A review: Effect of processing on high protein feedstuffs.** Biological Wastes, 29: 123-138, 1989.
  
- PAPADOPOULOS, M. C.; EL BOUSHY, A. R.; ROODBEEN, A. E.; & KETELAARS, E. H. **Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal.** Animal Feed Science and Technology, 14: 279–290, 1986.
  
- PISSUWAN, D; & SUNTORNSUK, W. **Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand.** Kasetsart Journal, 35: 171—178, 2001.

- POOPATHI, S.; & ABIDHA, S. **Biodegradation of poultry waste for the production of mosquitocidal toxins.** *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 479-482, 2008.
- PORRES, J. M.; BENITO, M. J.; & LEI, X. G. **Functional expression of keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*.** *Biotechnology Letters*, 24: 631–636, 2002.
- RADHA, S; & GUNASEKARAN, P. **Cloning and expression of keratinase gene in *Bacillus megaterium* and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain.** *Journal of Applied Microbiology* 103: 1301–1310, 2007.
- RAI, S. K.; KONWARH, R.; & MUKHERJEE, A. K. **Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline  $\beta$ -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate.** *Biochemical Engineering Journal*, 2009, *article in press*.
- RAO, K. S.; BABU, K. K. R.; & GUPTA, P. D. **Keratins and skin disorders.** *Cell Biology International*, Vol. 20, No. 4: 261–274, 1996.
- RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J.; & BARRETT, A.J. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Research*, 36: 320-325, 2008.
- RIFFEL, A.; & BRANDELLI, A. **Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29: 255–258, 2002.
- RIFFEL, A.; & BRANDELLI, A. **Keratinolytic bacteria isolated from feather waste.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 37: 395–399, 2006.

- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C. M.; SOUZA, G. H. M. F.; EBERLIN, M. N.; TAVARES, F. C. A. **Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6.** Journal of Biotechnology, 128: 693–703. 2007.
  
- RIFFEL, A.; ORTOLAN, S.; & BRANDELLI, A. **De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78: 855–859, 2003.
  
- RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. **Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin.** Archives of microbiology, 179: 258-265, 2003.
  
- RISSEN, S.; & ANTRANIKIAN, G. **Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keartinolytic activity.** Extremophiles, 5: 399-408, 2001.
  
- ROOSE, J.P.; & VAN NOORDEN, C. J. F. 1995. **Synthetic protease inhibitors: Promising compounds to arrest pathobiologic process.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 125: 433-441, 1995.
  
- RUFFLIN, P., VANBRUSSEL E., BIGUET J., BISERTE G. **Partial characterization of two extracellular aminopeptidases from the dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*.** Biochimie, 61: 495-500, 1979.
  
- SANGALI, S.; & BRANDELLI, A. **Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2.** Journal of Applied Microbiology, 89:735–743, 2000.
  
- SANTOS, A. L. S.; CARVALHO, I. M.; SILVA, B. A.; PORTELA, M. B.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. A. **Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, 46: 209-220. 2005.

- SANTOS, R. M. D.; FIRMINO, A. A. P.; SÁ, C. M.; & FELIX, C. R. **Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius.** Current Microbiology, 33, 364–370, 1996.
  
- SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; & TAKAKI, G. M. C. **The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*.** Canadian Journal of Microbiology 45:423-426, 1999.
  
- SCHRAEDER, C. E.; ERVIN, R. T.; & EBERRSPACHER, J. L. **Economic analysis of the feasibility of using enzymes in the unhairing process.** Journal of the American Leather Chemists Association, 93: 265–271, 1998.
  
- SCHROOYEN, P. M. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHUR, R. C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. **Partially carboxymethylated feather keratins. 2.** Thermal and mechanical properties of films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 221-230, 2001.
  
- SHIH, J. C. H. **A review: Recent development in poultry waste digestion and feather utilization.** Poultry Science, 72: 1617-1620, 1993.
  
- SHU-FEI, Z.; JIA-HUAN, S.; MIN-CHEN, W.; JIN-PING, S.; JIAN-FANG, L. **Mutation breeding of *Aspergillus niger* strain LW-1 for high-yield b-mannanase production.** Chinese Journal of Agricultural Biotechnology 5: 153–158, 2008.
  
- SIERPINSKI, P.; GARRETT, J.; MA, J.; APEL, P.; KLORIG, D.; SMITH, T.; KOMAN, L. A.; ATALA, A.; DYKE, M. V. **The use of keratin derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves.** Biomaterials 29:118–128, 2008.
  
- SILVA, B. A.; PINTO, M. R.; SOARES, R. M. A; BARRETO-BERGTER, E.; SANTOS A. L.S. ***Pseudallesheria boydii* releases metallopeptidases capable of cleaving several proteinaceous compounds.** Research in microbiology, 157: 425-432, 2006.

- SINGH, C. J. **Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration.** Mycopathologia 143: 147-150, 1999.
- SNYDER, L. & CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria.** American Society for Microbiology. 1997.
- SOARES, C. A. G.; MAURY, M., PAGNOCCA, F. C.; ARAÚJO, F. V.; HAGLER, L. C. M., HAGLER, A. N. **Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries.** Journal of General and Applied Microbiology, 43:265 -272, 1997.
- STEINERT, P. M.; & FREEDBERG, I. M. **Molecular and cellular biology of keratins.** Goldsmith LA, editor. Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin, vol. 1. New York: Oxford University Press, p. 113-147, 1991.
- SUH, H. J.; & LEE, H. K. **Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1.** Journal of Protein Chemistry, 20: 165–169, 2001.
- SUNTORNSUK, W; & SUNTORNSUK, L. **Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation.** Bioresource Technology 86: 239–243, 2003.
- SYED, D. G.; LEE, J. C.; LI, W.; KIM, C.; AGASAR, D. **Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*.** Bioresource Technology 100: 1868–1871, 2009.
- THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. **Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing.** Trends in Biotechnology, 22: 181–188, 2004.
- THAPPA D. M. **Current treatment of onychomycosis.** Indian Journal Dermatology, Venereology and Leprology, 73: 373-376, 2007.

- 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, 39:181–186, 2004.
  
- THYS, R. C. S.; & BRANDELLI, A. **Purification and properties of a keratinolytic metalloproteases from *Microbacterium* sp.** Journal of Applied Microbiology, 101: 1259-1268, 2006.
  
- TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; & LÓPEZ-JODRA, O. **Epidemiology of nail infection due to keratinophilic fungi.** Revista Iberoamericana de Micología, 699: 122-135, 2000.
  
- VARELA, H.; FERRARI, M. D.; BELOBRAJDIC, L.; VÁZQUEZ, A.; LOPERENA, M. L. **Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*, production and partial characterization.** Biotechnology Letters, 19: 755–758, 1997.
  
- VERMELHO, A. B.; NOGUEIRA DE MELO; A. C.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L.; D’AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, P. S. **Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. Em Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** Editora Interciência, 2008.
  
- VERMELHO, A. B.; MAZOTTO, A. M.; NOGUEIRA DE MELO, A. C.; VIEIRA, F. H. C.; DUARTE, T. R.; MACRAE, A.; NISHIKAWA, M. M.; BON, E. P. S. **Identification of a *Candida parapsilosis* strain producing extracellular serine peptidase with keratinolytic activity.** Mycopathologia, *in press*.
  
- VIGNARDET, C.; GIULLAUME, Y. C.; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. **A first order experimental design to assess to soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates.** International Journal of Pharmaceutics, 191: 95-102, 1999.

- VITAL, M. J. S.; ABRANCHES, J.; HAGLER, A. N.; HAGLER, L. C. M. **Mycocinogenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá Ecological Station, Roraima-Brazil.** Brazilian Journal of Microbiology 33:230-235, 2002.
  
- VOET, D.; VOET, J. G. **Three-dimensional structure of proteins.** Stiefel Journal Biochemistry, 2° ed. Wiley, New York, 1995.
  
- [www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br) - (11/06/2009)
  
- [www.chem.qmul.ac.uk/iubmb](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb) - (27/05/2009)
  
- <http://merops.sanger.ac.uk> - (06/04/2009)
  
- WANG, C. L.; LI, D.F.; LU, W.Q.; WANG, Y.H.; LAI, C.H. **Influence of cultivating conditions on the alpha- galactosidase biosynthesis from a novel strain of *Penicillium* sp. in solid-state fermentation.** Letters in Applied Microbiology, 39(4): 369-375, 2004.
  
- WANG, H.; GUO, Y.; & SHIH, J. C. H. **Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals.** Animal Feed Science and Technology, 140: 376–384. 2007.
  
- 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 and Biotechnology, 22: 608–616, 1999.
  
- WANG, J. J.; ROJANATAVORN, K.; & SHIH, J. C. H. **Increased production of *Bacillus* keratinase by chromosomal integration of multiple copies of the *kerA* gene.** Biotechnology and Bioengineering, 87: 459–464, 2004.
  
- WANG, J. J.; SWAISGOOD, H. E.; & SHIH, J. C. H. **Bioimmobilization of keratinase using *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* systems.** Biotechnology and Bioengineering, 81: 421–429, 2003.

- WANG, X.; & PARSONS, C. M. **Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals.** Poultry Science, 76: 491-496, 1997.
  
- WAWRZKIEWICZ, K.; LOBAREWSKI, J.; WOLSKI, T. **Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*.** Journal of Medical Veterinary Mycology, 25: 261-268, 1987.
  
- WERLANG, P. O.; & BRANDELLI, A. **Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 120:71–80, 2005.
  
- WICKERHAM, L. J. **Recent advances in the taxonomy of yeasts.** Annual Review of Microbiology. 6: 317-332, 1952.
  
- WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; MACKENZIE, J. M. Jr.; SHIH, J. C. H. **Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium.** Applied and Environmental Microbiology, 56: 1509-1515, 1990.
  
- WILLIAMS, C. M.; LEE, C. G.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. **Evaluation of a bacterial feather fermentation product, featherlysate, as a feed protein.** Poultry Science, 70: 85–94, 1991.
  
- WU, C.; VALENTINO, S. J.; FARRELL, R. L.; BERGQUIST, P. L.; NEVALAIEN, K. M. H. **Improvement of the secretion of extracellular proteins and isolation and characterization of the amylase I (amy1) gene from *Ophiostoma floccosum*.** Gene, 384: 96–103, 2006.
  
- YAMADA, S.; WIRTZ, D. & COULOMBE, P. A. **Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments.** Molecular Biology of the cell, Vol. 13: 282-391, 2002.

- YAMAMURA, S.; YASUTAKA, M.; QUAMRUL, H.; YOKOYAMA, K.; & TAMIYA, E. **Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenetrophomonas* sp.** Biochemical and Biophysical Research Communications, **294**: 1138-1143, 2002.
  
- YAMAUCHI, K.; YAMAUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KHODA, A.; KONISHI, Y. **Preparation of stable aqueous solutions of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films.** Journal of Biomedical Material Research, 31: 439–444, 1996.
  
- ZAGHLOUL, T. I.; HAROUN, M. A.; EL-GAYAR, K.; ABEDALAL, A. **Recycling of keratin-containing materials (chicken feather) through genetically engineered bacteria.** Polymer–Plastics Technology and Engineering, 43: 1589–1599, 2004.
  
- ZERDANI, I.; FAID, M.; & MALKI, A. **Feather wastes digestion by a new isolated strains *Bacillus* sp.** African Journal Biotechnonology 3: 67-70, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)