



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

PATYANNE CARVALHO CORREIA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO INTEGRADO DE PRODUÇÃO E  
EXTRAÇÃO DE QUERATINASES POR *Aspergillus* spp UTILIZANDO SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS

RECIFE, 2013

PATYANNE CARVALHO CORREIA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO INTEGRADO DE PRODUÇÃO E  
EXTRAÇÃO DE QUERATINASES POR *Aspergillus* spp UTILIZANDO SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biociência Animal da Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, como  
pré-requisito para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Tatiana Souza Porto  
Co-orientadore: Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia  
Figueiredo Porto

Recife  
2013

Ficha catalográfica

C824d Correia, Patyenne Carvalho  
Desenvolvimento de um processo integrado de produção e extração de queratinase por *Aspergillus* spp utilizando sistema de duas fases aquosas / Patyenne Carvalho Correia. – Recife, 2013.  
62 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.  
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.  
Referências.

1. Queratinase 2. *Aspergillus* 3. Sistema de duas fases aquosas I. Porto, Tatiana Souza, orientadora II. Título

CDD 636.089



Patyenne Carvalho Correia

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO INTEGRADO DE PRODUÇÃO E  
EXTRAÇÃO DE QUERATINASES POR *Aspergillus* spp UTILIZANDO SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS

Data da aprovação: 22 de fevereiro de 2013

Banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Souza Porto  
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Paz Carvalho  
(Departamento de Bioquímica – UFPE)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Oliane Maria Correia Magalhães  
(Departamento de Micologia – UFPE)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Camila Souza Porto  
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Recife, 2013

Dedico às pessoas que fazem minha  
vida ter um sentido... Minha família,  
em especial minha mãe! Amo  
vocês!

“O que prevemos raramente ocorre;  
o que menos esperamos geralmente  
acontece” (Benjamin Disraeli)

## **Agradecimentos**

Agradeço à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Tatiana Souza Porto, pela orientação, confiança, apoio e ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha co-orientadora Prof<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto pela oportunidade de ter me acolhido no grupo e ser um exemplo de dedicação à ciência.

À FACEPE, pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Anaíldes Pinheiro de Carvalho Correia, pelo exemplo de caráter e dignidade, e pelo carinho, apoio e confiança irrestritos, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Pãmmela e Petherson pelo apoio e incentivo, bem como a todos os meus familiares.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia (LABTECBIO): Amanda Sales, Ana Paula, Camila Porto, Catarina Ferreira, Diego Dias, Juanize Matias, Meire Falcão, Milena dos Santos, Mitaliene de Deus, Patrícia Cunha, Priscilla Calaça, Pollyana Herculano, Sheylla Araújo e Thiago Pajeú, que estiveram presentes, auxiliando, incentivando e compartilhando as conquistas.

À minha amiga Priscilla Sales que esteve presente desde o início desta empreitada e juntas conseguimos conquistar mais esta etapa acadêmica.

Agradeço a todos os professores, colegas e funcionários da pós-graduação em Biociência Animal.

E finalmente aos meus amigos do dia-a-dia Annie Elise, Pedro Arthur, Isabela Oliveira, Emanuel Filho, Karolina Marçal e Rodrigo Machado que estiveram suportando minhas decepções e estimulando-me cada vez que eu precisei.



## RESUMO

Queratinases são enzimas proteolíticas que tem como substrato um grupo de proteínas fibrosas e insolúveis denominadas queratinas. Alguns micro-organismos como fungos excretam queratinases capazes de hidrolisar as ligações peptídicas presentes na queratina, principal componente das penas de aves. Diante do contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar um micro-organismo produtor de queratinases, bem como desenvolver um processo integrado de produção, extração e purificação da queratinase por fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas (SDFA), preparados com polietileno glicol (PEG) e sais citrato. A linhagem *Aspergillus* sp SIS 11 foi a melhor produtora de queratinases (7,65 U/mL), nas quais as melhores condições para produção da enzima apresentavam 0,5% de pena e pH 9,0. As melhores condições de extração das enzimas em SDFA foram obtidas com 20% de PEG com massa molar 400 (g/mol), pH 8,0, 20% (m/m) de citrato de sódio, promovendo assim aumento da pureza de 7,41, coeficiente de partição de 0,74 e recuperação de 503,6%. Na fermentação extrativa a enzima produzida apresentou coeficiente de partição  $K = 1,39$  e recuperação de 65,08%. A linhagem estudada mostrou-se eficaz para a produção da enzima e potencial biotecnológico para aplicação em ração animal.

Palavras-chave: Queratinases, *Aspergillus*, Sistema de duas fases aquosas, purificação

## ABSTRACT

Keratinase are proteolytic enzymes whose substrate are a group of fibers and insoluble proteins denominate keratin. Some several micro-organisms such as fungi are capable to produce keratinase and to hydrolyze disulfide bonds present in keratinous substrates. The aim of this study was to select a producer keratinase and develop an integrated system which combines production, extraction and purification of keratinase by extractive fermentation in aqueous two-phase system (ATPS), prepared with polyethylene glycol (PEG) and citrate salts. Were observed the fermentation with *Aspergillus* sp SIS 11 was the higher producer of keratinases (7.65 U / mL), which the best conditions for enzyme production showed feather 0.5% o and pH 9.0. An ATPS which is composed of 20% (w/w) PEG 400 molar mass (g/mol), pH 8.0, 20% (w / w) sodium citrate, provided the best conditions for extractive keratinase production. Promoting greater (purification) 7.41, partition coefficient 0.74 and enzyme recovery 503.6%. In extractive fermentation enzyme produced presented partition coefficient  $K = 1.39$  and enzyme recovery 65.08%. The studied strain was effective for enzyme production and biotechnological potential to use in animal feed.

**Keywords:** keratinases, *Aspergillus*, aqueous two-phase system, purification

## Lista de figuras

### Capítulo I

- Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações da concentração de pena e variação de pH 37
- Figura 2.** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da interação entre concentração de citrato e a massa molar do PEG, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição K 43
- Figura 3.** Diagrama para interpretação geométrica do efeito do planejamento  $2^4$ , tendo como variável-resposta à recuperação em atividade e a concentração de citrato em função do PEG 45
- Figura 4.** Representação gráfica do fator de purificação em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG 46

### Capítulo II

- Figura 1.** Diagrama para interpretação geométrica do efeito do planejamento  $2^2$ , tendo como variável-resposta à recuperação da extração ( $Y_t$ ) na fase rica em PEG e a concentração de citrato em função da massa molar do PEG 64
- Figura 2.** Correlação entre a concentração de citrato e massa molar do PEG em função da recuperação da fermentação extrativa 65

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> Micro-organismos produtores de queratinases a partir de resíduos agroindustriais	9
<b>Capítulo I</b>	
<b>Tabela 1.</b> Níveis das variáveis utilizadas no planejamento $2^4$ para extração de queratinases em S DFA	33
<b>Tabela 2.</b> Produção de enzimas queratinolíticas por <i>Aspergillus</i> spp em fermentação submersa com penas de galinha. Atividades queratinolíticas expressas em U/mL	35
<b>Tabela 3.</b> Matriz do planejamento fatorial para produção de queratinases por <i>Aspergillus</i> sp SIS 11, tendo como resposta a atividade queratinolítica em U/mL	36
<b>Tabela 4</b> Visualização da degradação das penas presentes no meio por <i>Aspergillus</i> sp SIS 11	38
<b>Tabela 5.</b> Resultados do planejamento fatorial $2^4$ para extração de queratinases de <i>Aspergillus</i> sp SIS 11 na fase sal do S DFA	40
<b>Tabela 6.</b> Tabela dos efeitos estimados para coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y) e fator de purificação (FP)	42
<b>Capítulo II</b>	
<b>Tabela 1.</b> Níveis das variáveis utilizadas no planejamento $2^2$ para produção e extração integrada de queratinases em S DFA	59
<b>Tabela 2.</b> Resultados do planejamento fatorial $2^2$ para extração de queratinases de <i>Aspergillus</i> sp SIS 11 na fermentação extrativa utilizando PEG 20% e pH 8,0. No S DFA	61
<b>Tabela 3.</b> Tabela dos efeitos estimados para a recuperação da extração da queratinase	63

## **Lista de Siglas e Abreviaturas**

SDFA – Sistema de duas fases aquosas

PEG – Polietileno glicol

$C_{CIT}$  Concentração de citrato

$C_{PEG}$  – Concentração de PEG

K – Coeficiente de partição

Y – Recuperação da atividade

FP – Fator de purificação

Y<sub>t</sub>- Recuperação na fermentação extrativa

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
3.1 PROTEASES	4
3.2 QUERATINASES	5
<b>3.2.1 Queratina</b>	<b>6</b>
3.3. MICRO-ORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS	6
3.4. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA	8
3.5. FERMENTAÇÃO UTILIZANDO RESÍDUOS	9
3.6. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	10
<b>3.6.1 Fatores que influenciam o comportamento das fases.....</b>	<b>11</b>
3.6.1.1 Massa molar e concentração do polímero .....	12
3.6.1.2 Adição de sais .....	12
3.6.1.3 Alteração do pH .....	13
3.7 FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	13
<b>4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
CAPITULO I	23
Produção e purificação de queratinases produzidas por <i>Aspergillus sp</i> SIS11 utilizando sistemas de duas fases aquosas	23
Resumo	24
ABSTRACT	25
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>26</b>
<b>2.MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1 MICRO-ORGANISMOS	26
2.2 SELEÇÃO DE FUNGOS QUERATINOLÍTICOS POR CULTIVO SUBMERSO	26
2.3PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR CULTIVO SUBMERSO	27
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA	27
2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	28
2.6 PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)	28
2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES	28
2.8 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SDFA	29
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
3.1 SELEÇÃO DE FUNGOS QUERATINOLÍTICOS	29
3.2 PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR ASPERGILLUS SP SIS 11	31
3.3 Extração de queratinases em sistemas de duas fases aquosas (SDFA)	34
<b>4.CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>
Capitulo II	46
Produção e extração integrada de queratinases por <i>Aspergillus sp</i> SIS 11 em fermentação extrativa	46
Resumo	47
ABSTRACT	49
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>50</b>
<b>2.MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
2.1 MICRO-ORGANISMOS	51
2.2 MEIO PARA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SDFA	51
2.3 PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO) NA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA	51

2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA	51
2.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SDFA	52
2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	53
2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA	53
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>61</b>





## 1. INTRODUÇÃO

As penas são constituídas por queratina e são resíduos q largamente produzidos pelas indústrias avícolas. Estima-se que cinco milhões de toneladas de penas são produzidos anualmente a um fluxo de resíduos a partir da produção de carne de aves (POOLE et al., 2009). Este subproduto pode ser um problema ambiental e ou a perda de uma fonte rica em proteínas, se não processado eficientemente (GOUSTEROVA et al., 2005). Abundantes quantidades de resíduos queratinosos estão prontamente disponíveis na natureza, como pena, cabelo, lã, chifres, unhas e cascos, mas o emprego devido a sua recalcitrância tem aplicações limitadas (GUPTA; RAMMANI, 2006). As penas são constituídas por aproximadamente 90% de queratina (ASTBURY; BEIGHTON, 1961), apresentando-se principalmente na forma de  $\beta$ -folha pregueada (SAWYER et al., 2000), que lhes confere uma difícil degradação pela sua conformação com grandes quantidades de pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, são resistentes a enzimas proteolíticas comuns, como tripsina, pepsina e papaína (ONIFADE et al., 1998).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com cepas microbianas que produzem proteases específicas, denominadas queratinases que são capazes de hidrolisar a queratina, transformando queratina nativa em pequenas moléculas que podem subsequentemente ser absorvidas pelas células (BERNAL et al., 2006; GUPTA; RAMNANI, 2006). O isolamento de micro-organismos que produzam enzimas queratinolíticas mais resistentes, específicas e termoestáveis a fim de serem aplicadas na indústria tem sido realizado com o interesse de diminuir possíveis impactos ambientais, como a poluição causados pelos processos de incineração das penas pelas indústrias (RIESSEN; ANTRANIKIAN, 2001; DEYDIER et al, 2005). Entre os micro-organismos que apresentam atividade queratinolítica incluem-se bactérias, *Bacillus* spp (BRESSOLIER et al., 1999; CEDROLA et al., 2012), *Streptomyces* spp (IGNOVATA et al., 1999; EL-SAYED, 2009) e algumas espécies de *Aspergillus* (KIM, 2007; EL-AYOUTY et al., 2012).

Para o desenvolvimento de produtos a partir de micro-organismos, é necessário o estudo de fatores que possam influenciar na produção da biomolécula de interesse. O aperfeiçoamento da produção pode ser realizado por meio de planejamentos fatoriais, o seu emprego possibilita que se determine os fatores e as combinações de fatores que exercem a maior influencia no desempenho de um determinado processo experimental. Desta forma, resultando em uma redução de tempo e custo operacional e de uma

melhora no rendimento de um determinado processo a partir das respostas obtidas através do planejamento (TEÓFILO; FERREIRA, 2006; KALIL et al., 2000).

O SDFA tem sido amplamente aplicado na separação de biomoléculas devido a sua agilidade de manuseio. São utilizados para a purificação o polietileno glicol (PEG)/sal ou sistema de polímero/polímero, por exemplo PEG/dextrana (XIU et al, 2009). Os sistemas PEG/sais têm sido introduzidos para a aplicação prática de separação de proteínas em larga-escala, devido a maior diferença de densidade entre as fases, baixa viscosidade, baixo custo, maior rapidez na separação, principalmente quando comparada com os sistemas PEG/dextrana (BENAVIDES; RITO-PALOMARES et al., 2008). O sistema de duas fases aquosas é uma técnica, onde os passos de produção, concentração e purificação parcial podem ser integrados em apenas um passo, sendo também bastante seletivos e fáceis de aumento de escala. Destaca-se também o fato de ser um método que proporciona um ambiente ameno para as biomoléculas (proteínas), uma vez que ambas as fases são constituídas essencialmente por água (75-90%), e ainda a ausência de superfícies sólidas (como membranas ou outros suportes), evitando problemas de adsorção não específica das proteínas a essas superfícies (ALBERTSSON, 1986; KEPKA, 2004).

A fermentação extrativa, um processo que integra produção e recuperação *in situ*, é o método de escolha para aumentar a recuperação dos processos fermentativos convencionais, que em geral é baixa. A indústria requer processos rápidos e econômicos no que diz respeito a processos de purificação de biomoléculas com elevado grau de pureza e rendimento, e as fermentações extrativas, utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA), é uma alternativa promissora para os processos convencionais (ALBERTSSON, 1986; SINHA et al., 2000; OLIVEIRA; 2003).

Neste contexto, o presente trabalho teve como finalidade produzir e extrair queratinases de interesse biotecnológico, de maneira integrada, por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) por *Aspergillus* sp SIS 11, podendo ser aplicadas na produção de ração animal.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e extrair enzimas queratinolíticas por *Aspergillus* spp utilizando sistema de duas fases aquosas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar linhagem pertencente ao gênero *Aspergillus* produtor de enzimas queratinolíticas;
- Avaliar a capacidade de degradação de penas e produção de queratinases durante a fermentação submersa da linhagem de *Aspergillus* selecionada;
- Determinar as melhores condições de produção das queratinases por fermentação em cultivo submerso, utilizando planejamento fatorial.
- Estudar a influência das variáveis (massa molar do PEG, concentração do PEG, pH e concentração de citrato) sobre a purificação das queratinases produzida por *Aspergillus* sp SIS 11 utilizando sistema de duas fases aquosas.
- Determinar as melhores condições de produção e extração integrada de queratinases em fermentação extrativa, utilizando planejamento fatorial.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PROTEASES

Proteases, também denominadas de proteinases ou peptidases, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Estas formam um complexo grupo de enzimas, que variam enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (RAO et al., 1998). Causam alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e biotecnológicos (BARRET; RAWLINGS; BRIEM, 2001).

Quatro classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as quais compreendem seis famílias de acordo com a massa molecular, com suas propriedades elétricas e com sua especificidade ao substrato. São: serino protease I (elastase e tripsina), serino protease II (subtilisina), cisteíno proteases (actinidina), aspártico proteases (renina), metalo proteases I (carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (termolisina). Cada família de protease apresenta resíduos de aminoácidos funcionais, característicos no seu sítio ativo (BEYNON, 1996).

As proteases representam 60% do total de enzimas produzidas pela indústria mundial. Estas enzimas podem ser utilizadas como componentes de detergentes, na indústria de alimentos, em processo de tratamento de resíduos e biorremediação, na indústria de produtos farmacêuticos, entre outros (GODFREY; WEST, 1996; CEDROLA et al., 2012). As enzimas são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos e são encontradas em uma grande diversidade de fontes, como animais, micro-organismos e plantas (RAO et al., 1998).

As proteínas são degradadas pelos micro-organismos, que utilizam o produto desta degradação como nutrientes para seu crescimento (SAID; PIETRO, 2004). As proteases produzidas por plantas requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilidade de área para cultivo e condições climáticas. Neste contexto, os micro-organismos são preferidos frente a outras fontes de proteases, por serem de rápido crescimento e requerer espaço limitado para cultivo. Além de serem mais estáveis que as homologadas por plantas e seu processo de produção mais fácil (RAO et al., 1998).

Proteínas fibrosas presentes em materiais como penas, cascos, chifres e cabelos estão abundantemente disponíveis na natureza, sendo desprezados como resíduos, mas estes resíduos são fontes de nutrientes para animais, como fontes de aminoácidos, nitrogênio e enxofre. Empregando métodos biotecnológicos, as bactérias e fungos desempenham papel fundamental no processamento de resíduos de queratinolíticos (JUSTYNA; TERESA, 2011).

### 3.2 QUERATINASES

As queratinases (EC. 3.4.99.11) descritas na literatura são, em sua maioria, serino proteases, moderadamente termofílicas, (suportando temperaturas entre 45°C e 90°C) e alcalinas (apresentando boa atividade entre pH 7,5 a 10,0). Micro-organismos produtores de queratinases são encontrados em diversos locais, com ou sem histórico de materiais queratinosos, incluindo ambientes aeróbios e anaeróbios. (BERNAL, 2006).

A grande diversidade de proteases, em contraste com a especificidade da sua ação, tem atraído à atenção mundial em tentativas de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO et al., 1998). Dependendo da espécie do micro-organismo produtor, as propriedades físico-químicas das enzimas tem se mostrado bastante diversas (BRESSOLIER et al., 1999). Queratinases microbianas têm sido aplicadas como biocatalisadores promissores na indústria de alimentos, fertilizantes, detergentes, couro e têxtil, além de aplicações farmacêuticas e biomédicas (BRANDELLI, 2008).

Enzimas queratinolíticas podem ser adicionadas à dieta de animais com o intuito de aumentar a digestibilidade de componentes proteicos em rações. A adição de queratinases microbianas como suplemento alimentar pode resultar no desenvolvimento do animal, com o aumento da digestão de componentes da dieta, e rendimento de carne em frangos de corte (ODETALLAH et al., 2005; WANG et al., 2006 e 2008).

Neste contexto, micro-organismos queratinolíticos e suas enzimas são importantes para o desenvolvimento de processos não poluentes. Essas enzimas são produzidas por algumas gêneros de fungos, tais como: *Aspergillus* sp (FRIEDRICH et al., 1999; KIM, 2007); *Tricophyton* (ANBU et al., 2007) *Brevibacillus* sp (MUKHERJEE et al., 2011). Queratinases também tem sido descritas por diversas espécies de Actinomicetos, especialmente do gênero *Streptomyces*. Esses micro-organismos isolados de diferentes solos são associados a uma larga variedade de substratos queratinosos, como cabelo, lã e pena, encontra-se nesse gênero espécies

mesofílicas (*Streptomyces flavis*) e termofílicas (*Fervidobacterrium islandicum* AW - 1, (NAM et al., 2002; GOUSTEROVA et al., 2005).

### 3.2.1 Queratina

Queratina é uma proteína fibrosa insolúvel, conhecida por sua alta estabilidade estrutural (FRIEDRICH et al., 1999). É o principal componente de penas, pêlos, unhas, cascos e escamas. As características de insolubilidade, estabilidade e resistência à degradação proteolítica das queratinas são consequências do empacotamento compactado das cadeias proteicas em estruturas de  $\alpha$  - hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -folhas ( $\beta$ -queratina) e do elevado nível de enovelamento da cadeia polipeptídica. Além dos motivos citados, essa proteína apresenta um alto grau de ligações cruzadas (ligações dissulfeto), pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, resultando em material com características de conformação rígida e tenaz, o que lhes confere resistência à degradação por proteínas comuns (ONIFADE, 1998; PARRY; NORTH, 1998; KRELPLAK et al., 2004).

As queratinas são classificadas em “leves” e “rígidas” devido às ligações dissulfeto. As queratinas “leves” apresentam baixo teor de cisteína e são constituídas por uma longa cadeia de polipeptídios, que alternam resíduos de glicina, alanina e serina. As queratinas “rígidas” por sua vez são constituídas por um alto teor de cisteína e por ligações dissulfeto (SAID; PIETRO, 2004). As queratinas “rígidas” presentes nos pêlos, lã e unhas apresentam entre 10,5-17% de cisteína, enquanto a queratina das penas apresentam 4,2 a 7,6% de cisteína (FRASER; PARRY, 2008; BRANDELLI et al., 2010).

### 3.3. MICRO-ORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS

Os micro-organismos queratinolíticos são os principais responsáveis pela reciclagem da queratina, desempenhando importante papel para evitar acúmulo da queratina na natureza. Estes micro-organismos produzem enzimas denominadas queratinases que são capazes de degradar substratos queratinosos mais eficiente do que outras enzimas, incluindo a biodegradação de resíduos queratinolíticos em alimentos e fertilizantes (GUPTA; RAMNANI, 2006; BRANDELLI et al., 2010).

Queratinases tem sido produzidas por um número significativo de micro-organismos, isolados de solo (BRANDELLI et al., 2010; BACH et al., 2011), fezes de

animais (YU et al., 2011) e de indústrias avícolas (TAPIA; SIMÕES, 2008; FAKHFKH et al., 2010). Desta forma, fica evidente a presença desses micro-organismos em diversas condições ecológicas, indicando a participação dos mesmos no ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre das moléculas de queratina (BRANDELLI et al., 2010).

O interesse inicial em fungos surgiu da importância médica e veterinária de representantes dos dermatófitos, como *Microsporum* e *Trichophyton* (FILIPELLO et al., 2000), embora estudos relatem potencial patogênico destes fungos (BLYSKAL, 2009). Entre os fungos não dermatófitos, destacam-se enzimas produzidas por *Scopulariopsis brevicaulis* (ANBU et al., 2007) *Aspergillus* spp (FARAG; HASSAN, 2004), *A. carbonarius* (SALES et al., 2008) e *A. flavipes* (EL-AYOUTY, 2012).

Estudo realizado com mais de 300 espécies de fungos demonstraram ser produtores de queratinases, sendo os fungos mais ativos dos gêneros *Fusarium*, *Acremonium* e *Geotrichum*. Quando em cultura submersa, *Aspergillus flavus* foi o melhor produtor de queratinase extracelular, seguido por *Alternaria radicina* e *Trichurus spiralis* (FRIEDRICH et al., 1999).

Grande parte das bactérias queratinolíticas descritas relaciona-se ao gênero *Bacillus* spp, que são os mais abundantemente estudados quando se refere à degradação de penas (GUPTA; RAMMANI, 2006). Espécies desse gênero possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (JOO; CHANG, 2005). Diversas cepas de *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* são descritas como queratinolíticas (ZHANG et al., 2009; ZAGHLOUL et al., 2011); *B. pumilus* (FAKHFAKH et al., 2010).

Vários estudos têm sido realizados com intenção de isolar micro-organismos queratinolíticos e estudar as melhores condições para produção da enzima queratinase, devido ao fato desta poder ser empregada na indústria de processamento do couro, produção de medicamentos, além de poder ser utilizada para degradação das penas descartadas pela indústria. O uso de micro-organismos utilizando diferentes tipos de resíduos para produção da enzima queratinases, pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1.** Micro-organismos produtores de queratinases a partir de resíduos agroindustriais.

<b>Micro-organismos</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referências</b>
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL-447	Penas de galinha	Ali et al., 2011
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	Pêlo de vaca, unha de porco, chifre	Dozie et al., 1994
<i>Microsporium gypseum</i>	Unha humana	Raju et al., 2007
<i>Trichophyton rubrum</i>	Unha humana	Lai et al., 2010
<i>Trichophyton sp</i>	Pena de galinha	Anbu et al., 2008
<i>Trichurus spiralis</i>	Pena de galinha	Friedrich et al., 1999
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD-1.	Pena de galinha	Zaghloul et al., 2011
<i>Chryseobacterium sp</i>	Pena de galinha	Silveira et al, 2009
<i>Streptomyces sp</i>	Pena de galinha	Jaouadi et al., 2010
<i>Streptomyces fradiae</i>	Lã de ovelha, pena, chifre	Noval; Nickerson, 1958
<i>Streptomyces gulbargensis</i>	Unhas, cabelo, pena de galinha	El-Sayed , 2009
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Cabelo, unha, pena de galinha	Chitte et al., 1999

### 3.4. RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Os três maiores produtores de carne de frango do mundo são: Estados Unidos, China e Brasil, produziram respectivamente 16,63; 13,00 e 11,75 milhões de toneladas de carne de frango em 2011, sendo o Brasil atualmente o maior exportador, de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2012).

Pêlos e penas são os principais resíduos queratinosos produzidos por atividades agroindustriais (BRANDELLI, 2008). Estes resíduos são usualmente incinerados, um processo que, além do seu alto custo, apresenta desvantagens ecológicas devido às elevadas emissões de CO<sub>2</sub>, quanto de desperdício de energia (MARCONDES et al., 2008, MATSUI et al., 2009).

A indústria avícola enfrenta o desafio de produzir produtos de alta qualidade, de uma forma que satisfaça as expectativas dos consumidores, das regulamentações ambientais, e ainda que maximize os lucros (FREEMAN et al., 2009). As penas acumuladas provenientes do abate das galinhas para consumo humano representam um grande desperdício e impacto ambiental, sendo sua reciclagem objetivo de interesse na



área de nutrição animal devido ao baixo custo de obtenção e grande potencial como fonte alternativa de proteínas para ração animal (ONIFADE, 1998).

### 3.5. FERMENTAÇÃO UTILIZANDO RESÍDUOS

Uma das formas de diminuir o acúmulo das penas provenientes do abate das galinhas e reaproveitá-las é utilizando processos de fermentação submersa. A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual se utiliza um meio fermentativo líquido onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis ou insolúveis. Este processo é o mais empregado para a produção de enzimas devido à facilidade dos micro-organismos de crescerem em condições controladas de pH e temperatura (PINHEIRO et al, 2008).

A produção de enzimas pode ser realizada em diferentes sistemas, escala laboratorial em frascos agitados e agitadores de bancada, como em escala industrial, em biorreatores (KOKARE et al., 2009).

Segundo Sanroman; Couto (2006), que descreveram os processos de fermentação submersa em um artigo de revisão e observaram que este processo apresenta relativa facilidade de cultivo em grande escala, visto que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido no processo, principalmente se monitorados por sensores adequados.

Para a produção de queratinases extracelular pelo fungo *Trichophyton* sp em fermentação submersa, Anbu et al. (2007) utilizaram como meio basal penas de galinha, suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, galactose e manitol) e nitrogênio. O fungo produziu enzimas queratinolíticas com atividade de 6,2 U/mL após cinco semanas de fermentação. A produção da enzima foi inibida na presença de concentrações elevadas de nitrogênio.

Para a produção de enzimas queratinolíticas Agrahari & Wadhwa (2010) realizaram através de cultivo submerso a produção de queratinases por *Bacillus megaterium*, *B. thuringensis* e *B. pumilis*, sendo utilizados diferentes meios, compostos por penas de galinhas, sais e diferentes fontes de carbono e nitrogênio (glicose, extrato de levedura e peptona), bem como apenas penas de galinha e sais. Após 5 dias de fermentação o ensaio em que apresentou maior atividade queratinolítica de 1,2 U/mL foi no meio composto apenas de sais e penas de galinha. A presença de outras fontes de

carbono não influenciou na produção da enzima, tendo a pena de galinha como único indutor.

Mecanismo de repressão catabólica parece estar relacionado ao controle de produção de proteases/queratinases, uma vez que glicose e outros monossacarídeos e dissacarídeos (frutose, maltose, sacarose), bem como fontes orgânicas de nitrogênio facilmente assimiláveis (peptona, aminoácidos) podem atuar na inibição da produção de queratinases (BRANDELLI et al., 2010).

### 3.6. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Muitas vezes durante o processo fermentativo são gerados juntamente com as enzimas compostos indesejados, impedindo seu uso nos processos industriais. O desenvolvimento de métodos para a separação e purificação de proteínas tem sido um importante pré-requisito para muitos dos avanços da indústria de biotecnologia (MALPIEDI et al., 2009).

Os métodos convencionais de purificação de biomoléculas envolvem várias etapas de operações unitárias (diálise, cromatografia), elevam os custos operacionais de tratamento em até 70%, além da perda de uma parte da biomolécula-alvo durante o processo (RAJA et al., 2011).

Extração líquido-líquido utilizando sistema de duas fases aquosas é um método de separação que consiste em duas fases aquosas, com aplicação no campo da biotecnologia, e apresenta baixos custos, um elevado grau de separação e purificação de materiais biológicos, tais como, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, vírus, anticorpos e organelas celulares (NERLI et al., 2009). Os SDFAs por apresentarem um elevado teor de água, em ambas as fases e tensão interfacial baixa, podem proporcionar um ambiente biocompatível para os materiais biológicos e seu desempenho pode ser controlado e otimizado através da variação condições de solução de sais e polímeros, e favorecendo a partição da proteína desejável para uma das fases do sistema (MALPIEDI et al., 2009).

O primeiro pesquisador a detectar e relatar a formação de sistema de duas fases, em que o principal constituinte de ambas as fases é a água foi Beijerinck, que em 1986, ao misturar soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, em uma dada faixa de temperatura e concentração, observou a formação de misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases (ALBERTSSON et al., 1986). No

entanto, o método de separação utilizando sistema de duas fases aquosas foi primeiramente observado por Albertsson, em 1958, que utilizou soluções aquosas de polietileno glicol/ dextrana para a separação de diferentes biomoléculas (OLIVEIRA et al., 2003).

Esses sistemas podem ser formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrofílicos (Polietileno glicol (PEG)/Dextrana) ou pela adição de um polímero e um sal (PEG/(fosfatos/citratos/sulfatos)). A distinção entre os dois tipos é feita de acordo com as substâncias a serem purificadas e também de acordo com as necessidades operacionais. Sistemas formados por polímeros/sal tendem a serem menos viscosos, facilitando a separação das fases, enquanto os demais podem ser aplicados a determinadas substâncias que não toleram a presença de sais em concentrações elevadas, que por sua vez apresentam também maiores dificuldades quanto à reciclagem ou descarte (ELIAS-FILHO, 2010).

Uma ênfase maior dos estudos é dada aos sistemas formados por PEG/sal por apresentarem baixo custo (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2008). Para fins industriais, polímero/sistemas de fosfato são os mais comumente utilizados, mas a elevada concentração de sal requerida representa um problema de eliminação de resíduos que leva a preocupações de ordem ambiental (MALPIEDI et al., 2009).

Alguns pesquisadores investigaram a utilização do citrato como um substituto para os fosfatos e descobriram que ocorria a formação de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. O citrato é biodegradável e não tóxico, podendo ser despejados em estações de tratamento de água (NERLI et al., 2009; SELVAKUMAR et al., 2010; PORTO et al., 2011; HERCULANO et al., 2012).

A separação das fases ocorre acima das concentrações termodinâmicas críticas desses componentes. Quando essas concentrações excedem a determinado valor, há a formação das duas fases aquosas, formando um meio capaz de manter a atividade biológica de macromoléculas, para posterior partição (ALBERTSSON, 1986; RAJA et al., 2011).

### **3.6.1 Fatores que influenciam o comportamento das fases**

A partição em sistemas de duas fases aquosas depende não só das propriedades de superfície (tais como o tamanho da carga e hidrofobicidade) da enzima, mas também sobre as características físico-químicas das duas fases. A natureza do sistema é influenciada por fatores tais como polímeros, massa molar dos polímeros e sua

concentração, o tipo de sal e a sua concentração, pH, força iônica e temperatura (PERICIN et al., 2009).

### 3.6.1.1 Massa molar e concentração do polímero

A massa molar do polímero influencia na separação das proteínas por alteração do diagrama da composição das fases e por mudança no número de interações polímero-proteína. Quanto maior for a massa molar dos polímeros, mais baixa é a concentração de polímero necessária para a separação de fases. Com o aumento da concentração de polímero, as diferenças de densidade e viscosidade aumentam entre as fases (ALBERTSSON, 1986).

No sistema PEG/sal, a partição de biomoléculas é governada pelo efeito volume de exclusão (fase rica em polímero) e *salting-out* (fase rica em sal). Os sistemas com elevada concentração de polímero ou de massa molar elevada e alta concentração de sal vai resultar na separação de biomoléculas entre as fases, devido à influência de ambos, o volume de exclusão e o efeito *salting-out* (BABU et al., 2008).

Em sistemas PEG/sal, o aumento do K pode ser devido as seguintes condições:

- Se a massa molar do PEG for baixa, a tensão interfacial é mais baixa entre as duas fases, o que aumenta K (YUAN-LING et al., 2010).
- Se a concentração de sal é elevada, a força iônica aumenta na fase inferior, levando ao aumento da partição das biomoléculas para a fase superior.
- Se a concentração de PEG é alta, o número de unidades de polímero envolvidos no particionamento da biomolécula também aumenta, portanto, mais biomoléculas particionarão para a fase de PEG, devido à interação hidrófoba entre a biomolécula e o PEG (TELLO et al., 1994).

### 3.6.1.2 Adição de sais

A presença de sais mesmo em concentrações milimolares no SDFa pode alterar o diagrama de fases fortemente, a concentração salina influencia a partição de materiais carregados eletricamente. O coeficiente de partição se altera devido à distribuição diferencial dos íons de sal entre as fases, a adição de sal contém íons com hidrofobicidades diferentes, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados. O efeito de

*salting-out* obriga as biomoléculas a particionarem da fase rica em sal para a fase rica em PEG (SARUBBO et al.; 2000; ZAFARANI-MOATTAR et al., 2005).

### 3.6.1.3 Alteração do pH

O pH do sistema afeta o particionamento porque pode alterar a carga do soluto, ou pode alterar a proporção das moléculas carregadas. O comportamento das proteínas depende do ponto isoelétrico (pI), que corresponde ao valor de pH em que a molécula se encontra eletricamente neutra, ou seja, o número de cargas positivas é igual ao número de cargas negativas (SALES, et al 2007). A carga líquida da proteína depende do pH, se é maior do que o pI (negativo), menor do que pI (positivo), ou igual a pI (zero). Vários pesquisadores relataram que com o pH mais elevado, a biomolécula carregada negativamente particiona preferencialmente para a fase superior do sistema e aumenta o coeficiente de partição, pode ser devido às interações eletrostáticas entre a biomolécula e as unidades de PEG (MAYOLA-DELOISA et al., 2009).

## 3.7 FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

A otimização dos processos biotecnológicos de produção é um tema de grande importância. Em processos fermentativos, qualquer melhoria alcançada na produtividade através da manipulação dos parâmetros físico-químicos, nutricionais e tecnológicos pode alterar significativamente o rendimento do produto de interesse. Esta otimização pode ser conseguida, por exemplo, através do desenvolvimento de novos métodos biotecnológicos (REDDY et al., 2008), como a fermentação extrativa.

A fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas pode representar uma solução tecnológica para a recuperação *in situ* do produto para superar a inibição do produto final e a baixa produção volumétrica que geralmente ocorre em bioprocessos (MARQUES et al., 2009).

Além disso, a fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) provaram ser uma alternativa promissora para os processos de fermentação convencionais para a produção e purificação simultânea de biomolécula. A fermentação extrativa utilizando SDFA permite combinar fermentação e processos de purificação num só passo (CANALES et al., 2009).

SDFA é um meio não desnaturante para o biomaterial de separação, além disso, sistema de duas fases aquosas mostra excelente biocompatibilidade para enzimas e células microbianas, e é considerado como um sistema leve para a fermentação extrativa, bem como reação biocatalítica (MORENO-CID et al., 2013). Nos processos de fermentação e biocatálise, utilizando SDFA como sistema de reação, a bioconversão pode ser convenientemente combinada com a separação de diferentes produtos, tais como a produção enzimática do antibiótico cefalexina (CANALES, 2009), de fermentação e extração de enzimas como a quitinase (AZEVEDO et al., 2009), endoglucanase (SINHA et al., 2000) e protease com atividade fibrinolítica (ASHIPALA e HE, 2008).

Apesar da importância das técnicas de sistema de duas fases aquosas para o futuro das tecnologias de separação de biomoléculas, é necessário mais estudos para entender melhor as interações básicas moleculares da partição da proteína.

#### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGRAHARI, S; WADHWA,N. Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at ghazipur poultry processing plant. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 482-489, 2010.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules** Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986.

ALI, T. H.; NADIA H.; ALI, N. H.;MOHAMED, L. A. Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447 **Journal of applied environmental sciences sanitation**, v.6, p. 123-136, 2011.

ANBU A,B.; , AZARIAH HILDA A.; HWAL-WON SUR B.; BYUNG-KI HUR B, S.; JAYANTHI B. Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil Periasamy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 287–292, 2008.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1298-1303, 2007.

ASHIPALA, O.K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource Technology**, v.99, p. 4112-4119, 2008.

ASTBURY, W.T.; BEIGHTON, E. Structure of feather keratin. **Nature**, v.191, 171-173, 1961.

AZEVEDO, A.M.; GOMES, A.G.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F; PISCO, A.M.M.O.; AIRES - BARROS M.R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol citrate aqueous two-phases system **Purification Technology**, v.65, p.14-21, 2009.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Process**, v.47, p.83-89, 2008.

BACH, E.; CANNAVAN, F.S.; DUARTE, F.R.S.; TAFFAREL, J.A.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p. 102-107, 2011.

BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The Merops database as a protease information system **Journal of Structural biology**, v.134, p. 95-102, 2001.

BENAVIDES J.; RITO-PALOMARES , M., Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p.133-142 , 2008.

BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.38, p.49–54, 2006.

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

BLYSKAL B. Fungi utilizing keratinous substrates. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p.631–653, 2009.

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: use of enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond **Food and Bioprocess Technology**, v.1, p.105-116, 2008.

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1735–1750, 2010.

BRESSOLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 111–211, 1999.

CANALES, M., BALLESTEROS, C., MORENO-CID, J.A., ESPINOSA, A.M. VILLAR, A.M., DE LA FUENTE, J. Extractive bioconversion to produce the *Aedes albopictus* akirin in an aqueous two-phase system supporting *Pichia pastoris* growth and protein secretion, **Biochemistry Engineering Journal**, v. 46, p.105–114, 2009.

CEDROLA, S.M.L.; MELO, A.C.N.; MAZOTTO, A.M.; LINS, U.; ZINGALI, R.B.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S.; VERMELHO, B. A.; Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.1259–1269, 2012.

CHITTE, R.R.; NALAWARE, V.K.; DEY, S. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p. 131-163, 1999.

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), 2011 Disponível em <<http://www.usdabrazil.org.br/home/>>. Acesso em: 05 set. 2012.

DEYDIER, E., GUILLET, R., SARDA, S., SHARROCK, P. Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material?” **Journal of Hazardous Material**, v. 121, p. 141 – 148, 2005.

DOZIE, I.N.S.; OKEKE, C.N.; UNAEZA, N.C. A thermostable alkalineactive keratonolytic proteiase from *Chrysosporium keratinophilum*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.563-567, 1994.

EL-AYOUTY, Y.M.; AMIRA EL-SAID, A.; SALAMA, A.M. Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes* **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2313-2319, 2012.



ELIAS- FILHO, S.M. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para Purificação de biomoléculas e simulação de sistemas Líquidos complexos **Ciência & Tecnologia** v. 1, n. 1, p. 33-41, 2010.

EL-SAYED, A.S.A. L-Methioninase production by *Aspergillus flavipes* under solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v.49, p. 331- 341, 2009.

FAKHFAKH-ZOURI,N., HADDAR,A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, W. Application of statistical experimental design of optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617-626, 2010.

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

FILIPELLO MARCHISIO, V.; KUSHWAHA, R.K.S.; GUARRO, J. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: (Eds. Biology of dermatophytes and their keratinophilic fungi) **Revista Iberoamericana de Micologia**, Bilbao, p. 86-92, 2000.

FRASER, R.; PARRY, D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Structural Biology**, v.162, p.1-13, 2008.

FREEMAN, S.R.; POORE, M.H.; MIDDLETON, T.F.; FERKET, P.R. Alternative methods for disposal of spent laying hens: evaluation of the efficacy of grinding, mechanical deboning, and of keratinase in the endering process. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4515-4520, 2009.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN D.; CHAUMONT. J.P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p.127-130, 1999.

GODFREY, T.; S.WEST. **Industrial enzymology**, 2. ed. New York: Macmillan Publishers Inc., 609 p, 1996.

GOUSTEROVA, A.; BRAIKOVA, D.; GOSHEV, I.; CHRISTOV, P.; TISHINOV. K; VASILEVA- TONKOVA, E.; HAERTLE, T.; NEDKOV, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p.5, 2005.

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

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MACIEL, M. H.C; MOREIRA, K. A.; SOUZA-Motta, C. M.; PORTO, A. L.F Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by *Aspergillus japonicus* URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system **Fluid Phase Equilibria**, v. 335,p.8–13, 2012.

IGNATOVA, G.Z.; GOUSTEROVA, A.; SPASSOV, G.; NODKOV, P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus* **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p. 217-222, 1999.

JAOUADI , B.; ABDELMALEK , B. ; FODIL , D.; FERRADJI , F. Z.; REKIK , H.; ZARAÏ , N.; BEJAR S. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents **Bioresource Technology**, v.101 , p.8361–8369, 2010.

JOO, H.S.; CHANG, C.S.; Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

JUSTYNA, B. ; TERESA, K.K; Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects **Waste Management** v.31, p. 1689–1701, 2011.

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p.539-550, 2000.

KEPKA, CECILIA. **Integration of Aqueous Two-Phase Systems into Recovery Processes for Biomolecules**, Dissertação Lund University, Sweden, 2004.

KIM J.D. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03 **Microbiology**, v.35,p. 219-225, 2007.

KOKARE, C.; CHAKRABORTY. S.; KHOPADE, A.; MAHADIK, K.; CHOPADE, B. isolation and characterization of novel -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1 **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 58, p.17–23, 2009.

KRELPAK, L.; DOUCET, J.; DUMA, P.; BRIKI, F. New aspects of the  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheets transition in stretched hard  $\alpha$ -keratin fibers. **Biophysics Journal**. v.87, p.640-647, 2004.

LAI, W.; CHEN, J.; LIU, L.; YIN, S.; CHEN,R.; LI, M.; YE, C.; ZHANG, Y. Substrate adaptation of *Trichophyton rubrum* secreted endoproteases. **Microbial Pathogenesis**, v.48, p. 57-61, 2010.

MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers, **Separation Purification Technology**, v. 65, p. 40-45, 2009.

MARCONDES, N.R.; TAIRA, C.L.; VANDRESEN, D.C.; SVISZINSKI, T.I.E; KADOWAKI, M.K.; PERALTA, R.M. New feather- degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**, v.56, p.13-17, 2008.

MARQUES, D.A.V.; TORRES,B.R.; PORTO,A.L.F.; PESSOA-JÚNIOR, A.; COVERTI,A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems, **Biochemical Engineering Journal**, v. 47. P. 122-126, 2009.

MATSUI, T.; YAMADA, Y.; MITSUYA, H.; SHIGERI, Y.; YOSHIDA.; SAITO, Y.; MATSUI, H.; WATANABE, K. Sustainable and practical degradation of intact chicken feathers by cultivating a newly isolated thermophilic *Miothermus ruber* H328. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, p. 941-950, 2009.

MAYOLA-DELOISA, K.; TREJO-HERÁNDEZ, M.R.; RITO-PALOMARES, M. Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems, **Process Biochemistry**, v 44, p. 435-439, 2009.

MORENO-CID, J.A; CANALES, M., FUENTE, J.; Production of recombinant *Aedes albopictus* akirin in *Pichia pastoris* using an aqueous two-phase semi continuous fermentation process **Biochemical Engineering Journal**, v.68, p 114– 119, 2012.

MUKHERJEE, A. K., RAI, S. K., BORDOLOI, N. K. Biodegradation of waste chicken-feathers by an alkaline b-keratinase (Mukartinase) purified from a mutant *Brevibacillus sp.* strain AS-S10-II **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, 1229 e 1237, 2011.

NAM, G.W. ; LEE, D.W.; LEE, H. S. ; LEE, N. J.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; HWANG, J.K.; SUHARTNOTO, N.M.T.; PYUN, Y.R. Native degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a new isolated Keratinase- producing thermophilic anaerobic. Indonésia, Archives of Microbiology, v. 178, n.6, p. 538-547, 2002

NERLI. B. B.; TUBIO, G.; PICÓ, G. A. Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems **Journal of Chromatograph B**, v. 877, p.115-120, 2009.

NOVAL, J.J.; NICKERSON, W.J. **Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*** Institute of Microbiology, Rutgers, The State University, New Brunswick, New Jersey, 1958.

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science**, v.84, p. 858-864, 2005.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. e PESSOA Jr., A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 108, p. 787-797, 2003.

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

PARRY, D.A, D.; NORTH, A.C.T. Hard  $\alpha$ -keratin intermediate filament chains: Substructure of the N-and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domain soft type I and type II chains. **Journal Structural Biology**, v.122, p. 67-75, 1998.

PERICIN, D. M; MADAREV-POPOVIC, S. V. RADULOVIC-POPOVIC, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology, **Biotechnology Letters**, v.31, p. 43–47, 2009.

PINHEIRO, T. L.F.; LIPKE, N. R.; KEMPKA, A. P.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, D. M.G. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.31, n. 2, p. 119-125, 2008.

PORTO, C.S.; PORTO, T.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L., PORTO, A.L.F.; Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design, **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 165-171, 2011.

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

RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V.; RAMESH, V. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review **Science and Technology**, v.1, p. 7-16, 2011.

RAJU, K.C., NEOGI, U., SAUMYA, R., GOUD, N.R. Studies on extra cellular enzyme keratinase from dermatophyte *Microsporium gypseum*. **International Journal Biological Chemistry**, v.1, p.174-178, 2007.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, p 597-635, 1998.

REDDY, L.V.A., WEE, Y., YUN, J., RYU, H. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2242-2249. 2008.

RIESSEN, S.; ANATRAKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. A novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**, v.5, p.399-408, 2001.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 413p, 2004.

SALES, L.L.M SOUZA, A.G.; BASTOS, SOLEDADE, E.B.; SANTOS, I.M.G.; NETO, J.B.R.; LONGO, E.; PASKOCIMAS, C.P. Influence of pH on the stability of alumina suspensions electrosterically stabilized **Química nova**, v. 30, n 1, 2007.

SALES, M. R.; CAVALCANTI, M.T.H.; FILHO, J. L.L; MOTTA, C.M.S.; PORTO, A.L.F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.43, p.285-288, 2008.

SANROMAN, M.A.; COUTO, S.R. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering** v,76, p.291-302, 2006.

SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; DUARTE, H.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; LIMA FILHO, J.L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. In aqueous two-phase system based on cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol). **Journal of Chromatography B**, v. 743, p.79-84, 2000.

SAWYER, R.H.; GLENN, T.; FRENCH, J.O.; MAYS, B.; SHAMES, R.B.; BARNES Jr., G.L.; RHODES, W.; ISHIKAWA, Y. The expression of beta ( $\beta$ ) Keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds. **American Zoologist**, v. 40, p. 530-539, 2000.

SELVAKUMAR, P.; CLING, T.; WALKERA, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS, **Separation and Purification Technology**, v. 75, p.323–331, 2010.

SINHA, J. ; DEY, P.K; PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei/ Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p. 163-175, 2000.

TAPIA, D.M. T.; SIMÕES, M. L. G. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater **African Journal of Biotechnology**, v. 7 , p. 296-300, 2008.

TELLO, P. G.; CAMACHO, F.; BLAZQUEZ, G. Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol. **Journal Chemical Engineering**, v. 39, p.611–614, 1994.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial, **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

WANG, J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v.15, p.544-550, 2006.

WANG, S.L.; HSU, W.T.; LIANG, T.W.; YEN, Y.H.; WANG, C.L. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium, **Bioresource Technology**, v.99, p. 5679-5686, 2008.

XIU ZHI-LONG; BO JIANG; ZHI-GANG LI; JIAN-YING DAI; DAI-JIA ZHANG; Aqueous two-phase extraction of 2,3-butanediol from fermentation broths using an ethanol/phosphate system. **Process Biochemistry**, v.44 p. 112–117, 2009.

YUAN-LING, L.; HUA-Li N.; SAI-NAN S.; BRANFORD-WHITE,C. ; LI-MIN Z.; Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology, **Separation and Purification Technology** v.73, p.343–348, 2010.

ZAGHLOUL T. I.; EMBABY A. M.; ELMAHDY, A. R.; Biodegradation of chicken feathers waste directed by *Bacillus subtilis* recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2387–2393, 2011.

ZARARANI-MOATTAR, M.T.; HAMZEZHARDEH, S. Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems of containing polyethylene glycol and sodium succinate or sodium formate, **Computer Coupling of Diagrams and Thermochemistry**, v.29, p. 1-6, 2005.

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

## CAPITULO I

### **Produção e purificação de queratinases produzidas por *Aspergillus* sp SIS11 utilizando sistemas de duas fases aquosas**

Patyanne Carvalho Correia, Catarina Michelle de Oliveira Ferreira, Camila Souza Porto, Galba Maria de Campos Takaki, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Artigo a ser submetido à Brazilian Journal of Microbiology



## RESUMO

Queratinases (EC 3.4.4.25) são enzimas pertencentes à classe de proteases que são capazes de hidrolisar a queratina insolúvel mais eficientemente quando comparadas a outras proteases. O presente trabalho teve como objetivos selecionar a capacidade de degradação de penas por cultivo submerso de 16 linhagens do gênero *Aspergillus* isolados do solo da Caatinga, bem como produzir e extrair enzimas queratinolíticas, utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) - Polietileno glicol (PEG)/citrato. Os fungos foram cultivados em meio submerso, utilizando como nutrientes sais e penas de galinha, e um planejamento fatorial  $2^2$  foi realizado para avaliar a influência da concentração de penas e do pH na atividade queratinolítica. Para purificação em SDFA de queratinases foi realizado um planejamento fatorial  $2^4$ , onde os parâmetros de extração estudados foram, massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração do citrato ( $C_{CIT}$ ) e pH. As respostas avaliadas foram coeficiente de partição, recuperação em atividade de queratinases e fator de purificação. A enzima produzida pelo *Aspergillus* sp SIS 11 demonstrou maior atividade queratinolítica dentre 16 diferentes linhagens testadas. A atividade queratinolítica máxima obtida foi de 7,65 U/mL, em pH 9,0 e menor concentração de pena, 0,5% (p/v). Os melhores resultados foram obtidos na purificação da enzima utilizando SDFA, no sistema composto por  $M_{PEG}$  400 (g/mol),  $C_{PEG}$  (20%) e  $C_{CIT}$  (20%) e pH 8,0, apresentando coeficiente de partição de 0,74, recuperação da enzima de 503,6% e fator de purificação 7,41. A purificação das enzimas produzidas pelo *Aspergillus* SIS 11 utilizando sistema de duas fases aquosas apresentou-se promissora para uso em processos biotecnológicos que envolvem a hidrólise de resíduos agroindustriais.

**Palavras-Chave:** queratinases, purificação, SDFA, PEG/Citrato



## ABSTRACT

Keratinase (EC 3.4.4.25) are a particular class of proteases enzymes that display the capability of degrading insoluble keratin substrates more efficiently as compared to other proteases. The present study was aimed to select the capacity biodegradation of chicken-feathers by submerged fermentation process from 16 strains of *Aspergillus* isolated from soil of Caatinga, as well to produce and extract keratinolytic enzymes using aqueous two-phase systems (ATPS) - Polyethylene glycol (PEG) / citrate. Fungus were cultivated by submerged fermentation, using salts and chicken- feathers as nutrient, and factorial design ( $2^2$ ) was carried to evaluate the influence of the concentration feathers and pH in keratinolytic activity. A two-level of factorial design ( $2^4$ ) using ATPS for purification of keratinase was carried out, where the extraction parameters were studied, namely molar mass of PEG ( $M_{\text{PEG}}$ ), concentration of PEG ( $C_{\text{PEG}}$ ), concentration of citrate ( $C_{\text{CIT}}$ ) and pH. The partition coefficient, recovery in activity and keratinase purification factor were the responses evaluated. The enzyme produced by *Aspergillus* sp SIS 11 showed highest keratinolytic activity (7.65 U / mL) among sixteen different strains tested and was obtained with pH 9.0 and lower concentration of chicken-feathers, 0.5% (w / w). The optimum conditions were determined to purification enzyme using ATPS as  $M_{\text{PEG}}$  400 (g / mol)  $C_{\text{PEG}}$  (20%) and  $C_{\text{CIT}}$  (20%) at pH 8.0, with partition coefficient of 0.74, enzyme recovery of 503.6% and a purification factor of 7.41. The purification of keratinolytic enzymes produced by *Aspergillus* SIS 11 using aqueous two-phases system had promise for use in biotechnological processes involving the hydrolysis of agroindustrial waste.

**Keywords:** keratinases, PEG/Citrate, Purification, ATPS

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento na produção de carne de frango em todo o mundo resultou na geração de milhões de toneladas de resíduos de penas de galinha (VASILEVA-TONKOVA et al., 2009). Queratina é uma proteína insolúvel de difícil degradação e a pena das aves apresenta 90% deste resíduo queratinoso. A elevada resistência destes resíduos dificulta enormemente sua utilização no estado nativo como ração para animais, a menos que sejam submetidas a tratamentos físico-químicos, mas esses processos são de alto custo e necessitam de energia intensiva para a conclusão do processo, além do produto resultante ter um baixo valor nutricional e ser pobre em aminoácidos essenciais (BRANDELLI et al., 2010)

São relatados o isolamento e a purificação de enzimas queratinolíticas produzidas por bactérias e em menor quantidade por fungos. Estas enzimas exibem uma grande capacidade de hidrolisar resíduos queratinosos de forma eficiente (MAZOTTO et al., 2010; XIE et al., 2010).

Métodos tradicionais para purificar biomoléculas produzidas por fermentação convencional envolvem muitos passos, tais como diálises, cromatografia de troca iônica e de afinidade, entre outros (MAZZOLA et al., 2008). Um novo método de purificação e extração usando duas fases aquosas (SDFA) foi desenvolvido, baseia-se na utilização de dois polímeros (polietileno glicol (PEG)/dextrana) ou polímero/sal para a purificação. (SOUSA et al., 2009). A extração líquido-líquido tem sido amplamente aplicada na separação de biomoléculas, tais como proteínas e ácidos nucleicos devido à sua eficiência, baixo custo e versatilidade (BOERIS et al., 2009).

O objetivo desse trabalho foi selecionar dentre espécies de *Aspergillus* produtores de queratinases por cultivo submerso e purificar a enzima por sistema de duas fases aquosas utilizando planejamento fatorial.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas 16 linhagens de fungos do gênero *Aspergillus* provenientes do projeto Rede Norte Nordeste de fungos filamentosos de solos da Caatinga e da Amazônia (RENNORFUN/ SISBIOTA). As linhagens foram mantidas em meio ágar Czapek (PITT, 1988) e repicadas a cada 30 dias.

### 2.2 SELEÇÃO DE FUNGOS QUERATINOLÍTICOS POR CULTIVO SUBMERSO

Para seleção do melhor fungo produtor de queratinase, foram utilizadas linhagens de *Aspergillus* spp. Uma solução de esporos foi preparada utilizando solução salina 0,15M e Tween 80 (1%), mantida durante 7 dias em BOD para em seguida realizar uma suspensão para obter a concentração final de  $10^4$  esporos/mL. Foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo composto por (g/L)  $\text{CaCl}_2$  – 0,025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5), concentração de pena (0,5% p/v) pH 7,8 (ANBU et al., 2007), e cultivados em agitador orbital (SARTORIUS - CERTOMAT BS-1) durante 9 dias, 120 rpm a 30°C. Alíquotas do meio fermentado foram coletadas com 3, 7 e 9 dias de cultivo. As amostras fermentadas foram centrifugadas a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto para determinação da atividade queratinolítica.

### 2.3 PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR CULTIVO SUBMERSO

Para a produção de queratinases foi realizado um planejamento  $2^2$  onde foram avaliados parâmetros do meio de cultura, sendo eles o valor de pH (7,0; 8,0 e 9,0) e concentrações de penas de galinha (0,5%, 1,0% e 1,5% p/v). O cultivo submerso foi realizado durante 6 dias e alíquotas foram retiradas do meio fermentado a cada 24 horas para análise de atividade queratinolítica.

### 2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA

Para a determinação da atividade queratinolítica, foi utilizado o método descrito por Anbu et al., (2007). Para a reação foram utilizados tubos cônicos com capacidade para 15 mL, contendo 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, 20 mg de pena de galinha tratada (WAWRZKIEWICZ et al., 1987) e 3,8 mL de solução tampão TRIS-HCL (0,1M, pH 7,8). O conteúdo foi misturado por inversão e incubado a 37°C durante 1 hora em banho-maria, com leve agitação a cada 10 minutos. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em banho de gelo por 10 minutos, a absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotometria a 280 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo definido uma unidade da atividade enzimática, com aumento do valor da absorbância de 0,1, nas condições experimentais acima descritas (a atividade foi expressa em U/mL).

## 2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a determinação do conteúdo proteico foi utilizado o método de Bradford (1976), a curva padrão foi realizada com albumina bovina sérica. Todas as determinações analíticas foram realizadas em duplicata e controles adequados foram utilizados, para diminuição da interferência dos componentes do processo, nos métodos analíticos.

## 2.6 PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)

Com as melhores condições de cultivo determinadas, foi realizado um sistema de duas fases aquosas para extração das queratinases. O sistema foi inicialmente preparado utilizando tubos graduados de 15 ml, solução concentrada de citrato a 30% (m/m) e PEG a 50% (m/m), e água foi adicionada para um sistema com peso total de 5g, extrato bruto representou 20% e foi adicionado ao sistema. Após a agitação em vórtex por 1 minuto, as duas fases foram separadas por decantação durante 60 minutos. Em seguida, alíquotas foram retiradas para realização da atividade enzimática e teor de proteínas totais.

## 2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES

A influência das variáveis, massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração de citrato ( $C_{CIT}$ ) e pH, sobre as três variáveis resposta selecionadas, coeficiente de partição ( $K$ ), recuperação em atividade ( $Y\%$ ) e fator de purificação ( $FP$ ), foram avaliados de acordo com os resultados obtidos com o planejamento fatorial  $2^4$  contendo 16 ensaios e 4 pontos centrais (Tabela 1), para permitir a estimativa do erro puro experimental.

**Tabela 1.** Níveis das variáveis utilizadas no planejamento  $2^4$  para extração de queratinases em SDFA.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
<b>Massa molar do PEG</b> (g/mol)	400	3350	8000
<b>Concentração do PEG</b> (%m/m)	15	17,5	20
<b>Concentração de Citrato</b>	20	22	24

(%m/m)			
pH	6	7	8

---

## 2.8 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SDFA

O coeficiente de partição da enzima é definido como a relação entre a atividade volumétrica na fase superior ( $A_t$ ) e na fase inferior ( $A_b$ ):

$$K = \frac{A_t}{A_b}$$

A recuperação em atividade foi determinada como a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato inicial e expressa em percentagem (%):

$$Y = \left( \frac{A_t \cdot V_t}{A_i \cdot V_i} \right) \times 100$$

onde  $V_t$  e  $V_i$  são os volumes da fase superior e do extrato inicial, respectivamente.

O fator de purificação foi calculado pela relação entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato bruto antes da partição ( $A_i$ ):

$$PF = \frac{A_t / C_t}{A_i / C_i}$$

onde  $C_t$  e  $C_i$  são as concentrações totais de proteínas, expressas em  $\mu\text{g/mL}$ , na fase superior e no extrato inicial, respectivamente.

Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados utilizando software *Statistica* 8.1 (Statsoft Inc, 2008).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 SELEÇÃO DE FUNGOS QUERATINOLÍTICOS

Foram realizados experimentos para avaliar as linhagens de *Aspergillus* spp com potencial para degradar as penas de galinha. Foi verificado através de fermentação em cultivo submerso e teve como critério de seleção os maiores valores de atividade

queratinolítica em menor tempo de produção. Os resultados da seleção dos fungos queratinolíticos estão apresentados na Tabela 2.

Das 16 linhagens testadas, 37% apresentaram degradação parcial ou total das penas e maiores atividades queratinolíticas com 3 dias de fermentação, 18% das linhagens atingiram maior valor em atividade enzimática com 7 dias de fermentação e 25% dos fungos a maior atividade das enzimas foi detectada após 9 dias de fermentação.

Pode-se observar que a maior atividade queratinolítica foi obtida no meio de cultivo inoculado com a linhagem *Aspergillus* sp SIS 11, apresentando esta no menor tempo de fermentação, ou seja, com 3 dias de cultivo e valor de atividade foi de 6,3 U/mL.

**Tabela 2.** Seleção de enzimas queratinolíticas por *Aspergillus* spp em fermentação submersa com penas de galinha. Atividades queratinolíticas expressas em U/mL.

Linhagens	Fermentação		
	3 dias	7 dias	10 dias
<b>1-<i>Aspergillus</i> sp SIS 3</b>	-	6,8	3,5
<b>2-<i>Aspergillus</i> sp SIS 4</b>	5,6	0,3	-
<b>3-<i>Aspergillus</i> sp SIS 5</b>	-	-	2,4
<b>4-<i>Aspergillus</i> sp SIS 6</b>	3,9	0,8	3,4
<b>5-<i>Aspergillus</i> sp SIS 7</b>	1,2	-	0,2
<b>6-<i>Aspergillus</i> sp SIS 8</b>	4,4	6,8	2,1
<b>7-<i>Aspergillus</i> sp SIS 9</b>	-	3,3	-
<b>8-<i>Aspergillus</i> sp SIS 11</b>	6,3	3,8	-
<b>9-<i>Aspergillus</i> sp SIS 12</b>	5,0	-	-
<b>10-<i>Aspergillus</i> sp SIS13</b>	-	-	4,9
<b>11-<i>Aspergillus</i> sp SIS 14</b>	0,2	0,5	0,6
<b>12-<i>Aspergillus</i> sp SIS 15</b>	1,6	5,9	5,9
<b>13-<i>Aspergillus</i> sp SIS 16</b>	0,5	-	4,8
<b>14-<i>Aspergillus</i> sp SIS 18</b>	-	-	0,3
<b>15-<i>Aspergillus</i> sp SIS 22</b>	-	0,6	8,7
<b>16-<i>Aspergillus</i> sp SIS 25</b>	4,1	2,2	-

- não apresentou atividade queratinolítica

### 3.2 PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR *ASPERGILLUS* sp SIS 11

Com a linhagem selecionada foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ , no qual foram avaliados os parâmetros do meio de fermentação (concentração de pena e pH). Os resultados obtidos pelo planejamento estão apresentados na Tabela 3, onde foi possível observar que a atividade queratinolítica variou entre 0,29 e 7,65 U/mL, sendo os maiores valores obtidos nos ensaios 1 e 3 em que o meio de fermentação apresentava concentração de pena a 0,5% (p/v), nos pHs 7,0 e 9,0 respectivamente.

Alguns ensaios apresentaram um desvio de linearidade durante a fermentação, onde vários fatores podem ter influenciado este comportamento, tais como: amostra não homogênea e conseqüentemente variações no conteúdo de enzimas nas alíquotas retiradas da fermentação. Estas diferenças podem ter ocorrido devido à dificuldade da retirada de uma amostra homogênea por conta da quantidade de pena presente no meio de cultivo, o que dificultou a retirada das amostras.

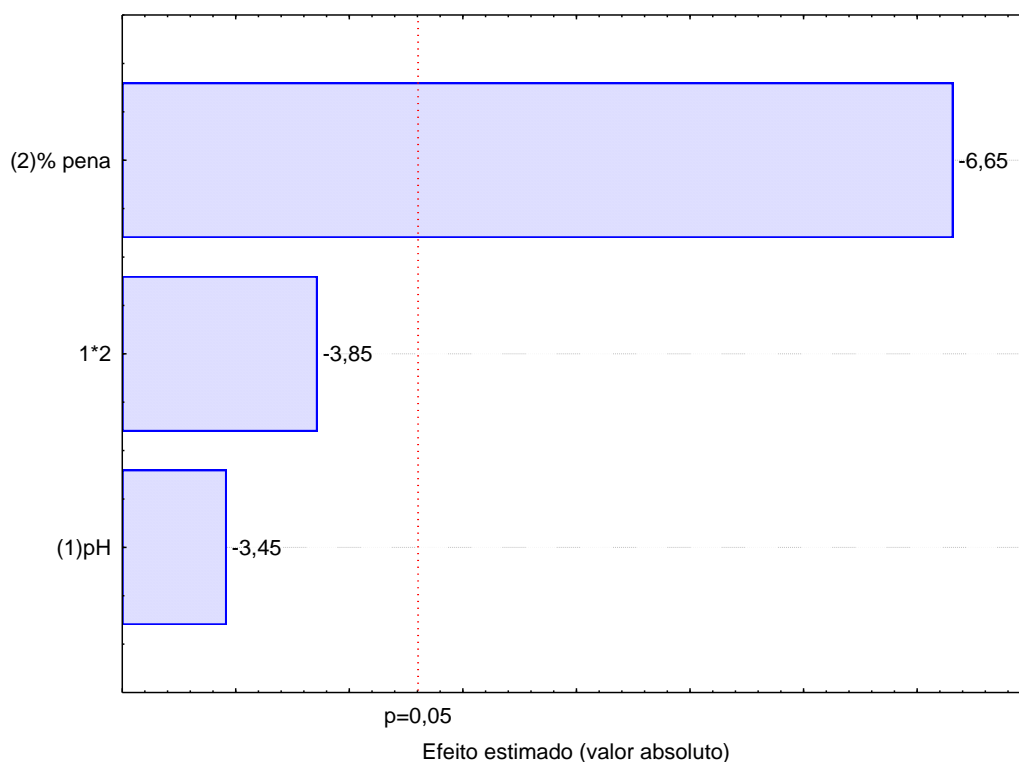
**Tabela 3.** Matriz do planejamento fatorial para produção de queratinases por *Aspergillus* sp SIS 11, tendo como resposta a atividade queratinolítica em U/mL

Ensaio	pH	Pena %	Tempo de Fermentação					
			24h	48h	72h	96h	120h	144h
1	7	0,5	1,05	3,02	3,95	7,40	6,70	0,32
2	7	1,5	3,90	3,70	0,97	5,65	2,87	3,52
3	9	0,5	3,95	4,90	3,82	7,65	3,57	3,57
4	9	1,5	3,90	4,15	4,50	1,07	3,77	1,05
5	8	1	0,47	4,62	1,97	6,07	5,27	-
6	8	1	3,87	4,67	0,62	2,2	2,20	0,75
7	8	1	4,35	4,70	0,95	6,17	4,80	-
8	8	1	2,72	5,20	0,29	5,40	3,05	-

Observa-se também na Tabela 3, que após a maior atividade queratinolítica ser atingida com 96 horas, houve queda na produção enzimática em quase todos os ensaios. Isto pode ser explicado pelo fato de que durante um processo fermentativo pode ocorrer variação quanto à concentração de biomassa, produção de enzima, concentração de substratos e concentração de metabólitos, que são produzidos pelo micro-organismo durante sua adaptação ao meio de cultura, assim como as variações de temperatura, oxigenação e nutrientes presentes no meio de cultivo (CORTEZI et al., 2008).

Para que ocorra aumento de biomassa, é necessário que haja nutrientes disponíveis, com o decorrer da fermentação ocorre diminuição na concentração destes nutrientes já que o micro-organismo os utiliza como fonte de carbono e nitrogênio, saindo da fase exponencial, entrando assim na fase estacionária e conseqüentemente de declínio. O mesmo pode ser relatado para explicar a diminuição na produção da enzima, já que as penas são indutoras para que a enzima queratinase seja produzida. Outro fator pode ser o acúmulo de metabólitos no meio de cultura, ocasionando toxicidade no meio, fator que pode proporcionar morte celular (CORTEZI, 2009).

No Diagrama de Pareto (Figura 1) observa-se a influência das variáveis independentes para a produção de enzimas queratinolíticas, onde o único efeito estatisticamente significativo e negativo foi à concentração de pena, demonstrando que o menor nível estudado (0,5% p/v) foi melhor para a produção da enzima. As barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95%.







**Figura 1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais e interações da concentração de pena e variação de pH.



O efeito positivo das enzimas queratinolíticas produzidas no meio de sais e concentração de pena 0,5% (p/v) durante o período de fermentação pode ser constatado na Tabela 4, em que pode ser visualizada a degradação das penas no decorrer do tempo.

**Tabela 4.** Visualização da degradação das penas presentes no meio de por *Aspergillus* sp SIS 11 por fermentação submersa.

Desempenho na degradação de Penas				
Tempo de fermentação (horas)	24	48	72	96
Atividade queratinolítica (U/mL)	3,95	4,97	3,82	7,65
Imagens				

Resultados de produção de queratinases por *Aspergillus* foram relatados em estudos recentes. Queratinases produzidas por *A. flavipes* e purificadas apresentaram maior atividade (11,5 U/mL) quando o meio de fermentação em estado sólido foi em pH 7,0 e 5g de pena de galinha (EL-AYOUTY, 2012). Sharma et al. (2011) em estudos utilizando *Aspergillus terreus*, apresentou maior atividade de degradação da queratina em pH 8,0 e contendo inicialmente 50 mg de pêlo animal inicialmente e após 3 semanas de incubação, ainda apresentava 41 mg de pêlo. A atividade da queratinase produzida por *A. oryzae* NRRL-447 foi observada em pH ótimo 7,0, e 1% de pena, com degradação total das penas no quinto dia de fermentação (ALI et al., 2011).

O melhor valor da atividade enzimática obtida no presente estudo foi de 7,65 U/mL, sendo superior aos encontrados na literatura, quando comparados à produção de queratinases por outros fungos. Anbu et al. (2007) avaliaram a produção de queratinases por *Scopulariopsis brevicaulis*, estudando a concentração de penas como substrato de 0,2 a 3,8% (p/v), o tempo de produção de 1 a 9 semanas, e mesma composição do meio de cultura utilizada nesse trabalho, mas com acréscimo de extrato de levedura. Após cinco semanas de cultivo, os autores obtiveram como melhor resultado para a atividade queratinolítica 6,2 U/ mL em presença de 1,5% (p/v) de substrato.

Atividade enzimática queratinolítica obtida por *A. carbonarius* após 7 dias de fermentação na presença de 0,5% (p/v) de penas de galinha foi de 48,5 U/mL (SALES et al., 2008), no entanto para calcular o valor de atividade, os autores consideraram aumento da absorvância de 0,01, porém quando determinada a 0,1 o valor da atividade

cai para 4,85 U/mL, sendo menor ao encontrado no presente trabalho. Nos demais trabalhos uma unidade da atividade queratinolítica é definida como o aumento de 0,1 unidades de absorvância por hora.

Enzimas queratinolíticas produzidas por outros micro-organismos também são relatados. Vem sendo verificada pela comunidade científica a partir de algumas bactérias a produção de enzimas queratinolíticas utilizando penas de galinha como substrato a apresentando atividade queratinolítica em ampla faixa de pH. Yu et al. (2011) utilizaram *Bacillus* sp isolado na indústria de aves e obtiveram atividade de 25 U/ml após 36h em meio de cultivo, composto por 1% de penas de galinha, sais e pH 7,0. Estudos realizados com três linhagens de bactérias, *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens* P3 mostraram atividade para degradação das penas após 7 dias de cultivo com 1% de pena em pH 7,0 (BACH et al., 2011).

Avaliando a capacidade de degradação de penas por *B. subtilis* SLC, Cedrola et al. (2012) verificaram atividade das enzimas em uma variação de pH de 2,0 a 12,0, sendo mais ativas em pH 10,0, 1% de pena de galinha e suplementado com extrato de levedura, obtendo atividade de 378 U/mL, para calcular o valor de atividade, os autores consideraram aumento da absorvância de 0,01. Sahoo et al. (2012) avaliando a produção de queratinases por *B. eihenstephanensis*, utilizaram penas de galinha a 1% com adição de nutrientes ao meio fermentado a temperatura de 40°C. Os autores obtiveram após 7 dias de processo a atividade de 6,52 U/mL. O valor de atividade queratinolítica obtido pelo referido autor foi inferior ao encontrado no presente estudo, em que a maior atividade da enzima foi obtida no 4º dia de fermentação, com 7,65 U/mL. Vale ressaltar ainda que fenômeno semelhante ocorreu durante o processo fermentativo, no qual o aumento da concentração de penas (de 1,5 % para 2%) diminuiu a produção de queratinases. A elevada concentração de penas pode ter causado inibição do substrato ou repressão da produção das enzimas.

### 3.3 Extração de queratinases em sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados do planejamento experimental  $2^4$  para avaliação da influência das variáveis, massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração do citrato ( $C_{CIT}$ ) e pH, sobre as três variáveis resposta: coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y%) e fator de purificação (FP).

**Tabela 5.** Resultados do planejamento fatorial  $2^4$  para extração de queratinases de *Aspergillus* sp SIS 11 na fase sal do Sistema de duas fases aquosas.

Ensaio	M <sub>PEG</sub> (g/mol)	C <sub>PEG</sub> (%m/m)	C <sub>CIT</sub> (% m/m)	pH	K	Y (%)	FP
1	400	20	15	6	-	-	-
2	8000	20	15	6	1,52	223,3	1,20
3	400	24	15	6	-	-	-
4	8000	24	15	6	0,35	388,2	2,28
5	400	20	20	6	1,04	352,5	5,96
6	8000	20	20	6	0,24	196,6	4,10
7	400	24	20	6	0,50	440,5	3,28
8	8000	24	20	6	0,66	201,4	2,02
9	400	20	15	8	-	-	-
10	8000	20	15	8	0,06	505,1	6,83
11	400	24	15	8	-	-	-
12	8000	24	15	8	0,38	396,8	2,00
13	400	20	20	8	0,74	503,6	7,41
14	8000	20	20	8	0,36	289,7	3,26
15	400	24	20	8	0,83	443,1	7,08
16	8000	24	20	8	0,13	440,9	4,78
17	3350	22	17,5	7	0,82	373,2	3,55
18	3350	22	17,5	7	0,43	371,7	3,68
19	3350	22	17,5	7	0,96	315,6	3,03
20	3350	22	17,5	7	0,92	187,1	2,08

M<sub>PEG</sub>- massa molar do PEG; C<sub>PEG</sub> concentração do PEG, C<sub>CIT</sub> concentração de citrato; K coeficiente de partição; Y recuperação em atividade e FP fator de purificação.

As diferenças nas concentrações da massa molar do PEG e concentração de citrato, entre os valores mínimos e máximos, não podem variar muito, pois corre o risco de vários pontos da matriz do planejamento permanecerem na região monofásica do diagrama e não haver a formação das fases no sistema (PORTO et al., 2007). Neste caso, observa-se que os ensaios 1, 3, 9 e 11 do planejamento experimental, referentes às condições nas quais a massa molar do PEG foi 400 (g/mol) e nas concentrações mínimas de citrato dos sistemas não formaram duas fases aquosas.

Os resultados do coeficiente de partição (K) em 14 ensaios foram menor que 1, indicando que a enzimas queratinolíticas particionaram preferencialmente para a fase inferior (rica em sal).

Os ensaios 2 e 5 (Tabela 5), que apresentava em comum pH 6,0 e  $C_{PEG}$  de 20%, apresentaram um coeficiente de partição de 1,52 e 1,04 respectivamente, apresentando nesses ensaios uma maior afinidade pela fase PEG. Pode-se observar ainda que no ensaio 5 em que apresentava  $C_{CIT}$  20% e da  $M_{PEG}$  400 (g/mol) ocorreu aumento do coeficiente de partição, fenômeno este que pode ser explicado pela teoria de *salting out*, pois quando a concentração na fase salina aumenta, as proteínas são forçadas a particionar para a fase PEG. Este comportamento pode ser atribuído à inclusão desta enzima no volume disponível na fase PEG (BABU et al., 2008; RAWDKUENA et al., 2011).

Pode-se observar na Tabela 6 a significância das variáveis estudadas no planejamento (concentrações do PEG, concentração do citrato, pH e massa molar do PEG) sobre o coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y) e fator de purificação (FP).

Os efeitos principais, pH (4) e a interação entre a  $M_{PEG}$  (1) e  $C_{CIT}$  (3) foram as únicas variáveis que apresentaram efeitos significativos, ou seja, os valores de efeito estimados estão acima do nível de significância de  $p = 0,05$  que estão influenciando (positivamente ou negativamente) sobre as respostas. Quando uma interação foi significativa, quer dizer que uma variável não atua isoladamente sobre as respostas, isto é, as variáveis atuam concomitantemente.

**Tabela 6.** Efeitos estimados para coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y) e fator de purificação (FP) no processo de purificação de queratinases por SDFa.

Variáveis	K	Y	FP
(1) $M_{PEG}$	1,48	2,73	1,20
(2) $C_{PEG}$	- 2,54	1,38	-199
(3) $C_{CIT}$	1,32	3,72*	8,57*
(4)pH	-3,21*	2,91	4,84*
1 x 2	-1,11	0,38	-0,70
1 x 3	-5,50*	-5,38*	-7,01*
1 x 4	-2,78	1,18	0,44
2 x 3	1,47	0,52	0,31
2 x 4	2,88	-1,48	-0,51

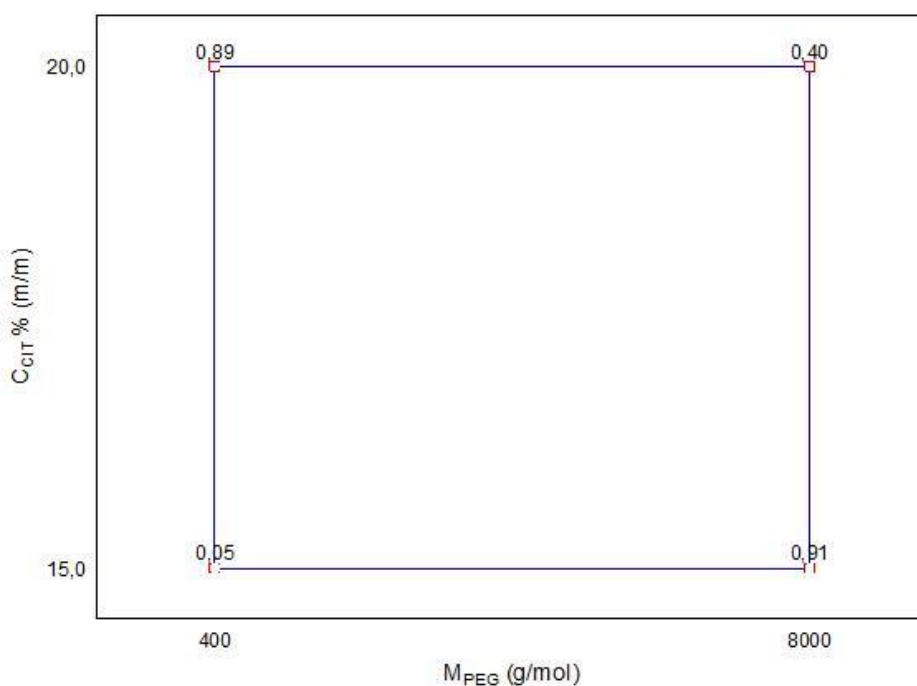
<b>3 x 4</b>	1,97	0,71	0,88
<b>1 x 2 x 3</b>	2,90	-0,49	1,61
<b>1 x 2 x 4</b>	1,10	0,22	-1,34
<b>1 x 3 x 4</b>	2,40	-1,01	-352*
<b>2 x 3 x 4</b>	-2,40	0,62	3,83*

---

\*Efeitos significativos  $p < 0,05$

O efeito negativo do pH sobre o coeficiente de partição indica que o aumento do pH diminui o coeficiente de partição, ou seja, as queratinases particionaram em sua maioria para a fase rica em sal. Mudanças no pH podem induzir mudanças conformacionais na estrutura das enzimas. A partição das enzimas é dependente do ponto isoelétrico ( $pI$ ), pois o mesmo causa mudanças em seus comportamentos de separação. Regra geral as proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao ponto isoelétrico) apresentam maior afinidade pela fase superior rica em PEG (ALBERTSSON, 1986).

Os resultados da interação  $M_{PEG}$  (1) e  $C_{CIT}$  (3) podem ser observados no gráfico de interpretação geométrica (Figura 2) em que concentração de citrato (15%) e a massa molar do PEG (8000 g/mol), tendo como variável-resposta o coeficiente de partição  $K$  obteve melhores valores. Nota-se que ocorreu um aumento no coeficiente de partição  $K$  com o aumento da massa molar do PEG e diminuição da concentração do citrato. Deste modo, espera-se que nos sistemas que apresentem menores concentrações de citrato e maiores de massa molar do PEG sejam obtidos os maiores valores do coeficiente de partição das enzimas queratinolíticas. Ou seja, para se obter melhor coeficiente de partição as concentrações de PEG e sal tem que ser inversamente proporcionais.



**Figura 2.** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da interação entre concentração de citrato e a massa molar do PEG, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição (K).

Os resultados obtidos nesse trabalho vão de encontro com a teoria do volume excluído, em que com o aumento da massa molar do PEG (8000 g/mol) ocorre uma diminuição do coeficiente de partição (BARBOSA et al., 2010, DREYER et al., 2009),

Este fenômeno do volume excluído ocorre devido à elevada massa molar do polímero, devido ao aumento na área de contato entre a biomolécula e os componentes do sistema, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, mas de um modo geral o K diminui (PESSOA-JR; KIKILIAN, 2005). Uma explicação para este fenômeno foi descrita quando se avaliou a interação entre o polímero e a proteína nos sítios hidrofóbicos da molécula, este efeito foi mais importante que o efeito do volume excluído. Este fenômeno foi observado na partição da pepsina e quimosina em sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato (SPELZINI et al, 2005). Desta maneira, conclui-se que a teoria do volume excluído não influenciou na partição da enzima neste trabalho.

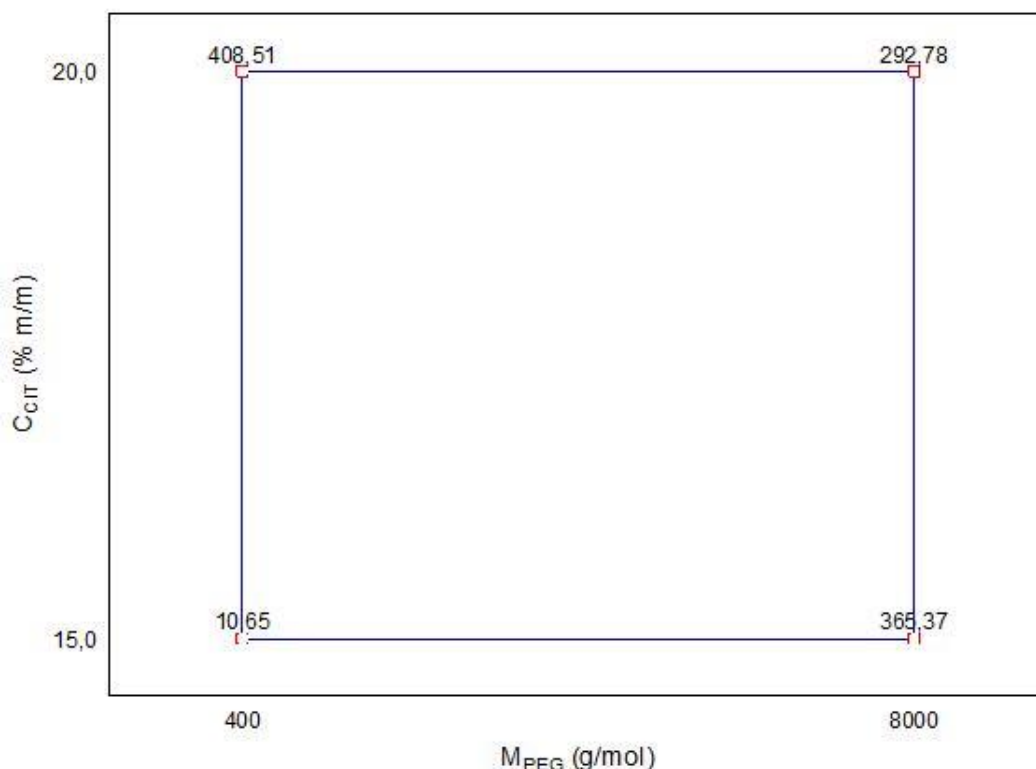
Resultados encontrados por Sousa e colaboradores (2009), em que estudaram o comportamento da lisozima e conalbumina da clara do ovo em diferentes sistemas (PEG 1500/ citrato de sódio e sulfato de sódio) em pH 7,0, observaram que ambas as enzimas apresentaram melhores valores de coeficiente de partição K no sistema composto por PEG/citrato de sódio (lisozima 3,85 e conalbumina 0,31). A lisozima na presença de altas concentrações de PEG 1500 (18%) e citrato de sódio a enzima particionou para a

fase PEG, e a conalbumina PEG 1500 (14%) e citrato de sódio apresentou uma maior afinidade pela fase sal. Sendo os melhores resultados para recuperação utilizando o sal citrato de sódio, no entanto apresentaram valores inferiores, a conalbumina, apresentou valores de recuperação entre 78,33% a 84,28%, enquanto a lisozima no mesmo meio foi de 60,63% a 77,39%.

Foram realizadas análises estatísticas dos efeitos utilizando como variável-reposta a recuperação em atividade (Y), considerando os resultados da recuperação de queratinases na fase inferior do sistema, ou fase rica em sal, foi verificado que a variável que mais influenciou foi a concentração de citrato com efeito significativo positivo, ou seja, quanto maior a concentração do citrato maior a recuperação em atividade na fase sal (Tabela 6).

No entanto, a interação entre  $M_{PEG}$  (1) e  $C_{CIT}$  (3), apresentou efeito negativo, ou seja, com o aumento da concentração de citrato e a diminuição da  $M_{PEG}$  simultaneamente, favoreceu a recuperação em atividade na fase sal.

Estes resultados ainda podem ser observados na Figura 3. A massa molar do PEG de 400 (g/mol) juntamente com a concentração de citrato de 20% (m/m) apresentaram os melhores valores da recuperação em atividade, todos acima de 100%. Valores de recuperação acima de 100% são frequentemente reportados para extração usando extração líquido-líquido. Estes valores de recuperação são provavelmente explicados pela eliminação dos inibidores durante o processo de purificação do sistema que favoreceu a atividade (MAYERHOFF et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2006; SALA et al., 2011).



**Figura 3.** Diagrama para interpretação geométrica do efeito do planejamento  $2^4$ , tendo como variável-resposta a recuperação em atividade e a concentração de citrato em função da massa molar do PEG.

Em relação ao fator de purificação (FP) foram feitas as mesmas análises e observações antes descritas como efeito das variáveis significativas e a melhor condição de recuperação das queratinases na fase inferior do sistema de extração.

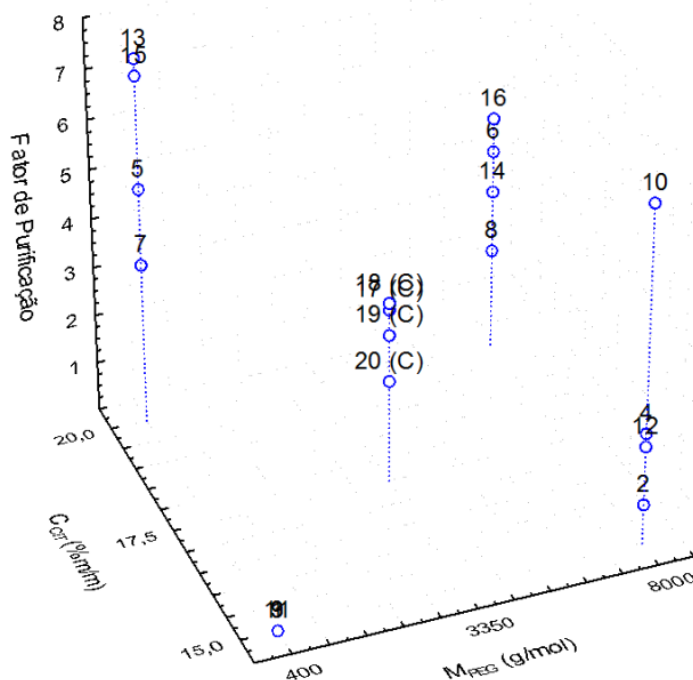
Pode-se observar na Tabela 7, que duas variáveis principais ou de primeira ordem,  $C_{CIT}$  (3) e pH (4) apresentaram efeitos significativos com nível de confiança de 95%. Os efeitos positivos da  $C_{CIT}$  e do pH indicam que com o aumento do valor dessas variáveis aumentou o fator de purificação das queratinases.

Assim como na recuperação em atividade a variável que mais influenciou o fator de purificação (FP) foi a  $C_{CIT}$  com efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração de citrato, o fator de purificação da enzima estudada aumentou. O melhor valor do fator de purificação (FP= 7,41), ou seja, o melhor sistema para se extrair a enzima queratinolítica desejável para uma das fases do sistema com a mínima contaminação possível foi encontrado no sistema composto foi encontrado no sistema composto de  $M_{PEG}$  400 (g/mol),  $C_{PEG}$  20%,  $C_{CIT}$  20% e pH 8,0 (ensaio 13 na Tabela 5).

Observando a Figura 4, nota-se que a purificação ocorreu com ênfase nos sistemas que apresentaram  $M_{PEG}$  de 400 (g/mol) associados à concentração de citrato a



20% (m/m), ou seja, a diminuição do polímero e o aumento do sal favorece a purificação da enzima.



**Figura 4.** Representação gráfica do fator de purificação em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG.

Utilizando sistemas de duas fases aquosas  $M_{PEG}$  de 4000 (g/mol),  $C_{PEG}$  12% e concentração de fosfato 11,9% para extrair  $\alpha$ - galactosidade produzida por *Aspergillus oryzae*, Naganagouda e Mullimani (2008) obtiveram como melhores resultados para coeficiente de partição 0,156, fator de purificação 3,6 e 87,71% de recuperação em atividade na fase salina do sistema.

Vale salientar que este é um dos primeiros trabalhos de extração de queratinases na literatura utilizando sistema de duas fases PEG/ citrato. Resultados obtidos por Sala et al, (2011) em que avaliaram a o efeito da concentração de PEG 15000, fosfato de potássio pH 7,0 e NaCl na extração e purificação de queratinases, obtiveram como melhores resultados fator de purificação na fase superior de 3,2 e recuperação queratinolítica de 114%.

Recentemente, os resultados obtidos por Bach et al. (2011), em sistema de duas fases aquosas composto por PEG 4000 (g/mol) e citrato de sódio em pH 7,0, mostraram que a queratinase produzida por *Serratia marcescens* particionou para a fase rica em PEG, apresentando  $K=14,54$  e  $Y= 68,7\%$ . A queratinase produzida pelo *Aspergillus sp* SIS 11, que apresentou resultados de recuperação em atividade ( $Y= 503,6\%$ ) bem

melhores que os descritos pelo referido autor, utilizando 20 % (m/m) de PEG 400 (g/mol), pH 8,0 e 20% (m/m) de citrato. Os resultados obtidos no presente trabalho, utilizando PEG/citrato, foram muito promissores para a extração e purificação de queratinases.

#### 4. CONCLUSÃO

A biodiversidade microbiana é a principal fonte para novos produtos e processos biotecnológicos. O micro-organismo de estudo *Aspergillus* sp SIS 11 apresentou eficiência na degradação de penas, crescendo em meios simples com penas como sua única fonte de carbono e nitrogênio e a necessidade de uma baixa concentração de substrato. A partir dos dados obtidos no presente trabalho é possível afirmar que a linhagem de *Aspergillus* sp SIS 11 apresenta um grande potencial comercial por ter sido produzido utilizando um resíduo agroindustrial, o que resulta em baixo custo de produção. Ao mesmo tempo por apresentar um alto valor de purificação das enzimas, demonstra ser um bom aditivo para aplicação na formulação de rações para nutrição animal.

#### 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**, Wiley-Interscience, New York, p.346, 1986.
- ALI, T. H.; NADIA H.; ALI, N. H.;MOHAMED, L. A. Production, purification and some properties of extracellular keratinase from feathers-degradation by *Aspergillus oryzae* NRRL-447. **Journal of applied environmental sciences sanitation**, v.6, p. 123-136, 2011.
- ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1298-1303, 2007.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Process**, v.47, p.83-89, 2008.
- BACH, E.; CANNAVAN, F.S.; DUARTE, F.R.S.; TAFFAREL, J.A.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p. 102-107, 2011.
- BARBOSA, H.S.C.; HINEB, A.V.; BROCCINIC, S.; SLATER, N.K.H.; MARCOS, J.C. Dual affinity method for plasmid DNA purification in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography**, v. 1217, p. 1429-1436, 2010.

BOERIS, V.; SPELZINI, D.; FARRUGIA, B.; PICÓ, G. Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasus homogenate. **Process Biochemistry**, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1735–1750, 2010.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. e PESSOA Jr., A. Aqueous two-phase systems extraction of -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 2, p. 135-140, 2006.

CEDROLA, S.M.L.; MELO, A.C.N.; MAZOTTO, A.M.; LINS, U.; ZINGALI, R.B.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S.; VERMELHO, B. A.; Keratinases and sulfide from *Bacillus subtilis* SLC to recycle feather waste. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.1259–1269, 2012.

CORTEZI, M.; CILLI, E.M.; CONTIERO, J. *Bacillus amyloliquefaciens*: a new keratinolytic feather- degrading bacteria. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.8, p.170-177, 2008.

DREYER, S.; SALIMB, P.; KRAGL, U. Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.46, p. 176-185, 2009.

EL-AYOUTY, Y.M.; AMIRA EL-SAID, A.; SALAMA, A.M. Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes*. **African Journal Biotechnology**, v. 11, p. 2313-2319, 2012.

SALA L.; SALA, S. J. ; CERVEIRA G. P.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C. **Partição de Queratinase por Sistema Aquoso Bifásico**, XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul, 2011.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C. ; FRANCO, T. T. , Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 3, p. 217–223, 2004.

MAZOTTO, A.M; CEDROLA, S.M.L.; LINS, U. ROSADO, A.S.; SILVA, K.T.; CHAVES, J.Q.; RABINOVITCH, L.; ZINGALI, R.B.; VERMELHO, A.B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Lettes and Applied Microbiology**, v.50, p. 89-98, 2010.

MAZZOLA, P.G; LOPES, A.M; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F; PENNA, T.CV; MAGALHAES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA JR, A. Liquid-liquid extraction of biomolecules and overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 143-157, 2008.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1293-1299, 2008.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**, Barueri: Ed. Manole, 2005.

PITT, M. Pectin lyase from *Phoma edicaginis* var. *pinodella*. **Methods Enzymo**, v. 165, p. 350-354, 1988.

PORTO, C.S.; PORTO, T.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L., PORTO, A.L.F.; Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 165-171, 2011.

PORTO, T.S.; PESSOA FILHO, P.A.; BARROS NETO; LIMA FILHO, J.L.; COVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of industrial and Microbiology Biotechnology**, v.34, p. 547-552, 2007.

RAWDKUENA, S.; PINTATHONHGB, P.; CHAIWUTB, P.; BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 73-80, 2011.

SAHOO, D.K.; DAS, A.; THATOI, H.; MONDAL, K. C.; Das MOHAPATRA, P. K. Keratinase Production and Biodegradation of Whole Chicken Feather Keratin by a Newly Isolated Bacterium Under Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.167,p.1040–1051, 2012.

SALES, M. R.; CAVALCANTI, M.T.H.; FILHO, J. L. L; MOTTA, C.M.S.; PORTO, A.L.F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.43, p.285-288, 2008.

SHARMA, M.; SHARMA, M.; RAO, V. *In vitro* biodegradation of keratin by dermatophytes and some soil keratinophiles. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, p. 1-6, 2011.

SOUSA, R.C. S; COIMBRA, J.S.R.; SILVA, L. H. M; SILVA, M.C. H.; ROJAS, E. E. G; VICENTE, A. A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v.877 p.2579–2584, 2009.

SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography**, v.821, p. 60-66, 2005.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GOUSTEROVA, A.; NESHEV, G. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, p. 1008-1012, 2009.

WAWRZKIEWICZ,K.; LOBARZEWSKI,J.; WOLSKI, T. Intracellular keratinase of *Trichopyton gallinae*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 261-268, 1987.

XIE,F.;CHAO.Y;YANG,J;XUE,Z.;LUO,Y.; QIAN,S. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. Strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, p. 344-350, 2010.

YU, X.Y.; ZHANG,B.; JIANG, D.; LIU,Y.J.; NIU, T.G. Separation and purification of a keratinase as pesticide against root-knot nematodes. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.27, p.2147–2153, 2011.

## Capítulo II

### **Produção e extração integrada de queratinases por *Aspergillus* sp SIS 11 em fermentação extrativa**

Patyenne Carvalho Correia, Catarina Michelle de Oliveira Ferreira, Camila Souza Porto, Galba Maria de Campos Takaki, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Artigo a ser submetido na World Journal of Microbiology & Biotechnology



## RESUMO

A integração entre os processos fermentativos e de extração líquido-líquido é uma proposta alternativa para obtenção de altos rendimentos do produto, além de apresentar boa relação custo-benefício. As queratinases são enzimas bastante utilizadas na indústria de alimentos, na síntese de fertilizantes, em detergentes e em ração animal. O melhoramento da obtenção e produção de queratinases no processo fermentativo é importante para obter uma melhor recuperação do produto. A produção e purificação integrada foram auxiliadas por um planejamento fatorial  $2^2$  onde foram analisados os efeitos da massa molar do PEG (400, 3.350 e 8.000 g/mol) e concentrações de citrato (17,5, 20,0 e 22,5%), para a fermentação extrativa utilizando um sistema de duas fases aquosas (SDFA), composto por PEG/citrato. O ensaio composto por massa molar do PEG 400 (g/mol) e concentração de citrato 22,5 % proporcionou os melhores resultados para coeficiente de partição 1,32 e recuperação 65,08% na fase superior rica em PEG. O desenvolvimento de um processo de produção e extração integrados é uma tecnologia alternativa para obtenção de produtos mais puros e com menor custo de produção e purificação.

**Palavras-chave:** Fermentação extrativa, queratinases, SDFA ; *Aspergillus*.

## RESUMO

As queratinases são enzimas bastante utilizadas na indústria de alimentos, na síntese de fertilizantes, em detergentes e em ração animal. Os métodos convencionais de purificação de biomoléculas envolvem várias etapas de operações elevando os custos operacionais de tratamento em até 70%. Foi realizado um estudo com fermentação extrativa usando sistema de duas fases aquosas para determinar as melhores condições para produção de proteases queratinolíticas por *Aspergillus* sp SIS 11. Massa molar do PEG (400, 3.350, 8.000 g/mol) e a concentração de citrato (17,5, 20,0, 22,5%) foram as variáveis independentes avaliadas usando um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. Para o coeficiente de partição as variáveis massa molar do PEG e concentração de citrato não influenciaram significativamente no resultado. O ensaio composto por massa molar do PEG 400 (g/mol) e concentração de citrato 22,5% proporcionou os melhores resultados para coeficiente de partição 1,32 e recuperação 65,08% na fase superior rica em PEG. Desta forma, o sistema integrado provou ser eficiente para a primeira etapa de purificação de queratinases, podendo ser usado no futuro para produção de ração animal.



## ABSTRACT

Keratinases represents one of largest group of industrial enzymes wide ranging application in detergents, food, animal feed. The processing to purify biomolecules usually it is necessary many stages, makes up more than 70% the purification processing cost. The integration of fermentation and a primary product separation step has a positive impact on the productivity of many fermentation processes. A study with extractive fermentation using aqueous two-phase was studied to determine optimal conditions for keratinolytic enzyme production by *Aspergillus* sp SIS 11. PEG molar mass (400, 3.350, 8.000 g/mol) and citrate concentration (17,5, 20,0 22,5%) were selected as the independent variables using a 2<sup>2</sup> full factorial design. Both variables did not show statistically significant effects for partition coefficient. The assay with composition PEG molar mass 400 (g/mol) e citrate concentration 22,5 % has the highest values to partition coefficient 1,32 and yields 65,08% and the keratinolytic enzyme partitioned more to the PEG phase. Consequently, the system proved to be efficient and can be used as a first step keratinase purification and be used at the future for animal feed.

**Keywords:** Extractive fermentation; keratinase; ATPS; *Aspergillus*

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação extrativa pode representar uma solução tecnológica para a recuperação *in situ* do produto para superar a inibição do produto e a baixa produtividade volumétrica que geralmente ocorre em bioprocessos. Como o próprio nome sugere, o conceito implica em uma fase fermentativa integrado com os primeiros passos de tratamento para recuperação do produto de interesse (MARQUES et al, 2009).

Sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma alternativa e método eficiente de concentração e purificação de biomoléculas pela partição delas em duas fases líquidas. São utilizadas duas fases imiscíveis, constituída por dois polímeros em água ou de um polímero e uma solução de sais, composto por 80-90% de água, conseqüentemente proporcionando um excelente ambiente para as células, organelas e substâncias biologicamente ativas (SADEGHI, 2008).

Fermentações em batelada, semi-contínuas ou contínuas, têm sido realizadas em sistema de duas fases aquosas (SDFA). O objetivo é eliminar o efeito do produto ou substrato com elevada atividade específica, de preferência em uma corrente livre de células. No SDFA, a partição do produto em outra fase em relação à do local de produção, tão logo seja formado, reduz o efeito inibitório do produto na fermentação (ANTOV; PERICIN, 2001; BANIK et al., 2003) Algumas vantagens da aplicação do SDFA integrado com meio de cultivo são: aumento da recuperação de extração; redução do número de etapas de purificação e diminuição dos custos do processo. (SINHA et al., 2000). Sistemas utilizando polímero/sais são preferencialmente mais utilizados em operações de larga escala por serem de baixo custo, rápida separação, alta seletividade e estabilidade estrutural da biomolécula pelo polímero (ALBERTSON, 1986).

Nos últimos anos, o interesse pela extração em sistema de duas fases aquosas tem aumentado devido a sua aplicação na separação e purificação de proteínas e enzimas tais como: gelatina liases (BANIK et al., 2003), nisina (LI et al., 2000), endoglucanase (SINHA et al, 2000) ácido clavulânico (MARQUES et al, 2009), fosfatase alcalina (BANIK e PANDEY, 2011), entre outros. Apesar da importância das técnicas de sistemas de duas fases aquosas para o futuro das tecnologias de separação de biomoléculas, é necessário mais estudos para entender melhor as interações básicas moleculares da partição da proteína, uma vez que ainda não são bem elucidadas.

Este estudo é o primeiro trabalho apresentando um método simples e eficaz para a extração de queratinases por fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas. Devido a isto os objetivos deste trabalho foram produzir e extrair queratinases por fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/citrato. Um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>

foi utilizado para avaliar os principais efeitos das variáveis de extração (massa molar do PEG e concentração de citrato) nas variáveis respostas selecionadas: coeficiente de partição e recuperação da extração.

## 2.MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMOS

Foi utilizado linhagem do fungo *Aspergillus* sp SIS 11 provenientes do projeto Rede Norte Nordeste de fungos filamentosos de solos da Caatinga e da Amazônia (RENNORFUN/ SISBIOTA). A linhagem foi mantida em meio ágar Czapek (PITT, 1988) e repicada a cada 30 dias.

### 2.2 MEIO PARA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO SDFA

Meio de cultura proposto por (ANBU et al., 2007), composto por (g/L)  $\text{CaCl}_2$  – 0,025,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,005,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5), pH 8,0 e concentração de pena (0,5% p/v).

### 2.3 PREPARAÇÃO DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO) NA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  para a produção e extração das queratinases em sistema de duas fases aquosas, utilizando, 20 % (m/m) de PEG 400 (g/mol), pH 8,0 e 20% (m/m) de citrato. O sistema foi inicialmente preparado utilizando frascos tipo Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, solução concentrada de citrato a 30% (m/m), PEG a 50% (m/m), meio de cultura descrito anteriormente, água foi adicionada para um sistema com volume total de 50 ml, e inóculo apresentando concentração final de  $10^4$  esporos/mL. Após a agitação em vórtex por 1 minuto, os ensaios foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. O sistema para fermentação extrativa foi colocado em agitador orbital a  $37^\circ\text{C}$ , 120 rpm durante 96h após, ao término da fermentação as duas fases foram separadas por decantação durante 60 minutos. Em seguida, os volumes das fases foram mensurados e alíquotas das mesmas foram retiradas para realização da atividade enzimática e teor de proteínas.

### 2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

A influência das variáveis, massa molar do PEG ( $M_{\text{PEG}}$ ) e concentração de citrato ( $C_{\text{CIT}}$ ), sobre as variáveis resposta selecionadas, coeficiente de partição ( $K$ ), recuperação ( $Y_t$ ), foram avaliados de acordo com os resultados obtidos com o planejamento fatorial  $2^2$  contendo 8 ensaios e 4 pontos centrais (Tabela 1). Experimento realizado em triplicata para permitir a estimativa do erro puro experimental.

**Tabela 1.** Níveis das variáveis utilizadas no planejamento  $2^2$  para produção e extração integrada de queratinases em SDFA.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
<b>Concentração de citrato (%m/m)</b>	17,5	20	22,5
<b>Massa molar do PEG (g/mol)</b>	400	3350	8000

## 2.5 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS DO SDFA

O coeficiente de partição da enzima é definido como a relação da atividade volumétrica na fase superior ( $A_s$ ) e a fase inferior ( $A_i$ ):

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

A razão de volumes é a relação entre os volumes apresentados pela fase PEG e a fase sal, ou seja a fase superior ( $V_s$ ) e a fase inferior ( $V_i$ ) do sistema:

$$Vr = \frac{V_s}{V_i}$$

A recuperação na fermentação extrativa foi calculada usando Eq. (Chouyyok et al., 2005)

$$Y_t = \frac{100}{1 + \left( \frac{1}{K} * \frac{1}{Vr} \right)}$$

Após a realização dos ensaios foi feito a análise estatística dos resultados utilizando software *Statistica* 8.1 (Statsoft Inc, 2008), no qual o efeito das variáveis sobre as respostas (coeficiente de partição e recuperação) foram analisados.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a determinação do conteúdo proteico foi utilizado o método de Bradford (1976), a curva padrão foi realizada com albumina bovina sérica. Todas as determinações analíticas foram realizadas em duplicata e controles adequados foram utilizados, para diminuição da interferência dos componentes do processo, nos métodos analíticos.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA

Para a determinação da atividade queratinolítica, foi utilizado o método descrito por Anbu et al., (2007). Para a reação foram utilizados tubos cônicos com capacidade para 15 mL, contendo 200  $\mu$ L do extrato enzimático, 20 mg de pena de galinha tratada (WAWRZKIEWICZ et al., 1987) e 3,8 mL de solução tampão TRIS-HCL (0,1M, pH 7,8). O conteúdo foi misturado por inversão e incubado a 37°C durante 1 hora em banho-maria, com leve agitação a cada 10 minutos. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em banho de gelo por 10 minutos, a absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotometria a 280 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo definido uma unidade da atividade enzimática, com aumento do valor da absorbância de 0,1, nas condições experimentais acima descritas (a atividade foi expressa em U/mL).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do líquido metabólico produzido durante a fermentação, foram realizadas as dosagens da atividade queratinolítica na fase superior e inferior do sistema. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos na fermentação extrativa utilizando *Aspergillus* sp SIS 11, de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$  para avaliação da influência da  $M_{PEG}$  (massa molar do PEG) e  $C_{CIT}$  (concentração de citrato), obtendo como variáveis-respostas: coeficiente de partição (K) e recuperação ( $Y_T$ ).

**Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial  $2^2$  para extração de queratinases de *Aspergillus* sp SIS 11 na fermentação extrativa utilizando PEG 20% e pH 8,0 no SDFa.

Ensaio	$M_{PEG}$ (g/mol)	$C_{CIT}$ (% m/m)	K	$Y_t$ (%)
1	400	17,5	-	-
2	8000	17,5	1,59	62
3	400	22,5	1,32	65
4	8000	22,5	1,43	55
5 (C)	3350	20	1,09	58
6 (C)	3350	20	1,10	60
7 (C)	3350	20	0,95	50
8 (C)	3350	20	0,53	35

O ensaio 1 (PEG 400 g/mol,  $C_{PEG}$  20% e  $C_{CIT}$  17,5%) não formou duas fases aquosas devido as concentrações críticas mínimas encontrarem-se abaixo da curva binodal de acordo com Porto et al. (2007).

Os melhores resultados em termos de combinação das duas respostas foram observados no ensaio 3, no qual concentração de queratinases após a extração na fase rica em PEG ( $K > 1$ ) foram ( $K = 1,32$  e  $Y_t = 65,08\%$ )

Como pode ser observado ainda na (Tabela 2) os valores máximos e mínimos do coeficiente de partição (K) para as queratinases foram de (0,53 a 1,59). Tendo seus valores em maioria maiores de 1, indicando particionamento preferencial para a fase rica em PEG. Estes resultados corroboram com estudos realizados por Ooi et al. (2011) que utilizaram um sistema de duas fases aquosas, constituído por diferentes sistemas, PEG/(sais fosfato, citrato de sódio, sulfato de magnésio). Estes autores verificaram a influência do PEG com diferentes molaridades, e concentrações (5 a 20% (m/m) para a produção e extração de lipase por *Burkholderia pseudomallei*, e obtiveram os valores máximos e mínimos do coeficiente de partição (K) para a lipase de (0,83 a 7,86), tendo sua maioria também particionado para a fase rica em PEG. Os autores descrevem que este fenômeno provavelmente aconteceu porque em soluções com alta força iônica, diminui a solubilidade da molécula a ser extraída.

Este fenômeno é resultado da competição entre os íons salinos adicionados ao sistema e, assim, o soluto (biomolécula) diminui a capacidade de solvatação no solvente aquoso, sendo este fenômeno conhecido como *salting out* (ZAFARANI-MOATTAR e

HAMZEHZADEH, 2011). Nesse caso, as queratinases produzidas por *Aspergillus* sp SIS 11 foram ligeiramente repelidas da fase rica em citrato, para a fase rica em PEG, na qual encontram maior solubilidade. De acordo com Porto et al. (1997), o comportamento de migração da biomolécula para a fase PEG também pode ser devido as fortes interações entre os sítios hidrofóbicos da molécula da proteína e os grupos etilenos do PEG, resultando na inclusão desta molécula proteica no volume disponível na fase rica em PEG.

Próximo ao ponto crítico do sistema, que representa a concentração mínima para a formação de sistemas de duas fases aquosas, moléculas como proteínas particionam quase igualmente entre as fases. Se a concentração do polímero é aumentada, a composição das fases do sistema desvia mais do ponto crítico, a partição da proteína terá preferência por uma das fases dependendo das características da biomolécula (BANIK et al., 2003).

ASHAPALA e HE (2008) estudaram a fermentação extrativa em S DFA para produção de enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus subtilis*, meio constituído por PEG 4000 g/mol 9,5% (m/m) e 5,06% (m/m) sulfato de sódio e obtiveram como melhor valor do coeficiente de partição na fermentação extrativa de 1,32 para essa fermentação extrativa.

Por outro lado, Pandey e Banik, (2011), estudaram a fermentação extrativa de uma fosfatase alcalina produzida por *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 utilizando diferentes sistemas de PEG (2000; 4000 e 6000g/mol); Dextrana (dextrana 40 e dextrana T500) e sais (sulfato de magnésio, sulfato de sódio e citrato de sódio), em todos os ensaios realizados na presença de PEG/sais houve decréscimo do K, apresentando coeficiente de partição menor que 1, demonstrando ter maior afinidade pela fase rica em sal, diferindo do presente trabalho. Porém o comportamento de partição em sistemas de duas fases aquosas é particular para cada molécula em estudo devido as características próprias de cada biomolécula, seja de caráter proteico ou não.

O efeito da massa molar dos polímeros, (Tabela 3) por sua vez, depende da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso das proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais influenciáveis pelas mudanças dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar. Segundo Kavakcioglu e Tarhan (2013) o PEG é capaz de excluir proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento da sua massa molar (efeito de volume excluído).

**Tabela 3.** Tabela dos efeitos estimados para a extração de queratinases.

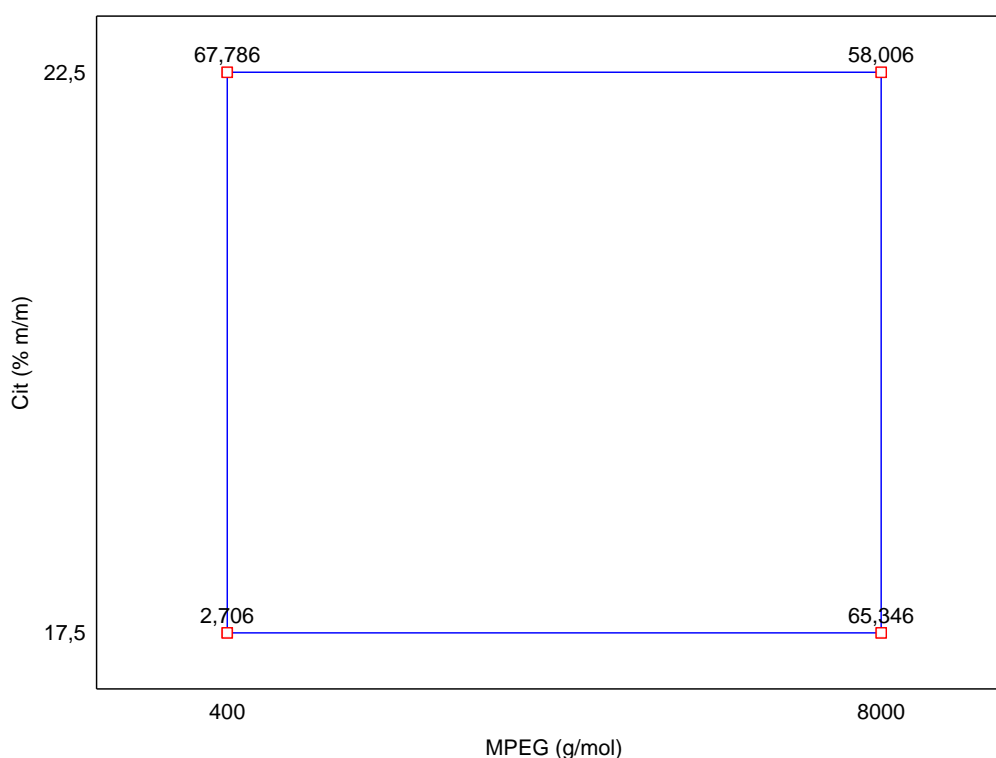
Variáveis	K	Yt
(1)M <sub>PEG</sub>	3,17	2,37
(2)C <sub>CIT</sub>	2,14	2,59
1 X 2	-2,75	-3,25*

M<sub>PEG</sub> - Massa molar do PEG, C<sub>CIT</sub> - Concentração de citrato

\*Efeitos significativos  $p < 0,05$

A análise estatística dos resultados mostrou que as variáveis massa molar do PEG e concentração de citrato não exerceram um efeito significativo sobre o valor do coeficiente de partição, verificando que as variáveis nas condições utilizadas podem ser consideradas inertes para o sistema.

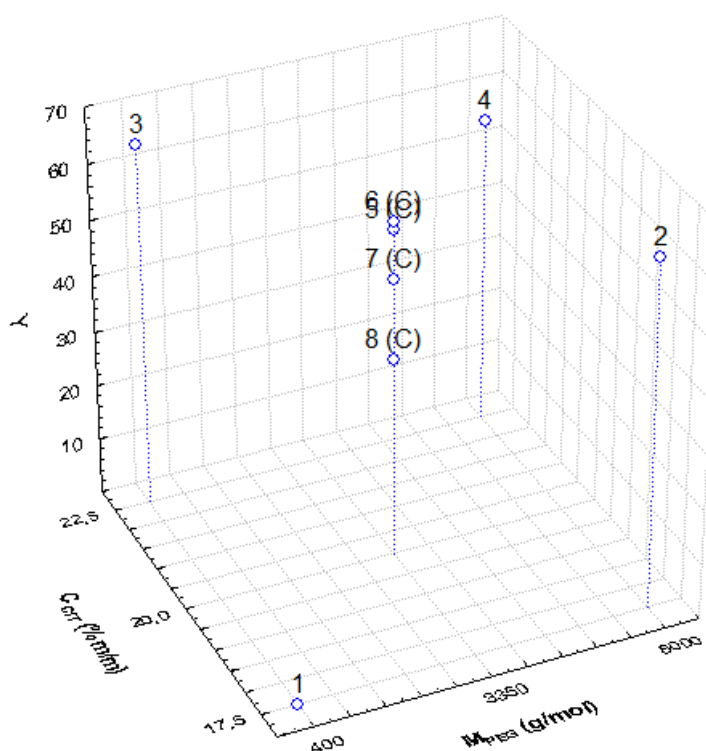
Para a recuperação na fase rica em PEG ( $Y_t$ ) as variáveis principais não foram estatisticamente significativas no nível de 95% de confiança, no entanto, a interação entre elas (M<sub>PEG</sub> e C<sub>CIT</sub>) foi significativa e negativa (Figura 1). Isto significa que o aumento da concentração de citrato, e diminuição da massa molar do PEG, favoreceu o incremento na recuperação de queratinases para a fase PEG durante a fermentação extrativa.



**Figura 1 .** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento  $2^2$ , tendo como variável-resposta à recuperação da enzima ( $Y_t$ ) na fase rica em PEG.



Conforme observado por Videira e Aires-Barros (1994) para a extração *in situ* de ácido clavulânico a partir do caldo fermentado utilizando SFA PEG/sais fosfato, o aumento simultâneo das concentrações de PEG e sal do sistema pode favorecer a partição da molécula para a fase PEG ou vice-versa. Estes autores obtiveram recuperação entre 60 e 99%. No presente trabalho, a recuperação mais elevada (65%) foi obtida no sistema de fermentação extrativa constituído por massa molar do PEG 400 g/mol 20% e  $C_{CIT}$  22,5% (Figura 2).



**Figura 2.** Correlação entre a concentração de citrato e massa molar do PEG em função da recuperação da fermentação extrativa

A representação gráfica da relação entre as duas respostas está apresentada na Figura 2. A melhor combinação das respostas para recuperação da atividade é aquela apresentada pelo sistema de número 3, menor massa molar do PEG e maior concentração de citrato.

Sistemas que apresentam a massa molar do PEG pode ter influência sobre a partição da biomolécula, bem como o efeito da massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas, aquelas com massas molares maiores são mais

influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com baixa massa molar (TAMBOURGI et al., 2008).

## 6. CONCLUSÕES

A produção e extração integrada de queratinases de *Aspergillus* sp SIS 11 produzida por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas (PEG/citrato) foi realizada com sucesso. As queratinases particionaram em sua maioria para a fase superior rica em PEG. Os melhores resultados foram obtidos no ensaio composto por menor massa molar do PEG e maior concentração de citrato. A partir desses dados, é possível afirmar que a fermentação extrativa é um método de baixo custo com bons resultados e com potencial para ser utilizado em futura aplicação industrial para produção de queratinases.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules** Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986.

ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1298-1303, 2007.

ANTOV MG, PERICIN DM. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. **Enzyme Microbial Technology**, v.28, p.467-72, 2001.

ASHIPALA, O.K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource Technology**, v.99, p. 4112-4119, 2008.

BANIK, R.M.; SANTHIAGU,A.; KANARI, B.; SABARINATH,C.; UPADHYAY,S.N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v 19,p.337-348, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CHOUYYOK, W; WONGMONGKOL, N. PRINCHANONT, S. Extration of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3514-3518, 2005.

KAVAKCIOGLU, B; TARHAN, L. Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 105, p. 8-14, 2013.

LI, C., OUYANG, F.; BAI, J. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/ MgSO<sub>4</sub>/E7H<sub>2</sub>O aqueous two-phase system to produce nisin. **Biotechnology Letters** , v. 22, p. 843-847, 2000.

MARQUES, D.A.V.; TORRES, B.R.; PORTO, A.L.F.; PESSOA-JÚNIOR, A.; COVERTI,A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47. p. 122-126, 2009.

OOI, C.W.; HII, S.L.; KAMAL, M.M.; ARIFF, ARBAKARIYA; LING, T.C. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v.46, p. 68-73, 2011.

PANDEY, S.K & BANIK, R.M Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v.102, p. 4226-4231, 2011.

PITT, M. Pectin lyase from *Phoma edicaginis* var. *pinodella*. **Methods in Enzymology**, v. 165, p. 350-354, 1988.

PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S.; TAMBOURGI, E.B. Extraction of recombinant cytochrome b<sub>5</sub> from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor. **Biotechnology Techniques**, v.11, p.641-643, 1997.

PORTO, T.S.; MEDEIROS e SILVA,G.M.; PORTO,C.S.; CAVALCATI.; M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/ Citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Process**, v.47, p. 716-721, 2008.

PORTO, T.S.; PESSOA FILHO, P.A.; BARROS NETO.; LIMA FILHO, J.L.; COVERTI, A.; PORTO, A.L.F; PESSOA JR, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p. 547-552, 2007.

SADEGHI, R.; JAMEHBOZORG, B. Effect of temperature on the salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of sodium dihydrogen phosphate and poly (propylene glycol). **Fluid Phase Equilibria**, v.271, p. 13-18, 2008

SHOW, P.L.; TAN,C.P.; ANUAR,M.S.; ARIFF,A.; YUSOF,Y.A.; CHEN,S.K.; LING.T.C. Extractive fermentation for improved production and recovered lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, v. 116, 226-233, 2012.

SINHA, J. ; DEY, P.K; PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei/ Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v.6, p. 163-175, 2000.

TAMBOURGI, E.B.; SARUBOO, L.A.; LIMA-FILHO, J.L; PORTO,A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI,G.M; LIU,B.; KNILL,C.J; KENNEDY, J.F. Enzyme partitioning using PEG- *Anacardium occidentale* L. exudates gum polysaccharide aqueous two-phase systems. **Journal of Biological Sciences**, v.8, p.288-297,2008.

VIDEIRA, M. ; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using na aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassim phosphate. **Journal of Chromatography A**, v.668, p.237-240, 1994.

WAWRZKIEWICZ,K.; LOBARZEWSKI,J.; WOLSKI, T. Intracellular keratinase of *Trichopyton gallinae*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 25, p. 261-268, 1987.

ZAFARANI-MOATTAR M.T., HAMZEZHAADEH S, Partitioning of amino acids in the aqueous biphasic system containing the water-miscible ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the water-structuring salt potassium citrate. **Biotechnology Progress**. v.27, p. 986–997, 2011.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As linhagens do gênero *Aspergillus* mostraram ser capazes de degradar a queratina e conseqüentemente produzir queratinases;
- O micro-organismo selecionado *Aspergillus* sp SIS 11 apresentou eficiência na degradação de penas, obtendo melhor atividade queratinolítica no cultivo submerso em meio composto por pena a 0,5% (p/v) em pH 9,0.
- O sistema de duas fases aquosas PEG/citrato mostrou ser eficiente para extrair queratinases;
- A extração de queratinases através do sistema de duas fases aquosas obteve um fator de purificação de 7,41 e recuperação da enzima de 503,6%, com PEG 400 (g/mol) a 20% (m/m), pH 8,0 e 20% (m/m) de citrato.
- As queratinases, durante a fermentação extrativa, particionaram em sua maioria para a fase superior rica em PEG.
- O processo integrado de produção e purificação de queratinases por fermentação extrativa foi muito eficiente, apresentando potencial para aplicação biotecnológica industrial, como na fabricação de rações.

### 12x 117 total

Motor,caixa,tração,eletri

12x 101

12x56

Motor caixa de marcha e tração

08134177723

Kristiane

Agendamento 34477600\*7777

11 de setembro 7:50 francismo