

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**QUERATINASE DA BACTÉRIA TERMÓFILA *Anoxybacillus* sp. PC2:  
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO**

**Sharon Vieira dos Reis**

**Orientador: Dr. Alexandre José Macedo**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, fevereiro de 2014.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul

---

Dr. Plinho Francisco Hertz

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dr. Adriano Brandelli

Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Dra. Adriana Seixas (Suplente)

Departamento de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana e no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPERGS.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre José Macedo, pelos ensinamentos, confiança e liberdade concedida durante o desenvolvimento deste trabalho, e também pela amizade ao longo destes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Carlos Termignoni, pelas considerações e contribuições em várias etapas do meu mestrado.

Aos meus pais e familiares pelo incentivo e compreensão.

Ao Eduardo pelo apoio, parceria nas horas de estudo e incentivo mesmo nos momentos difíceis.

A todos os colegas e amigos (que já fizeram ou fazem parte) do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana e do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas por todos os ensinamentos e sugestões, e também pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

À Karine Zimmer pela revisão do meu manuscrito e sugestões sempre relevantes ao meu trabalho.

Aos colegas do laboratório 213, especialmente ao Lucas Tirloni, e à Adriana Seixas, pelas contribuições e auxílio.

Aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial ao Luciano, à Sílvia e à Grasiela pela disponibilidade e auxílio sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Charley Staats pela revisão da dissertação.

Aos meus amigos que não participam da minha vida acadêmica, mas contribuem tornando a vida mais fácil, leve e divertida: Bianca, Tom, Carol, Josi e Gui.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1.PENAS DE AVES .....	10
<b>1.1.1.Produção avícola</b> .....	10
<b>1.1.2.Estrutura das penas de aves</b> .....	12
<b>1.1.3.Descarte e utilização dos resíduos de pena</b> .....	15
1.2.QUERATINASES .....	16
<b>1.2.1.Micro-organismos produtores de queratinases</b> .....	17
<b>1.2.2.Características bioquímicas e propriedades das queratinases</b> .....	19
<b>1.2.3.Mecanismos de degradação da queratina</b> .....	21
<b>1.2.4.Aplicações</b> .....	22
1.3.BACTÉRIAS TERMÓFILAS E PROTEASES TERMOESTÁVEIS .....	23
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	27
<b>3.CAPÍTULO I: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE UMA QUERATINASE TERMOATIVA PRODUZIDA POR <i>Anoxybacillus</i> sp. PC2 ISOLADO DA REGIÃO SEMIÁRIDA BRASILEIRA (CAATINGA)</b> .....	28
ABSTRACT .....	30
3.1.INTRODUCTION .....	31
3.2.MATERIALS AND METHODS .....	33
3.3.RESULTS AND DISCUSSION .....	37
3.4.CONCLUSIONS .....	45
REFERENCES .....	45
<b>4.CAPÍTULO II: ESTUDOS VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA QUERATINASE PRODUZIDA POR <i>Anoxybacillus</i> sp. PC2</b> .....	48
4.1.MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
4.2.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51

<b>5.CAPÍTULO III: ESTUDOS PARA CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO ISOLADO <i>Anoxybacillus</i> sp. PC2</b> .....	55
5.1.MATERIAIS E MÉTODOS .....	55
5.2.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
<b>6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	61
<b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
<b>CURRICULUM VITÆ</b> .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

$\mu\text{g}$  – micrograma  
 $\mu\text{L}$  – microlitro  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro  
atm – atmosfera  
BCA – ácido bicinconínico  
BSA – albumina sérica bovina  
C – carbono  
Da – Dalton  
dNTP – desoxirribonucleotídeo trifosfatado  
DTT – ditioneitol  
ESI – ionização por electrospray  
g – grama/ aceleração da gravidade  
H – hidrogênio  
h - horas  
kDa – quilodaltons  
M – molar  
mM – milimolar  
mg – miligrama  
mL – mililitro  
min – minutos  
N – nitrogênio  
nm – nanômetro  
NMWL – nominal molecular weight limit  
O – oxigênio  
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
Q-TOF – quadrupolo-tempo de voo  
rpm – rotações por minuto  
rRNA – RNA ribossomal  
S – enxofre  
SDS – dodecilsulfato de sódio  
TCA – ácido tricloroacético  
ton – tonelada  
U – unidade de atividade enzimática  
V – Volts  
v/v – volume por volume  
w/v – peso por volume

## RESUMO

Queratinases são proteases de especial interesse devido a sua ação sobre a queratina insolúvel, que por sua vez, é o principal componente das penas. As penas de aves são fonte de aminoácidos, e, portanto, são transformadas em farinha de pena e utilizadas em ração animal. Entretanto, este produto possui baixo valor nutricional devido a sua baixa digestibilidade, já que a queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns. Nesse contexto, as queratinases microbianas são uma abordagem promissora para conversão de queratina em hidrolisados proteicos. Os objetivos deste trabalho foram selecionar e identificar bactérias termófilas provenientes do bioma Caatinga (Brasil) capazes de produzir queratinases termoativas, e caracterizar a queratinase produzida pelo isolado selecionado. Oito bactérias proteolíticas foram isoladas de uma amostra de solo. Destas, o *Anoxybacillus* sp. PC2 produziu queratinase com maior atividade em meio composto por penas (2%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,04%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,2%) e NaCl (0.05%) em pH 6,5 e 60 °C. A protease queratinolítica foi parcialmente purificada por concentração em dispositivo de filtração (10.000 NMWL) e cromatografia de troca aniônica. A protease parcialmente purificada foi ativa em uma faixa de pH de 5 a 10, com alta atividade entre as temperaturas de 50 e 80 °C. A atividade ótima foi observada em pH 7 e entre 50 e 60 °C, tornando-a adequada para utilização em processos biotecnológicos para bioconversão de queratina. Um estudo molecular conduzido para identificar a provável protease queratinolítica produzida pelo *Anoxybacillus* sp. PC2 identificou uma metaloprotease neutra, cujo gene apresentou 98% de similaridade com o gene *nprS* de *Geobacillus stearothermophilus*.



## ABSTRACT

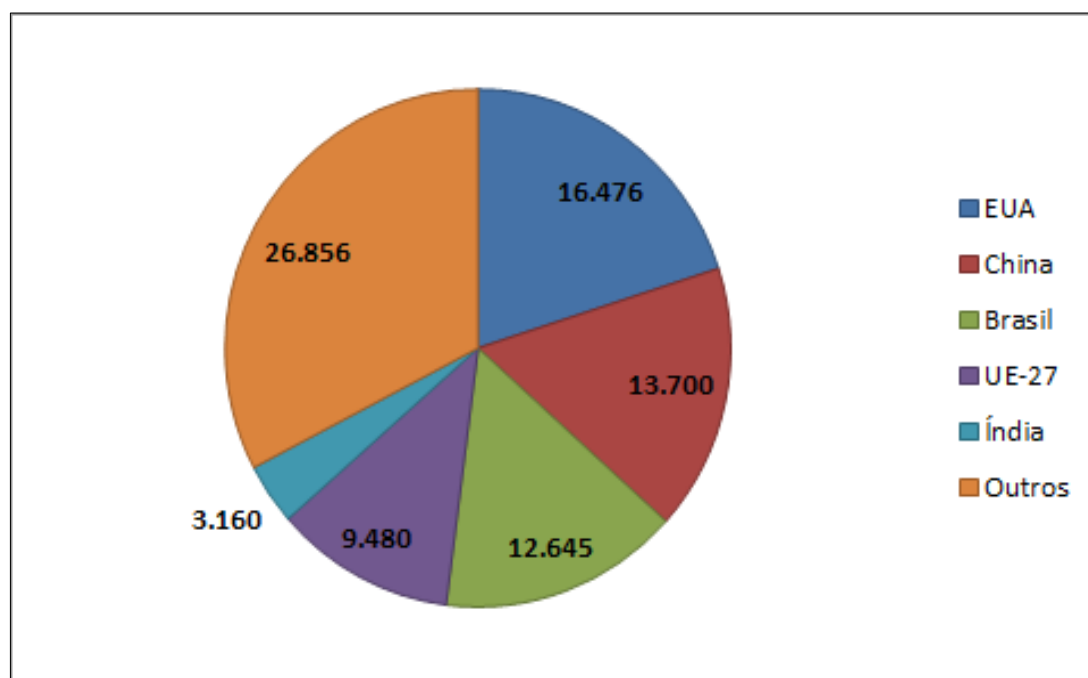
Keratinases are proteases of special interest due to their action on insoluble keratin, which in turn, is the major component of feathers. The poultry feathers are a source of amino acids, and therefore, are converted to feather meal to be used as animal feedstuff. However, this product has low nutritional value due to its poor digestibility, since keratin is not degraded by common proteolytic enzymes. In this context, microbial keratinases are a promising approach to convert keratin into protein hydrolysates. The aims of this study were to select and identify thermophilic bacteria from Caatinga biome (Brazil) capable to produce thermoactive keratinases, and characterize the keratinase produced by the selected isolate. Eight proteolytic bacteria were isolated from a soil sample. Of these, *Anoxybacillus* sp. PC2 produced keratinase with higher activity in a medium composed of 2% feather waste, 0.04%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 0.05% NaCl at pH 6.5 incubated at 60 °C. The keratinolytic protease was partially purified by concentration in a centrifugal filter device (10,000 NMWL) and anion-exchange chromatography. The partially purified protease was active in a pH range of 5.0-10.0 with high activity in temperature range of 50-80 °C. The optimum activity was observed at pH 7.0 and 50-60 °C, making it suitable for biotechnological processes for keratin bioconversion. A molecular study conducted to identify the presumable keratinolytic protease produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 identified a neutral metalloprotease whose gene showed 98% similarity with *Geobacillus stearothermophilus* nprS gene.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PENAS DE AVES

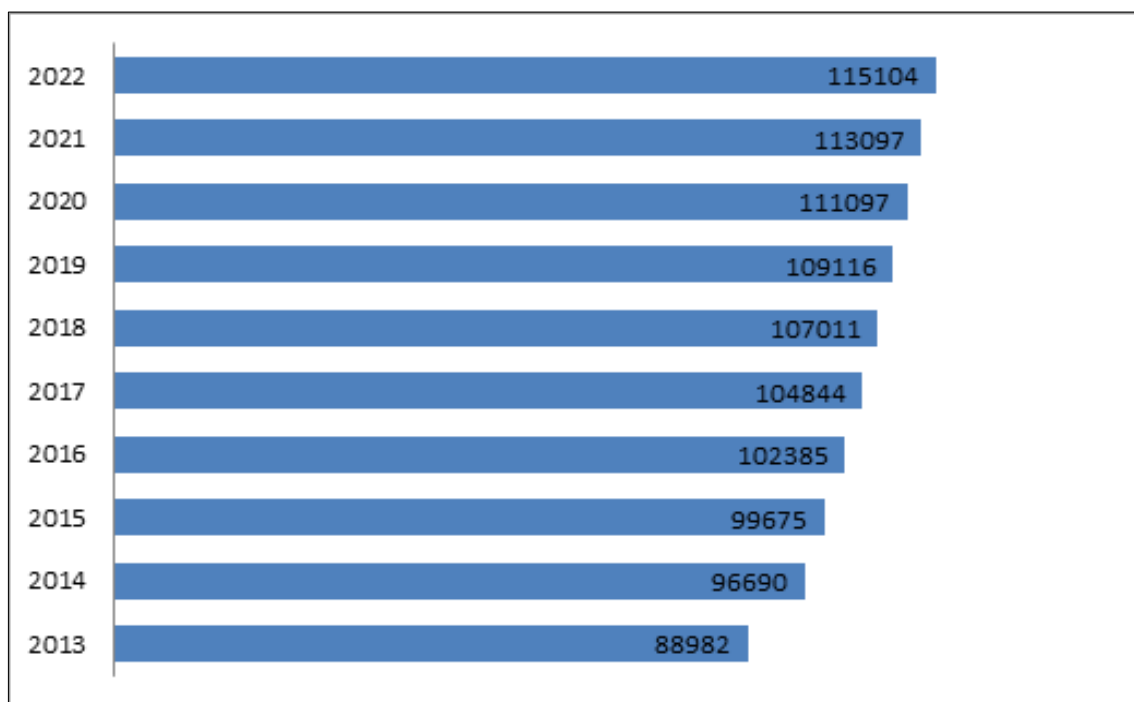
#### 1.1.1 Produção avícola

A produção e o consumo de aves de corte têm crescido mundialmente. O Brasil é hoje o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, tendo produzido mais de 12 milhões de toneladas em 2012, atrás apenas da China e dos Estados Unidos (União Brasileira de Avicultura – UBABEF) (Figura 1).



**Figura 1:** Produção mundial de carne de frango em 2012 (mil ton)  
(Adaptado de UBABEF, 2013)

Segundo projeção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), a estimativa de produção mundial de carne de aves, incluindo frango e peru, em 2014 é de 96,69 milhões de toneladas (Figura 2).



**Figura 2:** Projeção a longo prazo da produção mundial de carne de aves (mil ton)  
(Adaptado de USDA, 2013)

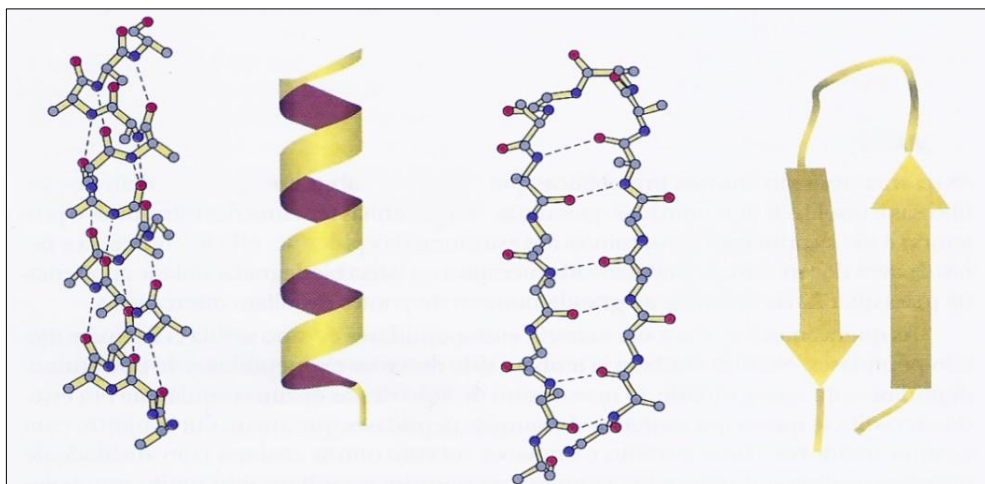
O abate e processamento das aves gera uma grande quantidade de subprodutos e resíduos, como pele, gordura, cartilagem, ossos, sangue e penas (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Considerando-se que o total de penas representa aproximadamente 6% do peso dos frangos (STILBORN *et al.*, 1997), pode-se estimar que mais de 5 milhões de toneladas deste resíduo serão gerados a nível mundial somente no ano de 2014.

Com a tendência ao aumento do consumo e produção de produtos avícolas no âmbito nacional e mundial, a quantidade de resíduo de penas produzido também tende a aumentar proporcionalmente.

### 1.1.2. Estrutura das penas de aves

As penas de aves são compostas em cerca de 90% por queratinas (RAMNANI *et al.*, 2005), que também compõem pelos, unhas, chifres, cascos e lã (GUPTA & RAMNANI, 2006). Proteínas fibrosas com funções mecânica e de proteção, as queratinas são insolúveis em água, ácidos fracos, álcalis e solventes orgânicos (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

Esse grupo de proteínas possui uma grande diversidade, destacando-se dois tipos principais: a  $\alpha$ -queratina – principal componente de pelos, unhas, cascos e epiderme –, e a  $\beta$ -queratina – presente nas teias de aranha, fios de seda, e principal componente das penas de aves (Figura 3). A estrutura secundária da  $\alpha$ -queratina consiste predominantemente de cadeias polipeptídicas que se enrolam formando uma estrutura bastante rígida, a  $\alpha$ -hélice. No caso da  $\beta$ -queratina, a estrutura em  $\beta$ -folha forma filamentos flexíveis e macios (VERMELHO *et al.*, 2008a).



**Figura 3:** Estruturas secundárias da queratina:  $\alpha$ -queratina em  $\alpha$ -hélice (esquerda) e  $\beta$ -queratina em  $\beta$ -folha (direita)  
(Adaptado de VERMELHO *et al.*, 2008a)

Essas estruturas são fortemente estabilizadas por ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas, através de pontes dissulfeto entre os átomos de enxofre dos aminoácidos cisteína. O alto conteúdo de cisteína favorece a formação de pontes dissulfeto, que juntamente com ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os polipeptídeos, conferem à queratina força e resistência à proteólise (ONIFADE *et al.*, 1998).

Com base em seu conteúdo de enxofre, as queratinas ainda podem ser classificadas como macias ou duras. As queratinas macias (presentes na pele e nos calos) possuem menor quantidade de pontes dissulfeto e são mais maleáveis, ao contrário das queratinas duras (encontradas em penas, pelos, cascos e unhas), que possuem maior conteúdo de pontes dissulfeto e são mais resistentes (GUPTA & RAMNANI, 2006).

A composição de aminoácidos na queratina das penas pode variar de acordo com a idade do frango (STILBORN *et al.*, 1997) e tipo de alimentação das aves, mas de maneira característica, é encontrado alto conteúdo de cistina, glicina, serina e prolina, e deficiência em outros aminoácidos, como histidina, lisina e triptofano (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011). A Tabela 1 compara análises do conteúdo de aminoácidos presentes em penas de frango.

**Tabela 1:** Composição de aminoácidos em penas de frango (g/100g de penas)

Aminoácidos	WILLIAMS <i>et al.</i> , 1991	DALEV, 1994	Macedo, 2011 (dados não publicados)
Alanina	4,24	5,66	3,23
Arginina	7,86	6,74	5,64
Aspartato	6,67	6,80	5,21
Cistina	6,75	4,61 <sup>a</sup>	9,92
Fenilalanina	4,83	5,22	4,00
Glicina	7,10	7,66	5,90
Glutamato	11,75	10,25	8,34
Histidina	0,63	1,44	0,24
Isoleucina	5,18	4,92	4,27
Leucina	8,13	8,43	6,50
Lisina	2,16	2,23	0,98
Metionina	0,46	0,64	4,51
Prolina	ND	9,08	8,63
Serina	11,70	11,44	9,49
Tirosina	2,51	2,41	2,03
Treonina	5,02	4,89	3,81
Triptofano	0,61	ND	0,10
Valina	7,62	7,61	7,46
Soma de aminoácidos	93,22	100,03	90,26

ND: não determinado

<sup>a</sup> Valor referente ao aminoácido cisteína

Nesse contexto, as penas de aves aparecem como uma fonte alternativa e barata de aminoácidos com potencial utilização na alimentação animal. Entretanto, devido a sua estrutura, a queratina é insolúvel e resistente à ação da maioria das proteases comuns, como a pepsina, a tripsina e a papaína (GUPTA & RAMNANI, 2006). Sendo assim, as enzimas digestivas de mamíferos e aves não hidrolisam a queratina, e conseqüentemente

seu valor nutritivo é muito baixo apesar da grande concentração de aminoácidos (VERMELHO *et al.*, 2008a).

### **1.1.3. Descarte e utilização dos resíduos de penas**

Grande parte dos resíduos proteicos de difícil degradação, provenientes da produção animal para consumo, é descartada por incineração. Entretanto, este método é ecologicamente prejudicial em função do alto gasto energético e produção de grande quantidade de dióxido de carbono (SUZUKI *et al.*, 2006).

Os subprodutos de origem animal são basicamente compostos de C, N, H, O e S, sendo, portanto, passíveis de reaproveitamento e utilização em diferentes indústrias, como a de alimentação animal, por exemplo. Um método comum de conversão desses resíduos sólidos é por meio de um processo que utiliza temperatura de aproximadamente 133 °C e pressão de 3 atm por cerca de 20 minutos, separando a gordura da porção proteica. A seguir, os resíduos proteicos são secos e moídos para obtenção de farinhas de carne e osso, e farinha de pena. No caso da farinha de pena, esse tratamento ainda pode ser feito em soluções ácidas ou alcalinas para clivar as pontes dissulfeto e romper as interações hidrofóbicas, tornando as proteínas mais solúveis e digeríveis (LASEKAN *et al.*, 2013). Entretanto esses processos destroem certos aminoácidos termolábeis e provocam a formação de outros, como a lantionina, resultando em um produto de baixa qualidade proteica e baixa digestibilidade (PAPADOPOULOS, 1989).

Outra forma de reaproveitamento de penas que tem sido amplamente estudada nos últimos anos é a produção de hidrolisados proteicos. TASKIN & KURBANOGLU (2011) demonstraram que uma peptona de penas, produzida a partir da hidrólise ácida de penas de

aves, poderia ser utilizada como fonte de C e N em meio de cultivo, podendo substituir peptonas comerciais. Além disso, diversos estudos mostram que a adição de penas ao meio de cultura pode induzir a produção de queratinases extracelulares por certos micro-organismos (SYED *et al.*, 2009; MAZOTTO *et al.*, 2011). Nesse caso, além da produção das enzimas, que possuem ampla aplicação em indústrias de detergentes, cosméticos e couro, o hidrolisado composto de peptídeos e aminoácidos provenientes da degradação de penas ainda poderia ser aproveitado em outros processos, como peptona e formulação de cosméticos (LASEKAN *et al.*, 2013).

Um tratamento alternativo tem sido sugerido por diferentes autores para a produção de um concentrado de proteínas de penas ou hidrolisado de queratina de penas (DALEV, 1980; MOKREJS, 2011). Esse método envolveria um pré-tratamento das penas com uma solução alcalina, que provocaria a redução das pontes dissulfeto, seguido de hidrólise enzimática. A utilização de uma temperatura moderada (70 - 80 °C) e curto período de incubação durante o pré-tratamento alcalino poderiam prevenir a perda e racemização de aminoácidos, além de prevenir a clivagem excessiva de peptídeos (LASEKAN *et al.*, 2013).

## 1.2. QUERATINASES

Apesar de sua elevada resistência, a queratina é reciclada na natureza pela ação de micro-organismos produtores de proteases com atividade queratinolítica, as queratinases.

Proteases, também chamadas de peptidases por hidrolisarem ligações peptídicas, são enzimas que catalisam a quebra dessas ligações em proteínas ou fragmentos de proteínas. Conforme a classificação do Comitê de Nomenclatura Enzimática da União



Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB - *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), essas enzimas pertencem à classe 3 (hidrolases) e à subclasse 3.4 (peptidases). As proteases podem ainda ser classificadas em exopeptidases, que atuam nos finais das cadeias polipeptídicas, e endopeptidases, que clivam ligações peptídicas nas regiões internas das moléculas de proteínas. De acordo com a natureza do grupo funcional de seu sítio ativo, são subdivididas em serina- (EC 3.4.16), metalo- (EC 3.4.17) e cisteína-carboxipeptidases (EC 3.4.18), serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico- (EC 3.4.23), metalo- (EC 3.4.24) e treonina-endopeptidases (EC 3.4.25), e endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido (EC 3.4.99) (VERMELHO *et al.*, 2008b).

As queratinases são geralmente serino ou metaloproteases que catalisam a liberação de peptídeos a partir da queratina (KORNILŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

### **1.2.1. Micro-organismos produtores de queratinases**

As enzimas queratinolíticas são produzidas por uma diversidade de micro-organismos entre bactérias, fungos e arqueobactérias. A maioria das queratinases microbianas é secretada extracelularmente, mas algumas intracelulares ou associadas à membrana já foram descritas (GUPTA & RAMNANI, 2006).

A produção de queratinase pode ser induzida pela adição de queratina ao meio de cultivo, sendo que a maioria dos micro-organismos que produzem essa enzima é capaz de utilizar a queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. Entretanto, o tipo de queratina que induz a produção da queratinase pode variar entre penas inteiras, farinha de pena, lã, unhas e chifre (GUPTA & RAMNANI, 2006). Além destes, diferentes substratos

não queratinosos já foram utilizados como indutores para produção de queratinases, entre eles farelo de soja, leite desnatado e soro de queijo. Ainda, essas enzimas podem ser expressas de forma constitutiva por alguns micro-organismos (BRANDELLI *et al.*, 2010).

Os fungos são fonte de enzimas queratinolíticas, tendo sido isoladas e caracterizadas queratinases produzidas por diferentes espécies. Entretanto, muitas espécies de fungos queratinolíticos são patogênicas e possuem, portanto, um limitado potencial biotecnológico. Nesse contexto, as bactérias queratinolíticas apresentam maior potencial como fonte dessas enzimas para uso industrial (VERMELHO *et al.*, 2008a). Diferentes espécies de bactérias já foram descritas como produtoras de queratinases utilizando diferentes substratos, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2:** Algumas bactérias produtoras de queratinase e substrato utilizado para produção

Micro-organismo	Substrato	Referência
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD1	Penas de frango	WILLIAMS <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus</i> sp. FK 28	Penas de frango, farinha de pena	PISSUWAN & SUNTORNUSUK, 2001
<i>Thermoanaerobacter keratinophilus</i> sp. nov.	Penas de frango, lã	RIESSEN & ANTRANIKIAN, 2001
<i>Xanthomonas maltophila</i> POA-1	Farinha de pena	DE TONI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus subtilis</i> S14	Pelo bovino	MACEDO <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus halodurans</i> PPKS-2	Penas de frango, cabelo humano, farinha de chifre	PRAKASH <i>et al.</i> , 2010a
<i>Bacillus halodurans</i> JB 99	Penas de frango	SHRINIVAS & NAIK, 2011
<i>Serratia marcescens</i> P3	Farinha de pena	BACH <i>et al.</i> , 2012

### 1.2.2. Características bioquímicas e propriedades das queratinases

O critério mais importante que designa uma protease como queratinase, é a capacidade de hidrólise de substratos queratinosos insolúveis, como penas, lã, unhas e pelos. As queratinases clivam eficientemente esses materiais, além de algumas proteínas solúveis, como caseína e BSA (GUPTA *et al.*, 2012). Essa capacidade de hidrólise das queratinases está relacionada à sua preferência por clivar aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, que por sua vez compõem entre 50-60% dos aminoácidos da queratina (BRANDELLI *et al.*, 2010). Outra importante característica é sua a propriedade de aderir-se a substratos insolúveis, sendo que maiores níveis de adsorção e acessibilidade ao substrato resultarão em maior grau de hidrólise (GUPTA *et al.*, 2012).

Importantes propriedades bioquímicas incluem pH e temperatura ótimos e massa molecular dessas enzimas. Alguns micro-organismos queratinolíticos são apresentados na Tabela 3, que mostra grande variação de características bioquímicas entre as queratinases produzidas por eles.

**Tabela 3:** Propriedades de queratinases produzidas por alguns micro-organismos

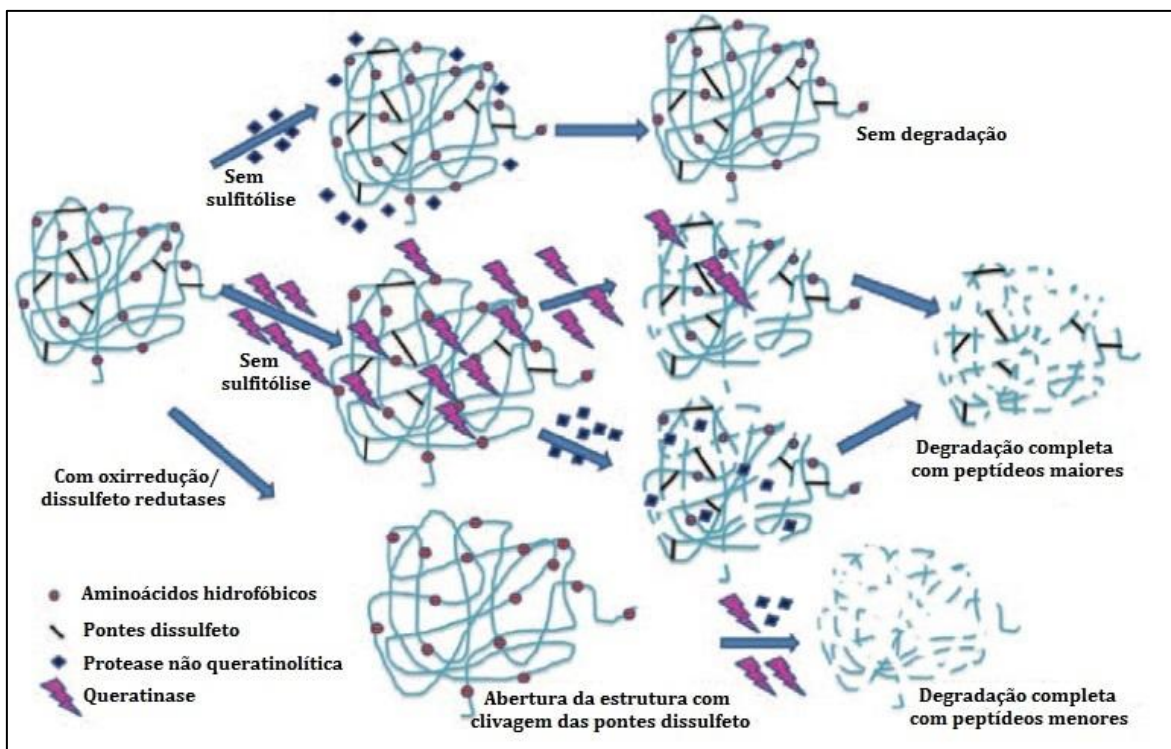
Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	9	90	69	DOZIE <i>et al.</i> , 1994
<i>Xanthomonas maltophila</i> POA-1	8	60	36	DE TONI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus</i> sp. SCB-3	7	40	134	LEE <i>et al.</i> , 2002
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	9	100	>200	NAM <i>et al.</i> , 2002
<i>Nocardiosis</i> sp. TOA-1	12,5	60	19,1	MITSUIKI <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC (9102)	6	40	69	BALAJI <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	9	45	46	SYED <i>et al.</i> , 2009
<i>Serratia marcescens</i>	6,5	40-45	53	BACH <i>et al.</i> , 2012
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BBE11-1	K1: 9	K1: 50	K1: 48	FANG <i>et al.</i> , 2013
	K2: 9	K2: 40	K2: 36	
	K3: 8	K3:40	K3: 17	

A maioria das queratinases possui pH ótimo na faixa neutra a alcalina. A temperatura ótima de atividade pode variar de 30 a 80 °C (GUPTA & RAMNANI, 2006), com algumas exceções que chegam a 90 e 100 °C para queratinases de *Chrysosporium keratinophilum* e *Fervidobacterium islandicum* AW-1, respectivamente (DOZIE *et al.*, 1994; NAM *et al.*, 2002). As massas moleculares das queratinases já descritas variam de 18 a mais de 200 kDa, sendo que as de maiores massas moleculares são geralmente associadas a organismos termófilos ou caracterizadas como metaloproteases (BRANDELLI *et al.*, 2010).

### 1.2.3. Mecanismos de degradação da queratina

A hipótese mais aceita para um mecanismo de degradação da queratina envolve dois estágios: sulfitólise e proteólise. A sulfitólise é um pré-requisito para a degradação da queratina (GUPTA *et al.*, 2012), promovendo a quebra das pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas e levando à desnaturação da estrutura da proteína, facilitando assim o ataque de proteases queratinolíticas (KORNILŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011). Acredita-se que a sulfitólise necessite da presença de células vivas, de agentes redutores (sulfito de sódio, DTT, mercaptoetanol, entre outros) ou de dissulfeto redutases (GUPTA & RAMNANI, 2006). Entretanto, mesmo na presença de agentes redutores, somente as queratinases podem promover uma degradação completa da queratina. Esse resultado não é obtido por outras proteases devido à presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na superfície da queratina, que necessitam ser clivados por uma queratinase. A partir daí, a queratina torna-se mais suscetível à degradação por outras proteases não queratinolíticas (GUPTA *et al.*, 2012) (Figura 4).

A maioria das queratinases purificadas não é capaz de degradar queratina na sua forma nativa, já que, durante o processo de purificação, elementos responsáveis pela redução das pontes dissulfeto são provavelmente removidos (BRANDELLI *et al.*, 2010). Entretanto, PRAKASH *et al.* (2010b) relataram uma queratinase produzida pelo *Bacillus halodurans* PPKS-2 com ambas as atividades: queratinolítica e de dissulfeto redutase.



**Figura 4:** Representação esquemática da degradação da queratina por queratinases e proteases convencionais (Adaptado de GUPTA *et al.*, 2012)

#### 1.2.4. Aplicações

Devido a sua capacidade de degradar substratos de queratina, as queratinases possuem promissoras aplicações em setores ambientais e biotecnológicos, destacando-se a degradação de resíduos recalcitrantes no ambiente, como penas e pelos. Além da possibilidade de utilização de queratinases na bioconversão de resíduos de queratina em rações, fertilizantes e filmes (BRANDELLI *et al.*, 2010), as indústrias de couro, detergentes e têxtil também buscam nas queratinases a substituição ao uso de proteases comuns para maior eficiência em seus processos, como a depilação do couro e processamento da lã (GUPTA *et al.*, 2012). Também tem crescido o interesse na aplicação de hidrolisados enzimáticos de queratina em cosméticos e na indústria farmacêutica (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011).

Nos últimos anos, muitas pesquisas relacionadas à diversidade de microorganismos queratinolíticos têm sido conduzidas com o intuito de buscar potenciais produtores de queratinases. Entretanto, poucos produtos comerciais queratinolíticos estão disponíveis no mercado: Versazyme®, Valkerase®, Prionzyme™ e PURE100. Todos são baseados na mesma queratinase, a KerA, do *Bacillus licheniformis* PWD-1, descrita pela primeira vez em 1990, e desde então, extensivamente caracterizada e expressa em microorganismos heterólogos. Versazyme® e Valkerase® (BioResource International, Inc) são destinadas à alimentação de aves de corte, prometendo redução de custos com melhor aproveitamento nutricional. Prionzyme™ (Genencor) foi lançada para remoção do príon na desinfecção de instrumentos cirúrgicos médicos e dentários. PURE100 (Zurko bioresearch/Proteos biotech), por sua vez, propõe aplicações biomédicas, farmacêuticas e cosméticas, como na eliminação de calos, depilação, tratamento de cicatrizes, entre outros (GUPTA *et al.*, 2012)

### 1.3. BACTÉRIAS TERMÓFILAS E PROTEASES TERMOESTÁVEIS

Proteases são produzidas por plantas, animais e diferentes cepas de bactérias, fungos e leveduras, desempenhando importantes papéis fisiológicos nesses organismos. As bactérias são uma excelente fonte de proteases, sendo as bactérias termófilas de especial interesse devido às características de termoestabilidade das proteases produzidas e à segurança de sua utilização. Essas bactérias são classificadas em termófilas moderadas, extremas e hipertermófilas, com temperaturas ótimas de crescimento que variam de 50-60 °C, 60-80 °C e acima de 80 °C, respectivamente (SYNOWIECKI, 2010).

Enzimas produzidas por micro-organismos termófilos são termoestáveis, apresentando máxima atividade em temperaturas acima de 60 °C, e apenas sofrendo desnaturação irreversível em altas temperaturas. Não apenas a termoestabilidade, mas também a maior estabilidade dessas enzimas frente a condições extremas, como pHs altos e baixos, baixas concentrações de água, solventes orgânicos, e agentes desnaturantes, tornam-nas úteis a diversas aplicações (BRUINS *et al.*, 2001). Além da indústria de detergentes, as indústrias têxtil, panificadora, alimentícia, coureira e de celulose também fazem uso destas enzimas (FUJIWARA, 2002).

Outro importante aspecto relativo aos termófilos diz respeito à segurança de sua utilização. Micro-organismos proteolíticos são frequentemente associados à patogenicidade em humanos e outros animais. Entretanto, não há relatos de patogenicidade de termófilos obrigatórios em faixas de temperatura mesofílicas, o que representa uma vantagem à sua utilização em relação aos mesófilos (SUZUKI *et al.*, 2006). Ainda, a utilização de altas temperaturas reduz o risco de contaminação, visto que temperaturas superiores a 70 °C são capazes de eliminar a maioria das bactérias patogênicas e reduzir significativamente o número de bactérias associadas a contaminações em processamento de alimentos. Outras vantagens do uso de termoenzimas estão relacionadas à redução da viscosidade dos fluídos em altas temperaturas (permitindo a redução dos níveis de água utilizados) e à possibilidade de utilização de maior concentração de substrato (já que a solubilidade é aumentada), levando a um maior rendimento do produto (BRUINS *et al.*, 2001). Por outro lado, a utilização de micro-organismos hipertermófilos possui desvantagens em relação aos termófilos moderados, já que a temperatura necessária para seu crescimento induz o aumento da formação de subprodutos e degradação de aminoácidos termolábeis, além de demandar maior gasto energético. (SYNOWIECKI, 2010).



A termoestabilidade de uma enzima está diretamente relacionada ao seu dobramento. A conformação da enzima nativa é mantida por ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, pontes salinas, interações hidrofóbicas e força de van der Waals, interações que são rompidas com o aumento da temperatura. A temperatura que favorece o desdobramento da proteína também aumenta a propensão à hidrólise de determinadas ligações peptídicas, perda de cofator essencial, e rompimento de pontes dissulfeto. As enzimas termoestáveis possuem um balanço otimizado entre a rigidez (necessária para a estabilidade) e a flexibilidade (necessária para a atividade). Contribuem para a rigidez fatores relacionados às estruturas primária e secundária, sendo que a presença de núcleos extremamente hidrofóbicos é um dos principais mecanismos da termoestabilidade, dificultando o desdobramento das enzimas. A composição de aminoácidos da estrutura primária também interfere na termoestabilidade, influenciando na estabilidade da hélice, formação de pontes de sais, interações não covalentes, desamidação, e pontes dissulfeto. Outras características que podem estar relacionadas à termoestabilidade são: maior conteúdo de  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, pontes de hidrogênio fortes, pareamento de íons, estabilização do C e N terminais e ancoramento de “loops”, e estabilização por ligação com metal (GOMES *et al.*, 2007).

Diversas bactérias termófilas produtoras de proteases com diferentes características foram descritas nos últimos anos. Atualmente, algumas dessas enzimas são utilizadas industrialmente. Esse é o caso da termolisina, uma metaloprotease extracelular isolada em 1962 de cultura de *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko (MATSUBARA *et al.*, 1965). A termolisina é comercialmente disponível em escala industrial como Thermoase PC10F (Amano Enzyme), com aplicações na depilação de couro, extratos de carne e síntese de aspartame (AMANO ENZYME). Algumas queratinases termoestáveis produzidas por

bactérias termófilas também foram caracterizadas, como a produzida pelo *Bacillus halodurans* JB99 que possui atividade máxima a 70 °C (SHRINIVAS & NAIK, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

Objetivo geral:

O objetivo desse trabalho foi isolar uma queratinase com propriedades termoestáveis, produzida por bactéria termófila, e caracterizá-la.

Objetivos específicos:

- Isolamento e identificação de bactérias termófilas produtoras de queratinase, provenientes de amostra de solo da Caatinga;
- Formulação de meio de cultura e estudo de parâmetros para a produção da enzima pela bactéria selecionada;
- Fracionamento do sobrenadante de cultura e caracterização de queratinases de interesse.

**3. CAPÍTULO I: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO  
DE UMA QUERATINASE TERMOATIVA PRODUZIDA POR *Anoxybacillus* sp.  
PC2 ISOLADO DA REGIÃO SEMIÁRIDA BRASILEIRA (CAATINGA)**

**Production, partial purification and characterization of a thermoactive keratinase  
produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 isolated from Brazilian semiarid region  
(Caatinga)**

Sharon Vieira dos Reis, Adriana Seixas, Carlos Termignoni, Alexandre José Macedo

Este capítulo é apresentado na forma de manuscrito que será submetido à revista  
Bioresource Technology.

**Production, partial purification and characterization of a thermoactive keratinase  
produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 isolated from Brazilian semiarid region  
(Caatinga)**

Sharon Vieira dos Reis<sup>a</sup>, Adriana Seixas<sup>a,b</sup>, Carlos Termignoni<sup>a,c</sup>, Alexandre José  
Macedo<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>d</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

\* Corresponding author.

## ABSTRACT

The aims of this study were to select and identify thermophilic bacteria from Caatinga biome (Brazil) capable to produce thermoactive keratinases, and characterize the keratinase produced by the selected isolate. Eight proteolytic bacteria were isolated from a soil sample. 16S rRNA gene sequence analysis places them into *Anoxybacillus*, *Geobacillus* and *Brevibacillus* species. Of these, three isolates produced high levels of keratinolytic protease using feather as the only source of carbon, nitrogen and sulfur. *Anoxybacillus* sp. PC2 showed better keratinase activity in a medium composed of 2% feather waste, 0.04%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 0.05% NaCl at pH 6.5 incubated at 60 °C. The partially purified protease was active in a pH range of 5.0-10.0 with high activity in temperature range of 50-80 °C. The optimum activity was observed at pH 7.0 and 50-60 °C. These characteristics are potentially useful for biotechnological processes for bioconversion of keratin.

### 3.1. INTRODUCTION

Thermostable proteases are stable and active at temperatures above 60-70 °C, features that make them suitable for applications under high temperature condition, such as in food processing, detergents, biotechnological applications among others (SYNOWIECKI, 2010). Keratinases are proteases of special interest due to their action on keratin substrates, being the only group of proteases which can completely degrade these proteins (GUPTA *et al.*, 2012). Several keratinases have been isolated from a range of microorganisms, including the three domains: Bacteria, Archaea and Eukarya, and some of them are active at high temperatures (BRANDELLI *et al.*, 2010).

Keratin is the major component of feathers, making up more than 90% of their total weight (MATSUI *et al.*, 2009). This highly specialized fibrous protein has mechanical and protective functions (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011). The feathers, in turn, are generated in large quantities over the world as a by-product of poultry industry. Although the poultry feathers are a promising source of amino acids, they are not degradable by common proteolytic enzymes, such as pepsin, papain and trypsin. Keratin's elevated resistance is due to the high degree of crosslinking of the polypeptide chain caused by formation of disulfide bounds between the cysteine residues (ONIFADE *et al.*, 1998). A current way to discard feathers produced by the poultry industry is by incineration, a disadvantageous method in terms of energy loss and production of large amounts of carbon dioxide (SUZUKI *et al.*, 2006). A certain amount of feathers are converted to feather meal to be used as animal feedstuff. This process requires high pressure and temperature (and substantial amounts of energy), inducing a loss of essential amino acids, such as methionine, lysine and tryptophan, and the formation of new

undesirable amino acids such as lanthionine (PAPADOPOULOS, 1989; MATSUI *et al.*, 2009).

Therefore, the development of alternative methods for bioconversion of keratin residues is being sought to obtain a product of higher nutritional value and lower cost. In this context, several microorganisms and their keratinases are used as a valuable and environmentally friendly approach to convert keratin into protein hydrolysates (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA & BOHACZ, 2011). Thermophilic microorganisms are promising sources of thermoactive enzymes, which are suitable for applications under high temperature conditions, accelerating the degradation process and reducing the incidence of contamination from mesophilic organisms (CHEN *et al.*, 2004).

The present work describes the isolation and identification of thermophilic bacteria from Caatinga biome, capable to produce thermoactive keratinases. Caatinga is a semiarid region of Northwest of Brazil characterized by high temperatures and scarce rainfall, which are usually adverse conditions for microbial growth in the soil. In semiarid environments with limited nutrients availability, the production of hydrolytic enzymes, such as proteases, may contribute to growth and survival of microorganisms, including thermophilic and thermotolerant bacteria (GORLACH-LIRA & COUTINHO, 2007). A thermoactive keratinase produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 was partially purified and preliminarily characterized. Purification of keratinolytic proteases is important to provide a better understanding upon their properties and allow their optimal utilization in diverse biotechnological processes such as bioprocessing of keratinous wastes.



## 3.2. MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1. Isolation and screening of microorganisms

The bacterial strains were isolated from a soil sample from Caatinga biome (Brazil). Five grams of soil were inoculated into an enrichment culture medium containing 50 mL of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 4 chicken feathers, and incubated at 60 °C for 28 days. An aliquot of the culture was spread on skim milk agar plates for further screening of protease producing strain and incubated at 60 °C overnight. The isolates that formed clear zones around the colonies were subjected to a second screening in a basal feather medium containing 2% chicken feathers,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.04%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2% and NaCl 0.05%. Those were incubated at 60 °C at 140 rpm in order to select keratinolytic microorganisms based on their capability to degrade feathers. After 96 h the media were filtered through filter paper under reduced pressure and the filter papers containing the remaining residue were dried for 24 h at 60 °C. Feather degradation percentage was determined by comparison of the feathers weight before inoculation with the weight of the remaining residue.

### 3.2.2. Identification of keratinolytic bacteria

The keratinolytic strains were characterized by 16S rRNA gene sequencing. The 16S rRNA gene was amplified from purified genomic DNA by polymerase chain reaction using the universal primers 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). The PCR amplification was performed with 50

ng of extracted DNA in a 50- $\mu$ l reaction mixture containing a 0.2  $\mu$ M concentration of each primer, a 0.2 mM concentration of each dNTP, 5  $\mu$ l of 10X PCR Buffer (Invitrogen), 1.25 U of Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 1.5  $\mu$ l of a 50 mM solution of MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen). Amplification was carried out under the following conditions: an initial 5-min denaturation step at 95°C followed by 40 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing for 30 seconds at 55°C, and extension at 72°C for 2 min. Amplification was completed by incubation for 5 min at 72°C to allow complete extension of the PCR products. The PCR products were purified with an AxyPrep PCR Clean-up kit (Axygen Biosciences), according to the manufacturer's instructions, and sequenced using the ABI PRISM™ 3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems). The obtained sequences were compared with other sequences from data bank accessible in the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST tool.

### **3.2.3. Culture Medium Selection**

The medium selection tests were performed using a basal medium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.04%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2% and NaCl 0.05%, pH 7.5) supplemented with 2% feathers or soybean meal, and 0.1% soybean meal, cellulose, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> or MgSO<sub>4</sub>. The selected strain was inoculated to 50 mL of medium and incubated at 60 °C at 140 rpm for 48 h.

#### **3.2.4. Production of keratinase and cell-free supernatant preparation**

The keratinolytic protease-producing *Anoxybacillus* sp. PC2 was grown in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of basal medium supplemented with 2% chicken feathers (pH 6.5), inoculated with 24-h old culture and incubated at 60 °C in orbital shaker at 140 rpm for 24 h. After incubation, the medium was filtered through filter paper under reduced pressure and centrifuged at 10 000 g for 30 min. Finally, the supernatant was filtered through 0.2 µm filter and used in purification and enzymatic assays.

#### **3.2.5. Enzymatic assay**

Keratinolytic activity was assayed with azokeratin (produced according to TOMARELLI *et al.*, (1949)) as substrate. Unless otherwise specified, the reaction mixture containing 100 µL of sample and 500 µL of 1.5% (w/v) suspension of azokeratin in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) was incubated at 60 °C for 15 min. The reaction was stopped by adding 500 µL of 30% (v/v) trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation (11 000 g, 10 min), keratinolytic activity was determined spectrophotometrically at 440 nm. The controls were run in the same manner, except that the sample was added after the addition of TCA. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the activity required to increase 0.1 absorbance unit in 1 hour under the above conditions.

### **3.2.6. Protein determination**

Protein concentration was determined by Bicinchoninic Acid (BCA) method (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions, using bovine serum albumin as standard.

### **3.2.7. Partial purification of keratinase**

The purification steps were carried out at room temperature. The cell-free supernatant was concentrated 50-fold using Amicon Ultra-15 10,000 NMWL centrifugal filter device (Millipore) and applied onto a Q Sepharose HP 5 mL (GE Healthcare) column previously equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and processed at a flow rate of 5 mL/min. The adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of 0-1 M NaCl in the same buffer. The fractions (1 mL each) with keratinase activity were pooled and used for further enzymatic characterization.

### **3.2.8. SDS-PAGE analysis**

The purification steps were evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to LAEMMLI (1970). Either 35 µg of protein from cell-free supernatant concentrated by ultrafiltration, or 25 µg of protein from pooled fractions obtained from Q Sepharose chromatography step were mixed with reducing sample buffer and analyzed on 10% (w/v) polyacrylamide resolving gel with 3% polyacrylamide stacking gel at 120 V. The gel was stained with 1% Coomassie Brilliant

Blue G-250 dissolved in methanol/acetic acid/water (5:1:14) and destained with several changes of warm distilled water.

### **3.2.9. Influence of temperature and pH on enzyme activity**

The optimal temperature and pH were determined for the cell-free supernatant and the pooled active fractions from Q Sepharose column. Enzymatic assays were carried out for 15 minutes at different temperatures (30-80 °C) and pH range using 50 mM acetate buffer (pH 5.0), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) and 50 mM Borax-NaOH buffer (pH 10.0).

### **3.2.10. Influence of temperature on enzyme stability**

To investigate thermostability, the cell-free supernatant and the pooled active fractions from Q Sepharose column were pre-incubated for 60 min at 70 and 80 °C and the residual activity was measured.

## **3.3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.3.1. Selection and identification of keratinolytic bacteria**

Protease-producing thermophilic bacteria were isolated on skim milk agar plates incubated at 60 °C. Clear zones around the colonies indicate casein hydrolysis, and eight

bacterial strains were selected by their capability to produce proteolytic enzymes. GORLACH-LIRA & COUTINHO (2007) also reported culturable thermophilic bacteria in soil of Caatinga, all of them capable to produce extracellular proteases.

Sequences analyses of 16S rRNA gene indicated that four out of the eight isolated strains were 98% similar to *Geobacillus tepidamans*. Coorevits *et al.* (2012) proposed to transfer this species to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov., thus, those four isolates belong to *Anoxybacillus* cluster. Three isolates showed 98-99% sequence similarity with *Geobacillus thermoglucosidans* nom. corrig. (correction proposed by Coorevits *et al.* (2012)), and the remaining strain shared 99% similarity with *Brevibacillus thermoruber*.

### **3.3.2. Chicken feathers degradation and production of keratinases**

The eight isolated bacteria were transferred to basal feather medium using feathers as the sole source of carbon, nitrogen and sulfur. All tested bacteria grew well and degraded chicken feathers, indicating production of keratinases that are secreted in the extracellular medium (data not shown). Keratinolytic activity of the three isolates that showed better ability to degrade feathers was assayed and feather degradation percentage was determined (Table 1). These isolates were capable to degrade barbs, but not the rachis in 96 hours of incubation. All three isolates belong to the *Anoxybacillus* genus, which is widely found in hot springs and dairy industry. Several enzymes, such as xylanase and  $\alpha$ -amylase, were reported to be produced by this genus (GOH *et al.*, 2013). However, there are no reports of feather degradation or keratinolytic enzyme produced by any *Anoxybacillus* strains. Of the isolates showed in Table 1, *Anoxybacillus* sp. PC2 exhibited

the highest keratinolytic activity and feather degradation rate, and was therefore subjected to medium optimization tests to improve enzyme production (Fig. 1).

**Table 1**

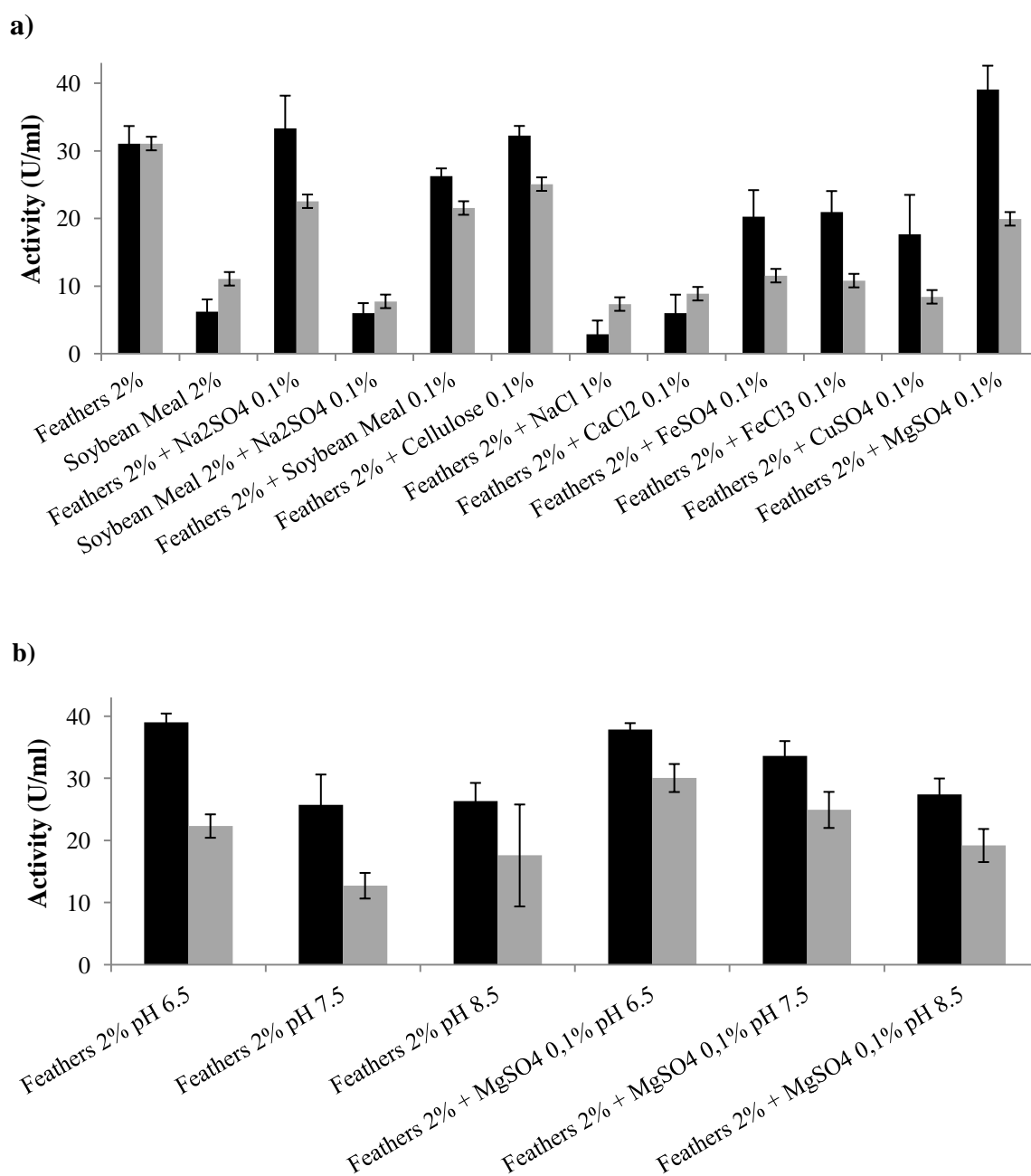
Feather degradation and keratinolytic activity of three bacteria strains isolated from Caatinga soils (Brazil)

Isolates	Keratinolytic Activity <sup>a</sup> (U/ml)				Feather degradation <sup>b</sup> (%)
	0 h	24 h	48 h	72 h	
<i>Anoxybacillus</i> sp. PC2	2.7 ± 1.8	36.8 ± 9.2	38.7 ± 0.9	28.3 ± 11.5	23.1 ± 2.1
<i>Anoxybacillus</i> sp. PC6	6.4 ± 0.2	25.2 ± 6.2	12.5 ± 3.7	14.1 ± 4.9	22.3 ± 3.2
<i>Anoxybacillus</i> sp. PC8	2.1 ± 2.7	23.1 ± 0.5	11.1 ± 1.6	14.6 ± 2.2	21.1 ± 2.0

<sup>a</sup> Keratinolytic activity values are averages of triplicate determinations.

<sup>b</sup> Values are averages of two biological replicates.

A basal medium containing monopotassium phosphate, dipotassium phosphate and sodium chloride was supplemented with chicken feathers or soybean meal. Several additives, such as sodium sulfate, cellulose, calcium chloride, ferrous sulfate, ferric chloride, cupric sulfate and magnesium sulfate, were screened for improvement of keratinase production (Fig. 1a). The flasks containing the media were incubated at 60 °C, and keratinase activity was assayed at 24 and 48 h incubation. The higher levels of enzyme production were observed in the basal media containing only chicken feathers and feathers supplemented with the additives sodium sulfate, cellulose and magnesium sulfate. For most of tested media, the highest enzymatic activity occurred at 24 hours incubation. The effect of initial pH (6.5, 7.5 and 8.5) on enzyme production by *Anoxybacillus* sp. PC2 was tested using the basal medium supplemented with feathers and the medium containing magnesium sulfate (Fig. 1b).



**Fig. 1.** Effect of different culture media and pH on keratinase production by *Anoxybacillus* sp. PC2. **(a)** Basal medium supplemented with chicken feathers, soybean meal and additives. **(b)** pH effect on enzyme production (pH 6.5, 7.5 and 8.5). *Black bars* represent enzymatic activity at 24 h incubation and *grey bars* at 48 h incubation. Each value represents an average of triplicate determination and standard errors are reported.

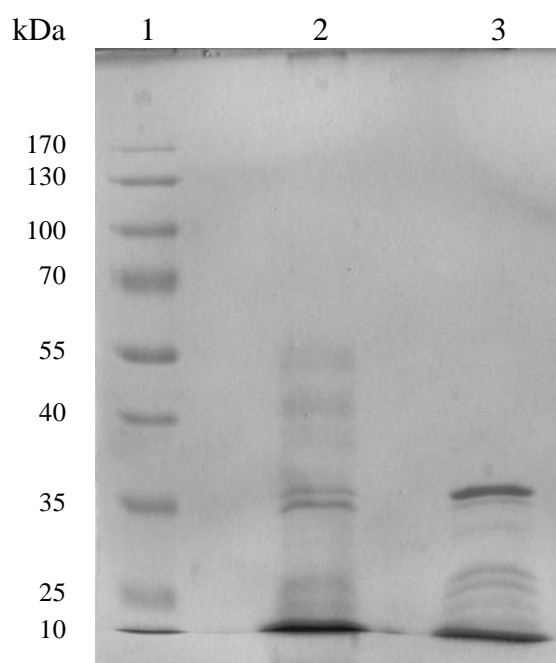


The maximum production of keratinase was obtained at pH 6.5 in both culture media, as demonstrated by azokeratin assay. Feather is an inexpensive substrate for keratinase production, and its degradation by microorganisms may increase its use as a supplement in feedstuff. The temperature of 60 °C used for growth and enzyme production makes it suitable for sustainable biotechnological purposes, such as conversion of poultry feathers into more digestible amino acids. These hard-to-degrade animal proteins tend to be more malleable and more susceptible to protease degradation at high temperatures (SUZUKI *et al.*, 2006). In this context, moderately thermophiles require less energy for growth than extremely thermophilic bacteria.

### **3.3.3. Partial enzyme purification**

The keratinase produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 was partially purified in order to characterize the enzyme and prospect its industrial applications. Partial purification was performed by concentration in a centrifugal filter device (10,000 NMWL) and Q Sepharose anion-exchange chromatography. In anion-exchange chromatography step, the keratinolytic activity was detected in the unbound fractions. SDS-PAGE analysis revealed a major protein band and several minor bands (Fig. 2). Molecular mass of the major band was estimated by comparison with molecular weight standards. The apparent molecular mass was 35.1 kDa, which is similar to the keratinase produced by the thermotolerant *Bacillus licheniformis* FK 14 (35 kDa) (SUNTORNUSUK *et al.*, 2005). Molecular masses of described keratinases range from 18 to more than 200 kDa, but most of them have less than 50 kDa (BRANDELLI *et al.*, 2010). The partially purified enzyme showed a specific

activity of 480.4 U.mg<sup>-1</sup> in azokeratin. The keratinolytic enzyme was purified 16.6-fold over the cell-free supernatant and was recovered in 20.8% yield (Table 2).



**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of purification steps. *Lane-1*: molecular mass markers (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 170 kDa, Fermentas); *Lane-2*: cell-free supernatant concentrated by ultrafiltration (load: 35 µg of protein); *Lane-3*: Q-Sepharose chromatography (load: 25 µg of protein).

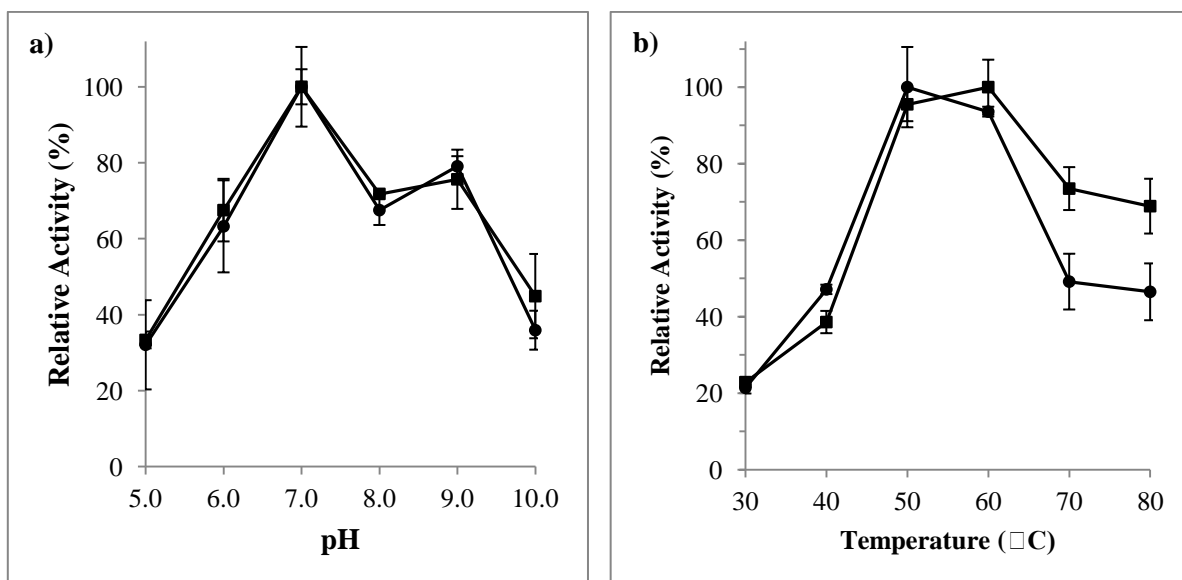
**Table 2**  
Partial purification of keratinase produced by *Anoxybacillus* sp. PC2

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U.mg <sup>-1</sup> )	Purification (fold)	Yield (%)
Cell-free supernatant	72	2080	28.9	1	100
Ultrafiltration	5	640	128	4.4	30.8
Q-Sepharose	0.9	432.4	480.4	16.6	20.8

#### **3.3.4. Effect of pH and temperature on keratinase activity and stability**

To evaluate the effect of pH on enzyme activity, assays were conducted at 50 °C. Both cell-free supernatant and the partially purified enzyme from anion-exchange chromatography step were active between pH range of 5.0-10.0, showing higher keratinolytic activity at pH 7.0 (Fig. 3a). These results indicate that the keratinase produced by *Anoxybacillus* sp. PC2 is a neutral protease. As reported, most keratinases have optimum pH ranging from neutral to alkaline (GUPTA & RAMNANI, 2006; BRANDELLI *et al.*, 2010).

The effect of temperature on enzyme activity from 30 to 80 °C was assayed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). As shown in Fig. 3b, the maximum activity observed was at 50-60 °C for cell-free supernatant and for partially purified enzyme. The partially purified enzyme showed high activity in the range of 50-80 °C, and maintained around 70% of its maximum activity at 80 °C. However, the cell-free supernatant didn't exhibit the same profile, and more than 50% of its keratinolytic activity was lost at 70 and 80 °C.



**Fig. 3.** Effect of pH (a) and temperature (b) on enzymatic activity of cell-free supernatant (●) and partially purified enzyme from anion-exchange chromatography (■). Values are averages of triplicate determinations.

The partially purified enzyme was active at high temperatures, keeping 20% of its maximum activity when incubated at 70 °C for 1 hour, and 15% when incubated at 80 °C for the same period (data not shown). Differently, the cell-free supernatant maintained more than 70% of its activity at 70 °C and 20% at 80 °C in the same conditions. The similarity between the cell-free supernatant and the partially purified keratinase regarding optimum pH and temperature range suggests that this keratinase is responsible for the main keratinolytic activity in the culture supernatant. The differences concerning stability may be due the presence of ions or the substrate in the supernatant, protecting the enzyme active site.

## CONCLUSIONS

This is the first report of a keratinolytic protease produced by an isolate of *Anoxybacillus* genus. Chicken feathers are a by-product of poultry industry and were demonstrated to be a suitable source of carbon and nitrogen for *Anoxybacillus* sp. PC2 growth and keratinase production. This work demonstrated that this bacterium and its enzyme have potentially useful characteristics for industrial and biotechnological applications, such as keratin hydrolysis and feedstuffs nutrient improvement. The thermostability of this keratinase could be enhanced in future works by site-directed mutagenesis or determination of the appropriate metal ion concentration for enzyme stabilization.

## REFERENCES

1. BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. & RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 1735-1750, 2010.
2. BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M. & BOOM, R. M. Thermozyms and their applications: A review of recent literature and patents. *Appl Biochem Biotech*, 90: 155-186, 2001.
3. CHEN, X.; STABNIKOVA, O.; TAY, J.; WANG, J. & TAY, S. T. Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. *Extremophiles*, 8: 489-498, 2004.

4. COOREVITS, A.; DINSDALE, A. E.; HALKET, G.; LEBBE, L.; DE VOS, P.; VAN LANDSCHOOT, A. & LOGAN N. A. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(7): 1470-1485, 2012.
5. GOH, K. M.; KAHAR, U. M.; CHAI, Y. Y.; CHONG, C. S.; CHAI, K. P.; RANJANI, V.; ILLIAS, R. M. & CHAN, K. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97: 1475-1488, 2013.
6. GORLACH-LIRA, K. & COUTINHO, H. D. M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. *Braz J Microbiol*, 38(1): 135-141, 2007
7. GUPTA, R. & RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 21-33, 2006.
8. GUPTA, R.; SHARMA, R. & BEG, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 33: 216-228, 2012.
9. KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T. & BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage*, 31: 1689-1701, 2011.
10. LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.

11. MATSUI, T.; YAMADA, Y.; MITSUYA, H.; SHIGERI, Y.; YOSHIDA, Y.; SAITO Y.; MATSUI, H. & WATANABE, K. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Meiothermus ruber* H328. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82: 941-950, 2009.
12. 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. *Bioresour Technol*, 66: 1-11, 1998.
13. PAPADOPOULOS, M. C. Effect of processing on high-protein feedstuffs: a review. *Biol Waste*, 29: 123-138, 1989.
14. SUNTORNSUK, W.; TONGJUN, J.; ONNIM, P.; OYAMA, H.; RATANAKANOKCHAI, K.; KUSAMRAN, T. & ODA, K. Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. *World J Microbiol Biotechnol*, 21:1111–1117, 2005.
15. SUZUKY, Y.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUI, H. & WATANABE, K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng*, 102: 73-81, 2006.
16. SYNOWIECKI, J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr J Biotechnol*, 9(42): 7020-7025, 2010.
17. TOMARELLI, R. M.; CHAMEY, J. & HARDING, M. L. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic tryptic activity. *J Lab Clin Med*, 34: 428-433, 1949.

## **4. CAPÍTULO II: ESTUDOS VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA QUERATINASE PRODUZIDA POR *Anoxybacillus* sp. PC2**

Este capítulo descreve ensaios moleculares e estudos de atividade enzimática em zimograma realizados com o objetivo de identificar a queratinase produzida pelo isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 caracterizada no Capítulo I. Todos os ensaios descritos foram realizados com amostras do sobrenadante obtido pelo cultivo do isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 em meio composto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,04%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%) e  $\text{NaCl}$  (0,05%) suplementado com 2% de penas de frango e incubado por 24 h a 140 rpm.

### **4.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1.1. SDS-PAGE e zimograma**

As enzimas proteolíticas produzidas pelo *Anoxybacillus* sp PC2 foram avaliadas em SDS-PAGE e zimograma. A análise em SDS-PAGE foi feita conforme descrito no Capítulo I, subitem 3.2.8. A análise em zimograma foi feita utilizando-se dois diferentes métodos. O primeiro foi conduzido conforme descrito por MAZOTTO *et al.* (2011). O gel de poliacrilamida (10%) foi copolimerizado com caseína. Foi utilizado tampão de amostra não desnaturante (sem  $\beta$ -mercaptoetanol) e as amostras não foram fervidas. Após eletroforese a 120 V, o gel foi suavemente agitado por 1 h em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) contendo 2,5% de Triton X-100 (vol/vol) para remover o SDS. O Triton X-100 foi removido com tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) também em agitação por



20 min. A seguir o gel foi incubado em tampão fosfato de sódio por 45 min a 50 °C. Finalmente, o gel foi corado com Coomassie Azul brilhante G-250 e descorado com água destilada. A atividade proteolítica é evidenciada por bandas claras em um fundo escuro.

O segundo método foi conduzido conforme descrito por BRESSOLLIER *et al.* (1999), com algumas modificações. A eletroforese foi feita nas mesmas condições descritas acima, entretanto sem a copolimerização de caseína no gel de poliacrilamida. Após a remoção do Triton X-100, o gel foi incubado em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) contendo 2% de caseína por 45 min a 50 °C. A seguir, o gel foi corado com Coomassie Azul brilhante G-250 e descorado com água destilada.

#### **4.1.2. Espectrometria de massas**

O sobrenadante de cultivo livre de células (200 µg de proteínas) foi submetido a eletroforese em SDS-PAGE 12% e corado com azul de Coomassie. A banda de interesse foi excisada e submetida a digestão com tripsina, conforme descrito por SCHEVECHENKO *et al.* (1996). Os peptídeos resultantes foram analisados por espectrofotômetro de massa ESI Q-TOF Micro™ (Waters) acoplado a um sistema de cromatografia líquida capilar (nanoACQUITY UPLC, Waters). O espectro MS/MS foi comparado com o banco de dados não redundante do NCBI e analisado pelo MASCOT server (Matrix Science), utilizando os seguintes parâmetros: digestão trípica, perda de 1 clivagem e tolerância de massa de 0,2 Da para íons MS/MS. A carbamidometilação de cisteína foi estabelecida como modificação fixa, e a oxidação de metionina como modificação variável.

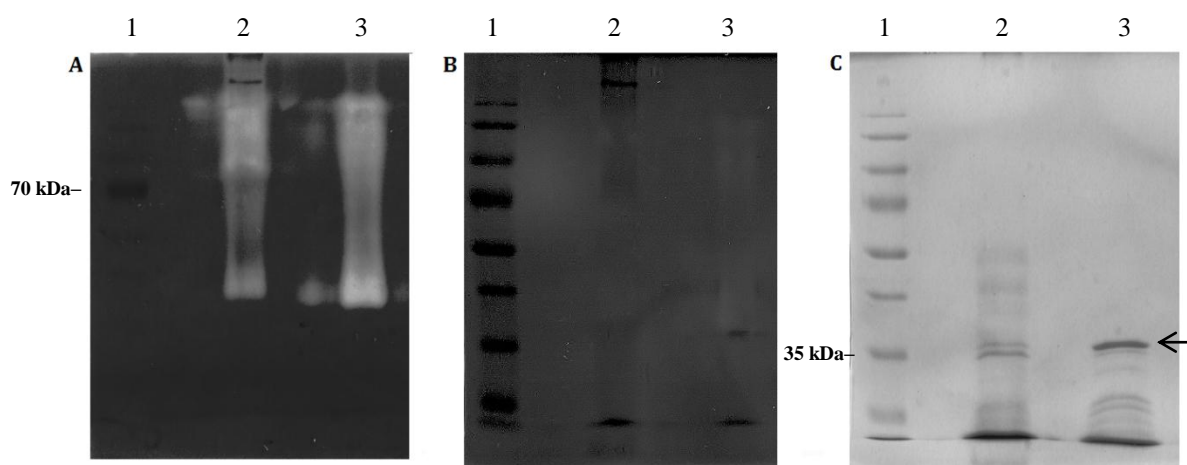
#### 4.1.3. Amplificação, sequenciamento e identificação do gene selecionado

Os peptídeos identificados pelo MASCOT foram comparados ao banco de dados do NCBI em busca restrita ao gênero *Geobacillus* utilizando a ferramenta BLAST. A sequência de nucleotídeos correspondente à proteína selecionada também foi encontrada nesse banco de dados.

Os primers específicos para o gene selecionado, que incluiu a sequência de nucleotídeos correspondente ao pré-pro-peptídeo, foram construídos manualmente. A reação de PCR foi realizada utilizando-se as concentrações 0,2 µM de cada primer (5'-ATG AAA AGG AAA ATG AAA ATG AAA TTA GTA CG-3' e 5'-TTA TTT CAC CCC TAC CGC ATC AAA G-3'), PCR Buffer (1X), 0,1 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 50 ng de DNA genômico purificado, e água Milli-Q estéril para um volume final de 50 µL. As condições utilizadas foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1,5 minutos; e extensão final a 72 °C por 5 minutos. O produto do PCR foi purificado utilizando o kit AxyPrep PCR Clean-up (Axygen Biosciences) e submetido a sequenciamento em sequenciador automático ABI PRISM<sup>™</sup> 3130xl (Applied Biosystems). A sequência obtida foi novamente comparada ao banco de dados do NCBI.

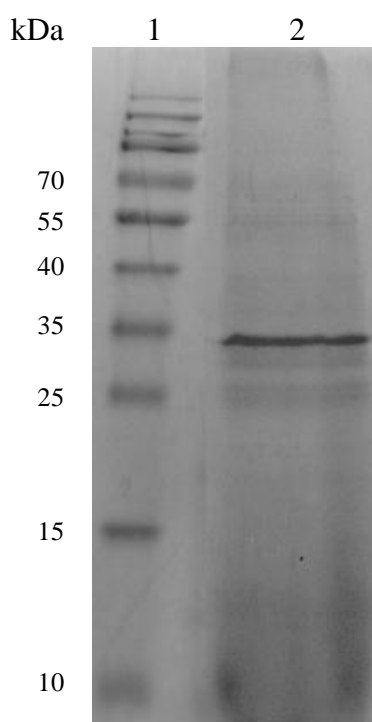
## 4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade proteolítica no sobrenadante de cultivo, foram realizados zimogramas com os produtos das etapas de purificação descritas no Capítulo I, subitem 3.2.7.: ultrafiltrado e “pool” de frações ativas da coluna de troca iônica. As duas metodologias utilizadas mostram atividade proteolítica em ambas as frações analisadas (Figuras 5A e 5B). Entretanto, o zimograma não apresentou um padrão de bandas, mesmo após a segunda etapa de purificação, devido ao arraste, principalmente no gel contendo caseína copolimerizada (Figura 5A). Ainda assim, existe a possibilidade de uma correspondência entre a banda majoritária de aproximadamente 35 kDa observada em SDS-PAGE (Figura 5C) com a atividade proteolítica observada nos zimogramas.



**Figura 5:** Zimograma dos produtos das etapas da purificação do sobrenadante de cultivo de *Anoxybacillus* sp. PC2. **A:** Zimograma em gel de poliacrilamida com caseína copolimerizada; **B:** Zimograma em gel de poliacrilamida incubado posteriormente em caseína; **C:** SDS-PAGE. Colunas: **1-** Marcador de massa molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 170 kDa, Fermentas); **2-** ultrafiltrado (35 µg de proteínas); **3-** “pool” de frações ativas da coluna de troca iônica (25 µg de proteínas).

Uma banda majoritária de aproximadamente 35 kDa foi também observada no sobrenadante de cultivo submetido ao SDS-PAGE 12% (Figura 6). Como as penas de aves eram a única fonte de carbono e nitrogênio no meio de cultura, acredita-se que possa haver uma expressão preferencial da protease queratinolítica, necessária para a nutrição bacteriana nessas condições. A análise dessa banda por espectrometria de massas resultou na identificação de oito peptídeos pertencentes à sequência de aminoácidos da termolisina, metaloprotease neutra termoestável produzida por *Bacillus thermoproteolyticus* (Figura 7). As metaloproteases são uma classe de hidrolases caracterizadas pela presença de uma molécula de zinco no sítio catalítico. A família de metaloproteases M4, à qual pertence a termolisina, contém diversas metaloproteases extracelulares produzidas por bacilos Gram positivos (MANSFELD, 2007).



**Figura 6:** SDS-PAGE do sobrenadante de cultivo de *Anoxybacillus* sp. PC2 em meio de cultura contendo penas,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NaCl}$ . Colunas: **1-** Marcador de massa molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 – 170 kDa, Fermentas); **2-** sobrenadante de cultivo.

1	<b>ITGTSTVGVG</b>	RGVLGDQKNI	<b>NTTYSTYYL</b>	QDNTRGDGIF	TYDAKYRTTL
51	PGSLWADADN	QFFASYDAPA	VDAHYYAGVT	YDYYKNVHNR	<b>LSYDGNNAAI</b>
101	<b>RSSVHYSQGY</b>	NNAFWNGSEM	VYGDGDGQTF	IPLSGGIDVV	AHELTHAVTD
151	YTAGLIYQNE	SGAINEAISD	IFGTLVEFYA	NK <b>NPDWEIGE</b>	<b>DVYTPGISGD</b>
201	<b>SLRSMSPAK</b>	<b>YGDPDHYSKR</b>	YTGTQDNNGV	HINSGIINKA	AYLISQGGTH
251	YGVSVVGIGR	DKLGKIFYRA	<b>LTQYLTPTSN</b>	<b>FSQLRAAAVQ</b>	<b>SATDLYGSTS</b>
301	<b>ZZVASVKQAF</b>	DAVGVK			

**Figura 7:** Peptídeos identificados por espectrometria de massas a partir da banda de aproximadamente 35 kDa do sobrenadante de cultivo (em vermelho) e sua correspondência com a sequência de aminoácidos da termolisina. (Fonte: MASCOT)

A busca da sequência de aminoácidos da termolisina, restrita ao gênero *Anoxybacillus*, no banco de dados do NCBI, retornou apenas resultados com baixas identidades e não relacionados aos peptídeos previamente identificados por espectrometria de massas. Entretanto, na busca da mesma sequência, restrita ao gênero *Geobacillus*, que é filogeneticamente próximo ao gênero *Anoxybacillus*, verificou-se 99% de identidade com a metaloprotease *nprS*, análoga da termolisina, produzida por *Geobacillus stearothermophilus*.

A sequência do gene da protease *nprS*, contendo 1656 nucleotídeos, foi obtida no banco de dados do NCBI, e a partir dela foram desenhados primers para busca de gene correspondente no isolado *Anoxybacillus* sp. PC2.

O produto de PCR do gene *nprS* apresentou tamanho compatível com o gene pesquisado. O sequenciamento dos amplicons desse gene foi analisado com a ferramenta BLAST e comparado com o banco de dados do NCBI, mostrando 98% de similaridade com o gene da metaloprotease neutra *nprS*. Entretanto, o sequenciamento apresentou

algumas regiões em que o nucleotídeo não foi identificado. Assim, novo sequenciamento, precedido de clonagem, deve ser realizado, visando obter sequências com maior qualidade.

## **5. CAPÍTULO III: ESTUDOS PARA CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO ISOLADO *Anoxybacillus* sp. PC2**

Este capítulo descreve ensaios realizados para caracterização fenotípica e análise filogenética do isolado *Anoxybacillus* sp PC2. O isolamento e seleção deste isolado, bem como produção de enzima queratinolítica foram discutidos no Capítulo II.

### **5.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1.1. Ensaio de Gram do isolado *Anoxybacillus* sp. PC2**

O isolamento e seleção da bactéria *Anoxybacillus* sp. PC2 foram descritos no Capítulo I, subitem 3.2.1. As colônias isoladas foram preservadas em leite desnatado com 15% de glicerol (v/v) a -20 °C. Para a caracterização fenotípica e morfológica, a bactéria foi semeada em agar leite e incubada a 60 °C por 24 horas. As células bacterianas foram coradas pelo método de Gram e a morfologia celular foi examinada em microscópio ótico.

#### **5.1.2. Determinação do perfil enzimático e utilização de substratos**

Para os testes de assimilação e para pesquisa de atividade enzimática foram utilizados o kits API<sup>®</sup> 20 NE e API ZYM<sup>®</sup> (BioMérieux), conforme instruções do fabricante. As tiras API foram inoculadas e incubadas a 60 °C por 24 horas para API<sup>®</sup> 20 NE e por 4 horas para API ZYM<sup>®</sup>. A detecção de citocromo oxidase foi realizada

utilizando o kit Microbiology Bactident<sup>®</sup> Oxidase (Merk), conforme instruções do fabricante.

### **5.1.3. Análise filogenética do gene 16S rRNA**

O gene 16S rRNA foi amplificado e sequenciado conforme descrito no Capítulo I, subitem 3.2.2. O resultado do sequenciamento foi comparado a estirpes tipo e referência encontradas no GenBank. Os alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994). As análises filogenéticas foram feitas pelo método “neighbour-joining”, utilizando-se a análise bootstrap baseada em 1000 repetições. A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2013)

## **5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 é um bastonete Gram positivo, como demonstrado pela análise microscópica das células coradas por Gram. Em agar leite forma colônias amareladas e circulares. Foram observados crescimento e produção de protease a 60 °C, não tendo sido observado crescimento a 37 °C em 24 horas. A reação de citocromo oxidase apresentou resultado positivo. Os resultados preliminares de caracterização quanto a utilização de substratos e testes enzimáticos são mostrados na Tabela 4.



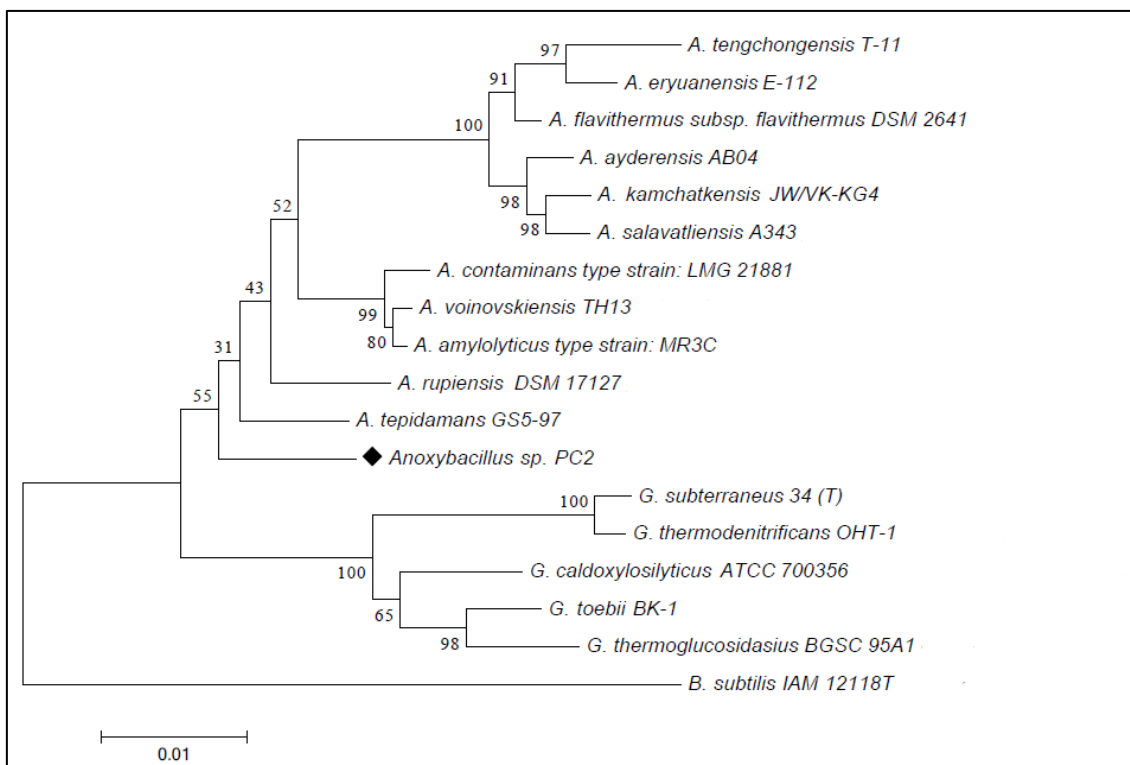
**Tabela 4:** Testes enzimático e de assimilação de substratos por *Anoxybacillus* sp. PC2

API ZYM <sup>®</sup>	
Ensaio enzimático para	Resultado
Fosfatase Alcalina	-
Esterase (C4)	+
Lipase/ Esterase (C8)	+
Lipase (C14)	-
Leucina arilamidase	-
Valina arilamidase	-
Cistina arilamidase	-
Tripsina	-
$\alpha$ -quimotripsina	-
Fosfatase ácida	-
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	+
$\alpha$ -galactosidase	-
$\beta$ -galactosidase	-
$\beta$ -glucuronidase	-
$\alpha$ -glucosidase	+
$\beta$ -glucosidase	-
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase	-
$\alpha$ -manosidase	-
$\beta$ -fucosidase	-
API 20 NE <sup>®</sup>	
Reações/ Enzimas	Resultado
Redução de nitratos a nitritos	-
Redução de nitratos a nitrogênio	-
Produção de indol (Tryptofano)	-
Fermentação (Glicose)	-
Arginina Dihidrolase	-
Urease	-
Hidrólise ( $\beta$ -glucosidase)(Esculina)	-
Hidrólise (protease)(Gelatina)	-
$\beta$ -galactosidase (Para-Nitrofenil- $\beta$ D-Galactopiranosidase)	-
Assimilação	Resultado
Glicose	-
Arabinose	+
Manose	-
Manitol	+
N-Acetil-Glucosamina	+
Maltose	+
Gluconato de potássio	+
Ácido Cáprico	-
Ácido adípico	-
Malato	-
Citrato trissódico	-
Ácido fenilacético	-

+ atividade/crescimento observado; - sem atividade/crescimento.

A caracterização enzimática detectou esterase (C4), esterase lipase (C8), naftol-AS-BI-fosfotidrolase e  $\alpha$ -glucosidase. O isolado ainda é capaz de assimilar arabinose, manitol, N-acetil-glucosamina, maltose e gluconato de potássio.

A análise preliminar do gene 16S rRNA consistiu em uma busca no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta BLAST, e aproximou o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 do *Anoxybacillus tepidamans*, com 98% de similaridade. A análise filogenética do gene 16S rRNA realizada a seguir, comparou a sequência de 1419 nucleotídeos obtida para o isolado *Anoxybacillus* sp PC2 com sequências de cepas tipo e referência mais relacionadas (Figura 8). O resultado mostra o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 em um ramo independente dentro do gênero *Anoxybacillus*, que por sua vez aparece filogeneticamente separado do o gênero *Geobacillus*. A árvore filogenética confirma que o isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 está mais próximo filogeneticamente da espécie *Anoxybacillus tepidamans* do que das demais espécies analisadas.



**Figura 8:** Posição filogenética do *Anoxybacillus* sp. PC2 com outras espécies validamente descritas baseada em sequências 16S rRNA. *Bacillus subtilis* foi utilizado como representante de um grupo externo. A árvore filogenética foi construída utilizando o método “neighbour-joining”. O percentual de replicatas nas quais os táxons associados se agrupam no teste bootstrap (1000 replicatas) é mostrado ao lado dos nodos dos ramos.

No que diz respeito à similaridade do *Anoxybacillus* sp. PC2 com o *Anoxybacillus tepidamans*, destaca-se que, interessantemente, eles diferem em algumas características bioquímicas, comparando-se com dados disponíveis na literatura (SCHÄFFER *et al.*, 2004). Entre as características que se dispõe de dados, estão a redução de nitratos a nitritos, produção de indol, urease, hidrólise de gelatina, e a utilização de glicose, manose e maltose. Enquanto relatos indicam a utilização de glicose, manose e redução de nitratos a nitritos pelo *Anoxybacillus tepidamans*, esses resultados positivos não foram observados nos ensaios realizados com o *Anoxybacillus* sp. PC2 (Tabela 4). Essas características,

somadas aos resultados filogenéticos, indicam a possibilidade de que o *Anoxybacillus* sp. PC2 não pertença à espécie *Anoxybacillus tepidamans* tratando-se, nesse caso, de uma nova espécie. Entretanto, análises filogenéticas de genes “housekeeping”, entre outros ensaios, ainda devem ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a capacidade do isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 de crescer a 60 °C utilizando queratina proveniente de penas de aves como única fonte de carbono e nitrogênio. O cultivo do isolado nessas condições, além de promover a degradação parcial das penas em meio de cultura, ainda induziu a produção de uma protease queratinolítica termoativa. Essas características mostram-se promissoras para o emprego deste isolado em processos biotecnológicos, como a bioconversão da queratina em hidrolisados proteicos.

Esta é a primeira observação de atividade queratinolítica proveniente de protease produzida por um isolado do gênero *Anoxybacillus*. Os dados obtidos a partir da análise da provável protease envolvida no processo de degradação da queratina abrem perspectivas para identificação e caracterização da metaloprotease em questão, já que tampouco existem relatos de produção de metaloproteases da família da termolisina por isolados do gênero *Anoxybacillus*.

Ainda, a análise filogenética do isolado *Anoxybacillus* sp. PC2 abre a possibilidade da identificação de uma nova espécie, contribuindo para o conhecimento da diversidade de micro-organismos, especialmente por se tratar de um isolado proveniente da Caatinga, um bioma exclusivamente Brasileiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANO ENZYME. Enzyme applications. Disponível em <[http://www.amano-enzyme.co.jp/aeu/product/print\\_foodprocessing.html](http://www.amano-enzyme.co.jp/aeu/product/print_foodprocessing.html)>. Acesso em 18 jan. 2014.
- BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J. & BRANDELLI, A. Production, one-step purification and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochem*, 47: 2455-2462, 2012.
- BALAJI, S.; KUMAR, M. S.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR, R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R. & SEHGAL, P.K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 2741-2745, 2008.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J. & RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 1735-1750, 2010.
- BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M. & VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol*. 65, 2570-2575, 1999.
- BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M. & BOOM, R. M. Thermozyms and their applications: A review of recent literature and patents. *Appl Biochem Biotech*, 90: 155-186, 2001.
- DALEV, P. An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder. *Biotechnol Lett*, 12, 71-72, 1990.
- DALEV, P. G. Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour Technol*, 48: 265-267, 1994.
- 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 maltophilia* strain. *Can J Microbiol*, 48: 342-348, 2002.
- DOZIE, I. N. S.; OKEKE, C. N. & UNAEZE, N. C. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 10: 563-567, 1994.
- FANG, Z.; ZHANG, J.; LIU, B.; DU, G. & CHEN, J. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *Int Biodeter Biodegr*, 82: 166-172, 2013.

FUJIWARA, S. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *J Biosci Bioeng*, 94: 518-525, 2002.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SCHMIDT, G. S.; AVILA, V. S.; JAENISCH F. R. F. & PAIVA, D. P. Recomendações técnicas para a produção, abate, processamento e comercialização de frangos de corte coloniais. Embrapa Suínos e Aves, 2007. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaProducaoFrangosCorteColoniais/preparo.htm>>. Acesso em 17 jan. 2014.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N. & SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim Nova*, 30: 136-145, 2007

GUPTA, R. & RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 21-33, 2006.

GUPTA, R.; SHARMA, R. & BEG, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Crit Rev Biotechnol*, 33:216-228, 2012.

KORNILŁOWICZ-KOWALSKA T. & BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage*, 31: 1689-1701, 2011.

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

LEE, H.; SUH, D. B.; HWANG, J. H.; SUH, H. J. Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Appl Biochem Biotechnol*, 97: 123-133, 2002.

MACEDO, A. J.; SILVA, W. O. B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J. A. P & TERMIGNONI, C. Novel Keratinase from *Bacillus subtilis* S14 Exhibiting Remarkable Dehairing Capabilities. *Appl Environ Microbiol*, 71: 594-596, 2005.

MANSFELD, J. Metalloproteases. In: POLAINA, J. & MACCABE, A. P. (Eds) *Industrial Enzymes*. Springer, Cap. 14, p. 221-242, 2007.

MATSUBARA, H.; SINGER, A.; SASAKI, R. & JUKES, T. H. Observations on the specificity of a thermostable bacterial protease "thermolysin". *Biochem Biophys Res Commun*, 21: 242-247, 1965.

MAZOTTO, A. M.; MELO, A. C. N.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R.; CEDROLA, S. M. L.; COURI, S.; ZINGALI, R. B.; VILLA, A. L. V.; RABINOVITCH, L.; CHAVES, J. Q. & VERMELHO, A. B. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. *World J Microbiol Biotechnol*, 27: 1355-1365, 2011.

MITSUIKI, S.; ICHIKAWA, M.; OKA, T.; SAKAI, M.; MORIYAMA, Y.; SAMESHIMA, Y.; GOTO, M. & FURUKAWA, K. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardopsis* sp. TOA-1. *Enzyme Microb Technol*, 34: 482-489, 2004.

MOKREJS, P.; SVOBODA, P.; HRNCIRIK, J.; JANACOVA, D. & VASEK, V. Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis. *Waste Manage Res*, 29, 260-267, 2011.

NAM, G. W.; LEE, D. W.; LEE, H. S.; LEE, N. J.; KIM, B. C.; CHOE, E. A.; HWANG, J. K.; SUHARTONO, M. T. & PYUN, Y. R. Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. *Arch Microbiol*, 178: 538-547, 2002.

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. *Bioresour Technol*, 66:1-11, 1998.

PAPADOPOULOS, M. C. Effect of processing on high-protein feedstuffs: a review. *Biol Waste*, 29: 123-138, 1989.

PISSUWAN, D. & SUNTORNSUK, W. Production of keratinase by *Bacillus* sp. FK 28 isolated in Thailand. *Kasetsart J*, 35: 171-178, 2001.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K. & SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application on feather degradation and dehairing of the goat skin. *Appl Biochem Biotechnol*, 160: 1909-1920, 2010a.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S. K. & SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87: 625-633, 2010b.

RAMNANI, P.; SINGH, R. & GUPTA, R. Keratinolytic potential of *Bacillus Licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Can J Microbiol*, 51: 191-196, 2005.

RIESSEN, S. & ANTRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*, 5: 399-408, 2001.

SCHÄFFER, C.; FRANCK, W.; SCHEBERL, A.; KOSMA, P.; MCDERMOTT, T. R. & MESSNER, P. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus tepidamans* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 2361-2368, 2004.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O. & MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68: 850-858, 1996



SHRINIVAS, D. & NAIK, G. R. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *Int Biodeter Biodegr*, 65: 29-35, 2011.

STILBORN, H. L.; MORAN, E. T.; GOUS, R. M. & HARRISON, M. D. Effect of age on feather amino acid content in two broiler strain crosses and sexes. *J Appl Poultry Res*, 6: 205-209, 1997.

SUZUKY, Y.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUI, H. & WATANABE, K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J Biosci Bioeng*, 102: 73-81, 2006.

SYED, D. G.; LEE, J. C.; LI, W.; KIM, C. & AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour Technol*, 100: 1868-1871, 2009.

SYNOWIECKI, J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr J Biotechnol*, 9(42): 7020-7025, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. & KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725-2729, 2013

TASKIN, M. & KURBANOGLU, E. B. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *J Appl Microbiol*, 111:826-834, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680, 1994

UBABEF. Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura. Disponível em <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em 17 jan. 2014.

USDA. 2013 International Long-Term Projections to 2022. Disponível em <<http://www.ers.usda.gov/data-products/international-baseline-data.aspx#.UbiqxfQrg8>>. Acesso em 17 jan. 2014.

VERMELHO, A. B.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A. J.; BRANDELLI, A. & BON, E. P. S. Enzimas queratinolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B. & COELHO, R. R. R. (Eds) *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, Cap. 12, p. 289-305, 2008a.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S. & BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações

biotecnológicas. In: \_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Rio de Janeiro: Interciência, Cap. 11, p. 273-287, 2008b.

WILLIAMS, C. M.; LEE, C. G.; GARLICH, J. D. & SHIH, J. C. H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. *Poultry Sci*, 70: 85-94, 1991.

WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; MACKENZIE, J. M. & SHIH, J. C. H. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 56(6): 1509-1515, 1990.

## **CURRICULUM VITÆ resumido**

**REIS, S.V.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Sharon Vieira dos Reis

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, RS, Brasil. 27/03/1981

**Endereço profissional:** UFRGS, Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431, laboratório 217

Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS - Brasil

**Telefone profissional:** 33086082

**E-mail:** sharonvreis@hotmail.com

**2. FORMAÇÃO:** Graduação em Biomedicina (UFRGS, 2004 – 2007)

Extensão em Língua Inglesa (Universidade Feevale 2000 – 2006)

### **3. ESTÁGIOS:**

01/2011 – 02/2012: Instituição: UFRGS

Estágio extracurricular

Orientador: Dr. Alexandre José Macedo

Atividades desenvolvidas: Participação em projeto de pesquisa  
(Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana)

11/2010 – 07/2011 Instituição: Universidade Feevale

Aperfeiçoamento científico

Orientação: Profa. Dra. Annette Droste

Atividades desenvolvidas: Participação em projeto de pesquisa  
(Grupo de Pesquisa Indicadores de Qualidade Ambiental)

10/2007 – 03/2008 Instituição: Serviço Municipal de Águas e Esgotos (SEMAE)

Estágio curricular supervisionado

Responsável: Juliana Chaves

Atividades desenvolvidas: Análises de água (físico-químicas e microbiológicas).

- 01/2007 – 07/2007    Instituição: UFRGS  
Estágio curricular em pesquisa  
Orientação: Prof. Dr. Rafael Roesler  
Atividades desenvolvidas: Participação em projeto de pesquisa (Laboratório de Pesquisas em Câncer)
- 03/2005 – 12/2006    Instituição: UFRGS  
Iniciação científica  
Orientador: Prof. Dr. Rogério Margis  
Atividades desenvolvidas: Participação em projeto de pesquisa (Laboratório de Genoma e População de Plantas)

#### **4. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

REIS, S. V.; TIRLONI, L.; TERMIGNONI, C. & MACEDO, A. J. Seleção de micro-organismos termófilos e produção de queratinase termoestável. 27 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.

REIS, S. V.; TERMIGNONI, C. & MACEDO, A. J. Isolation of a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. and evaluation of its feather biodegradation ability. 8th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium, 2013.

ENDRES JÚNIOR, D.; SASAMORI, M. H.; REIS, S. V.; FÜHR, P. C. & DROSTE, A. Biomonitoramento do arroio Vila Kunz no parque Municipal Henrique Luiz Roessler, Novo Hamburgo, RS, com uso de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. var. *purpurea* Boom (Commelinaceae). XIV Encontro de Botânicos do Rio Grande do Sul e VI Encontro Estadual de Herbários, 2011.