



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
QUERATINASES OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS
NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM**

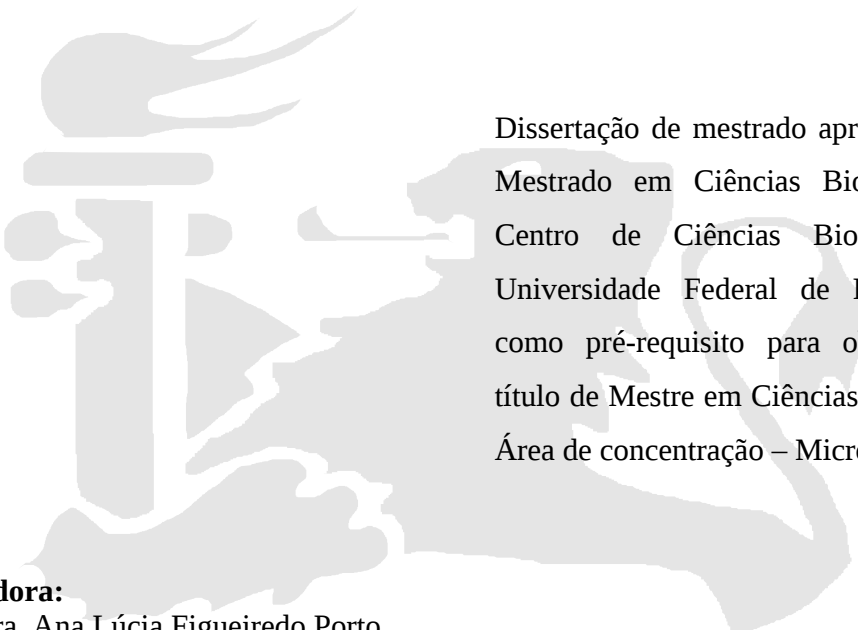
WALKYRIA ALMEIDA SANTANA

RECIFE

2011

WALKYRIA ALMEIDA SANTANA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
QUERATINASES OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS
NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM**



Dissertação de mestrado apresentado ao
Mestrado em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
Área de concentração – Microbiologia

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-Orientadoras:

Profa. Dra. Lusinete Aciole de Queiroz

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

RECIFE

2011

Santana, Walkyria Almeida

Detecção e caracterização parcial de queratinases obtidas de dermatófitos estocados na coleção de culturas Micoteca URM/ Walkyria Almeida Santana. – Recife: O Autor, 2006.

59 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadoras: Lusinete Aciole de Queiroz

Keila Aparecida Moreira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Microbiologia, 2006.

Inclui bibliografia

1. Enzimas de fungos 2. Fungos 3. Queratina I. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2006-218

WALKYRIA ALMEIDA SANTANA

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
QUERATINASES OBTIDAS DE DERMATÓFITOS ESTOCADOS
NA COLEÇÃO DE CULTURAS MICOTECA URM**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Mestrado em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco
como pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas,
Área de concentração – Microbiologia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto - Presidente
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira - Membro
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira - Membro
Universidade Federal Rural de Garanhuns

RECIFE

2011

A Deus e a minha família pelo amor,
apoio e incentivo para realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho e me fortalecer nos momentos de fraqueza

Ao meu amado esposo Djair, pelo companheirismo, carinho, dedicação e participação constante em todos os momentos, sem o qual não teria conseguido realizar este trabalho.

Aos meus pais, que lapidaram meu ser e conduziram meus passos e minha conduta por toda minha vida.

A minha tia Sônia que irrestritamente lutou pelo sucesso e se fez presente nos momentos difíceis prestando-me auxílio.

Aos meus irmãos André e Mayra pelo apoio, carinho e amizade.

Aos meus sogros pelo apoio irrestrito nos momentos mais difíceis

A Teta, que sempre esteve incondicionalmente ao meu lado.

A minha orientadora, profa Ana Porto, que contribuiu de forma imprescindível para a construção deste trabalho e para o meu aperfeiçoamento profissional.

À professora Keila, que sempre se mostrou solícita e engrandeceu de forma decisiva a construção deste trabalho.

À professora Luzinete, que sempre se mostrou uma grande amiga e que de forma extraordinária enriqueceu meus conhecimentos em micologia.

À professora Rejane, que tantas vezes me cedeu seu ombro, acalmando e esclarecendo.

À professora Oliane, que com sua ternura e conhecimentos de micologia muito contribuiu em minha caminhada.

A Adenilda, que nunca nos perdia de vista zelando e mantendo a nossa trajetória dentro da pós-graduação.

À Universidade Federal de Pernambuco

Ao departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami

À Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES)

A todos que me apoiaram nesta jornada: Messias, Sibele, Dani Viana, Ana Beatriz, Morgana, Mário e Rosângela.

Aos meus alunos, pelo incentivo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
2.1 Queratina
2.2 Queratinases
2.3 Dermatófitos
2.4 Potencial de Aplicação das Queratinases
2.4.1 Processamento e bioconversão de resíduos de queratina
2.4.2 Indústria de processamento do couro
2.4.3 Indústria Farmacêutica
2.4.4 Formulação de detergentes
2.4.5 Degradação de prions
2.4.6 Outras aplicações
3 JUSTIFICATIVA
4 OBJETIVOS
4.1 Geral
4.2 Específicos
5 MATERIAL E MÉTODOS
5.1 Microrganismos
5.2 Confirmação das características taxonômicas
5.3 Determinação qualitativa da atividade queratinolítica em meio sólido
5.4 Cultivo líquido submerso para produção da enzima

5.5 Determinação do conteúdo protéico e atividade proteásica
5.6 Determinação do peso seco
5.7 Variação do pH durante a produção
5.8 Determinação da atividade queratinolítica
5.9 Efeito do pH na atividade da enzima
5.10 Efeito da temperatura na atividade da enzima
5.11 Estabilidade da enzima ao pH
5.12 Estabilidade da enzima a temperatura
5.13 Efeito de inibidores
6 RESULTADOS
6.1 Detecção da atividade queratinolítica qualitativa em meio sólido
6.2 Produção de queratinases em meio líquido
6.2.1 Curva de crescimento e do pH durante a produção de queratinases
6.2.2 Curva de Atividade proteásica e conteúdo protéico
6.3 Atividade queratinolítica
6.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade da queratinase
6.5 Ação de inibidores
7 DISCUSSÃO
8 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

RESUMO

Queratinases são enzimas que catalisam hidrólise de proteínas, possuindo grande especificidade por queratina. Essas enzimas são produzidas por um grande número de microrganismos, dentre eles, os fungos dermatófitos são os de maior importância. O potencial de aplicação biotecnológica das queratinases é amplo, podendo estas atuarem na medicina e em diversos setores industriais, como também em processos de biorremediação. Este trabalho teve como objetivo estudar amostras de dermatófitos quanto à produção de queratinase e dentre elas, eleger a melhor produtora para caracterização parcial desta enzima. A determinação qualitativa da atividade queratinolítica foi avaliada em meio sólido contendo como única fonte de carbono e nitrogênio a queratina, onde as amostras *Microsporum canis* 4962 e *Trichophyton mentagrophytes* 4156 demonstraram maior atividade queratinolítica dentro de cada gênero. Para determinação quantitativa da atividade queratinolítica, foi realizado a produção da enzima em cultivo submerso, onde o meio líquido contendo sais e queratina de penas foi utilizado. O cultivo foi realizado durante 25 dias, a 28 °C em agitador orbital (120rpm), onde avaliou-se a concentração protéica, atividade proteásica, variação do pH e peso seco. O extrato bruto da amostra melhor produtora (*Microsporum canis* 4962) foi utilizado para caracterização parcial da enzima. A queratinase da amostra *Microsporum canis* 4962 apresentou uma temperatura ótima a 80°C e uma termoestabilidade a altas temperaturas (70-90°C) retendo cerca de 42% de sua atividade nesta faixa de temperatura. A maior atividade foi obtida no pH 9,0 apresentando cerca de 60 % de atividade na faixa alcalina de pH. Os dados obtidos do efeito dos inibidores de proteases mostraram que a queratinase em estudo trata-se de uma serino protease.

Palavras- chave: queratinases; dermatófitos; caracterização parcial.

ABSTRACT

Keratinases are enzymes that catalyses hydrolyse of proteins, having great specificity for keratin. These enzymes are produced by a great number of microorganisms; amongst them, the dermatophytes fungi are of bigger importance. The biotechnological potential of keratinases is ample, with applications in the medicine, in various industrial sectors as well as in the biorremediation processes. The aim of this work was to study strains of dermatophytes for keratinase production and to select the best producer for partial characterization of this enzyme. The qualitative determination of the keratinolytic activity was evaluated in solid medium containing keratin as the sole carbon and hydrogen source for which the strains *Microsporum canis* 4962 and *Trichophyton mentagrophytes* 4156 showed highest activities. For the quantitative analyses of keratinolytic activity, the enzyme was produced in submerged culture using liquid medium supplemented only with keratin and salts. Cultivation was conducted during 25 days at 28°C under orbital shaker (120 rpm). The protein concentration, the proteasic activity, the medium pH and the biomass dry weight were monitored along cultivation. The crude extract of the best producer strain (*Microsporum canis* 4962) was then utilized for partial characterization of the enzyme. The keratinase showed an optimum temperature at 80°C and thermostability under high temperatures (70-90°C), maintaining around 42% of its activity at 90° C. The higher activity was obtained at pH 9.0, showing activity values above of 60% in the alkaline pH range. The results obtained from the effects of proteases inhibitors showed that the keratinase studied in this work is a serine protease.

Key-words: keratinases; dermatophytes; partial characterization.

1 Introdução

As queratinases (EC 3.4.21/24.99/11) pertencem ao grupo das proteases, enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas (SAID; PIETRO, 2002).

A queratinase possui grande especificidade por proteínas queratinosas como as da pele e anexos, e não queratinosas como caseína soroalbumina bovina e elastina (FRIEDRICH; KERN, 2003). Estas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparadas com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases das outras proteases (ONIFADE et al, 1998).

A maioria das queratinases é induzida, requerendo queratina como indutor exógeno. Quando isso ocorre são exportadas dos locais de síntese intracelulares para o meio externo (ONIFADE et al, 1998).

Queratinas são proteínas estruturais localizadas na pele e seus anexos, tais como: unha, cabelo, pena e lã. Suas cadeias polipeptídicas estão unidas fortemente umas as outras formando as cadeias α (α queratina) e cadeias β folhas (β queratina). Seu elevado grau de ligações covalentes bissulfeto, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio estabilizam a estrutura filamentosa da queratina. Por esta razão é insolúvel em água e extremamente resistente a degradação por enzimas proteolíticas tais como tripsina, pepsina e papaína (EICHNER; KAHN, 1990; FUCHS, 1995; COULOMBE; OMARY, 2002).

As queratinases são produzidas por certos microrganismos e insetos. A maioria das queratinases tem algumas características comuns, apesar de suas diferentes origens.

Pertencem principalmente ao grupo das serina proteases extracelulares, com exceção das queratinases produzidas por leveduras que pertencem ao grupo das aspartato proteases (NEGI et al, 1984; LIN et al, 1993).

Os microrganismos produtores de queratinases correspondem a espécies de fungos saprófitas e parasitas (SAFRANEK, 1982; ASAHII et al, 1985; SIESENOP, 1995; GRADISAR et al, 2000), espécies de *Bacillus* e Actinomicetos (MUKHOPADYAY CHANDRA, 1990; BOCKLE et al, 1995; CHITTE et al, 1999; LETOURNEAU et al 1998). As queratinases produzidas por fungos mais estudadas, são as produzidas por fungos dermatófitos do gênero *Microsporum* (TAKIUCHI et al., 1984; MAGNON et al., 1998), *Trichopyton* (TSUBOI et al., 1984; QIN et al, 1992) e *Epidermophyton* (RIPPON, 1990).

Dermatófitos são fungos queratinofílicos capazes de infectar a pele e seus anexos. Pertencem a este grupo fungos do gênero *Microsporum*, *Trichopyton* e *Epidermophyton* (RIPPON, 1990).

Dentre os microrganismos queratinofílicos, os dermatófitos apresentam a habilidade de digerir queratina, quebrando as ligações dissulfeto e utilizando esta proteína como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento (WAWRZKIEWICZ et al, 1991; KUNERT et al, 1995; EL-NAGHY et al, 1998; KAUL; SUMBALI, 1999; VIANI et al, 2001).

Os fungos queratinofílicos são capazes de utilizar a queratina como fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento destes microrganismos em substratos que contém queratina indica sua capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas que podem degradar o complexo das queratinas (ONIFADE et al, 1998).

As queratinases possuem vários potenciais de aplicação: na formulação de detergentes para eliminação de células epiteliais aderidas a fibras têxteis (HOSHINO et al, 1995); processamento ecologicamente correto do couro (DAYAMANDAN et al, 2003; RIFFEL et al, 2003); degradação dos resíduos produzidos na indústria avícola (penas de galinha) (LIN et al, 1996; BOCKLE et al, 2003); melhoramento nutricional de rações, a partir de penas, para animais (ONIFADE et al, 1998); produção de hidrolisados protéicos a partir de resíduos ricos em queratina (KIDA et al 1995); eliminação da queratina na acne e psoríase, na retirada de calos humanos e na preparação de vacinas na terapia dos dermatófitos (BLANK et al, 1972).

Esse trabalho descreve a detecção, produção e a caracterização parcial da queratinase produzida por uma amostra de fungo dermatófito, selecionada dentre trinta amostras de seis espécies deste grupo de fungos.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Queratina

Queratinas são proteínas estruturais localizadas na pele, unha, cabelo, pena, chifre e lã. Suas cadeias polipeptídicas estão unidas fortemente umas as outras formando as cadeias α (α queratina) e cadeias folhas β (β queratina). Seu elevado grau de ligações covalentes bissulfeto, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio estabilizam a estrutura filamentosa da queratina. Por esta razão é insolúvel em água e extremamente resistente a degradação por enzimas proteolíticas tais como tripsina, pepsina e papaína (EICHNER; KAHN 1990; FUCHS, 1995; COULOMBE; OMARY, 2002).

A queratina além de insolúvel em água é insolúvel em solventes orgânicos e resistente a ácidos e álcalis diluídos. A hidrólise da queratina pelos ácidos fortes, fornece aminoácidos como: histidina, lisina, e arginina, e em maior proporção cistina e tirosina (EVERSON, 1968).

Apesar da estabilidade incomum das queratinas, as penas não se acumulam na natureza, confirmando a existência de decompositores no meio ambiente (ONIFADE et al,1998).

2.2 Queratinases

As queratinases pertencem ao grupo das proteases, enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas. As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos e biotecnológicos. Podem ser obtidas de vários tecidos de origem animal, vegetal ou a partir de

microrganismos. São classificadas pelo seu pH ótimo ou pela natureza química do seu sítio ativo (SAID; PIETRO, 2002).

De acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura (*International Union of Biochemistry*), proteases são hidrolases classificadas no subgrupo 4, do grupo 3. Essas enzimas têm classificação diversificada, não obedecem facilmente às regras de nomenclatura, devido à diversidade de ação e estrutura (RAO et al, 1998).

Com base no ponto de clivagem na cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são grosseiramente divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas às extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (MATSUBARA; FEDER, 1971; PRIEST, 1984; RAO et al, 1998).

De acordo com o grupo funcional presente no seu sítio catalítico, as endoproteases podem ser classificadas como: serino proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases e metaloproteases. Enquanto as exoproteases são divididas com base no seu mecanismo de ação em aminoproteases e carboxiproteases (PRIEST, 1984; OUTTRUP; BOYCE, 1990; RAO et al, 1998).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atividade. Fundamentando-se nessa característica são classificadas como: ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm atividade na faixa de pH 2,0 a 6,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. Proteases neutras têm atividade em pH entre 6,0 a 8,0. Em relação as proteases alcalinas, essas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 (PRIEST, 1984; RAO et al, 1998).

As proteases sugerem a atividade patogênica de muitas espécies de fungos de importância médica, estando relacionada com a propagação no hospedeiro durante o

processo invasivo (SUMNER; MYRBACK, 1951; JIMÉNEZ, 1993; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

A queratinase possui grande especificidade por queratina como a da pele e anexos e por outras proteínas como caseína, soroalbumina bovina e elastina (FRIEDRICH; KERN, 2003). Estas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparadas com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases das outras proteases (ONIFADE et al, 1998). As queratinases pertencem ao grupo de enzimas proteolíticas capazes de degradar a queratina com grande eficiência (ONIFADE et al, 1998).

As queratinases são produzidas por certos microrganismos e insetos. A maioria das queratinases tem algumas características comuns apesar de suas diferentes origens. Pertencem principalmente ao grupo das serina proteases extracelulares, com exceção das queratinases produzidas por leveduras que pertencem ao grupo das aspartato proteases extracelulares (NEGI et al, 1984; LIN et al, 1993).

Os microrganismos produtores de queratinases correspondem a espécies de fungos saprófitas e parasitas (SAFRANEK; GOOS, 1982; ASAH I et al, 1985; SIESENOP; BOHM, 1995; GRADISAR et al, 2000), espécies de *Bacillus* e *Actinomicetos* (SAFRANEK; GOOS, 1982; ASAH I et al, 1985; SIESENOP; BOHM, 1995; GRADISAR et al, 2000). As queratinases produzidas por fungos mais estudadas, são as de dermatófitos do gênero *Microsporum* (TAKIUCHI et al, 1984; MIGNON et al, 1998), *Trichophyton* (TSUBOI et al, 1984; QIN et al, 1989) e *Epidermophyton* (RIPPON et al, 1964).

Devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética, diversos microrganismos podem ser utilizados na produção de queratinase,

principalmente fungos como: *Doratomyces microsporus*, *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *Rhizomucor pusillus*, *Trichophyton gallinae*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e bactérias como: *Nocardiopsis sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Streptomyces pactum*, *S. fradiae*. (ONIFADE et al, 1998; FRIEDRICH; KER, 2003; FARAG; HASSAN, 2004; MITSUIKI et al, 2004).

Queratinases têm especificidade por um grande número de substratos protéicos solúveis e insolúveis. Entre os substratos protéicos solúveis, as queratinases possuem a habilidade de hidrolisar caseína, gelatina, soroalbumina bovina e hemoglobina. Em relação aos substratos protéicos insolúveis, estas enzimas hidrolisam penas, lã, cabelo, unha, chifre, seda, colágeno, elastina, estrato córneo e azoqueratina. Estudos têm indicado que estas enzimas preferencialmente clivam aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos na posição P1 (BRESSOLLIER et al. 2000).

As atividades para enzimas queratinolíticas microbianas variam especificamente para diferentes substratos descritos na literatura. Um exemplo disto é o *Bacillus licheniformis* que é capaz de hidrolisar proteínas como soroalbumina bovina, colágeno, elastina, bem como queratina de pena (LIN et al., 1992). Contrariamente, Dozie e colaboradores (1994) relataram uma proteinase queratinolítica termofílica do *Chrysosporium keratinophilum* que hidrolisava somente queratina, e não mostrava nenhuma atividade para caseína e soroalbumina bovina. Isto indica que a enzima isolada era específica somente para substratos com queratina (ONIFADE et al,1998).

A atividade da queratinase pode ser medida através da observação da quantidade de enzima requerida para liberar resíduos de aminoácidos, pois durante a ligação covalente enzima-peptídeo, ocorre liberação de um aminoácido ou fragmento peptídico (FARAG; HASSAN, 2004).

A atividade proteolítica da queratinase microbiana é mais elevada, quando comparada com proteases provenientes de outras fontes (KUNERT, 1992; LIN et al, 1992; BOCKLE et al, 1995; ONIFADE et al, 1998).

A maioria das queratinases é induzida, requerendo queratina como indutor exógeno. Quando isso ocorre são exportadas dos locais de síntese intracelulares para o meio externo (ONIFADE et al, 1998).

As queratinases da maioria das bactérias, actinomicetos e fungos apresentam pH ótimo na faixa de neutro a alcalino (FRIEDRICH; ANTRANIKIAN 1996; LETOURNEAU et al, 1998; BRESSOLLIER et al, 1999; IGNATOVA et al, 1999; GRADISAR et al, 2000; SANGALI; BRANDELLI 2000; RISSEN; ANTRANIKIAN, 2001; YAMAMURA et al, 2002; RIFFEL et al, 2003; FARAG; HASSAN, 2004; THYS et al, 2004; ANBU et al, 2005). Contudo, um pequeno número de queratinases possui pH ótimo numa faixa de alcalinidade extrema, acima de 12 (TAKAMI et al, 1999; MITSUIKI et al, 2004).

A temperatura ótima das queratinases, esta numa faixa entre 30 e 80 °C. No entanto a enzima de *Chrysosporium keratinophilum* (DOZIE et al, 1994) e *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (NAM et al, 2002) mostrou temperatura ótima excepcionalmente alta, de 90 e 100 °C respectivamente, com meia vida de 30 e 90 minutos respectivamente.

O peso molecular das queratinases varia de 18 a 200 kDa (CHITTE et al, 1999), contudo, para fungos patogênicos o peso molecular pode atingir 440 kDa (KIM et al, 2004).

2.3 Dermatófitos

Dermatófitos são fungos queratinofílicos capazes de infectar a pele e anexos. Pertencem a este grupo fungos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (RIPPON, 1990; ELEWSKI, 1992; LACAZ et al, 2002).

As principais espécies de fungos dermatófitos envolvidas em infecções da pele são: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. equinum*, *M. gallinae*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. soudanense*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

Dentre os microrganismos queratinofílicos, os dermatófitos apresentam a habilidade de digerir queratina, quebrando as ligações dissulfeto e utilizando esta proteína como fonte de carbono e nitrogênio para seu crescimento e desenvolvimento (WAWRZKIEWICZ et al, 1991; KUNERT, 1995; EL-NAGHY et al, 1998; KAUL; SUMBALI, 1999; VIANI et al, 2001). A capacidade queratinofílica tem sido considerada restrita para os dermatófitos. Os quais pertencem a um grupo de fungos altamente especializados que, através de um longo processo evolutivo, tornaram-se capazes de invadir e colonizar os tecidos queratinizados do homem. Contudo, além dos dermatófitos outros fungos queratinofílicos como algumas espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, *Aphanoascus*, *Chaetomium*, *Alternaria* e *Curvularia* estão relacionados a micoses superficiais de unhas e espaços interdigitais dos pés demonstrando a capacidade patogênica desses microrganismos (RIPPON, 1995; MACHISIO et al, 1991; KWON-CHUNG; BENNET, 1992; AGUT et al, 1995; GUGNANI, 2003).

A patogenicidade de algumas espécies fúngicas, incluindo os dermatófitos, tem sido relacionada às atividades enzimáticas (HELGREN; VINCENT, 1980;

MINOCHA et al, 1972). Entre as proteases que atuam promovendo a liberação de aminoácidos, as queratinases são bastante estudadas e estão envolvidas em infecções por dermatófitos segundo Weitzman & Summerbel (1995), mas Lacaz e colaboradores (2002) excluem a ação de enzimas proteolíticas como responsáveis por infecções por fungos, pois já foram isolados fungos não produtores de tais enzimas em lesões dermatomycóticas, enquanto que algumas espécies produtoras destas enzimas, não causam a doença.

Malviya e colaboradores (1992), observaram que a degradação da queratina começa antes da detecção da atividade extracelular da queratinase e esta degradação foi associada ao crescimento micelial. Isto pressupõe que uma parte da degradação é mecânica (ONIFADE et al, 1998).

O crescimento e alongamento do micélio dos fungos geram uma pressão e uma resistência no substrato compactado. Evidências para degradação mecânica como um mecanismo de integração da queratinólise vem sendo discutido por diversos autores. Acredita-se que a penetração mecânica através do micélio seja necessária para expor locais mais reativos para clivagem enzimática das ligações peptídicas (ONIFADE et al., 1998).

De acordo com as evidências disponíveis, pode-se presumir que a queratinólise mecânica precede a queratinólise enzimática até haver a produção de exoproteases pelos micélios. Pode haver também uma simultaneidade entre a hidrólise mecânica e enzimática no processo inicial (ONIFADE et al, 1998).

Diferentes isolados de uma mesma espécie podem variar na produção de estruturas invasivas e no grau de atividade queratinolítica, assim como em muitas atividades bioquímicas do fungo (MARCHISIO et al, 1994).

Os fungos queratinofílicos são capazes de utilizar a queratina como fonte de carbono e nitrogênio. O crescimento destes microrganismos em substratos que contêm queratina, indica sua capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas que podem degradar o complexo das queratinas (ONIFADE et al., 1998).

Nas dermatofitoses causadas por fungos queratinofílicos, podem ocorrer lesões em tecidos queratinizados como pêlo e também pele e unha do homem e de outros animais, sendo estas restritas à camada córnea da epiderme devido a incapacidade destes fungos em penetrar em tecidos de hospedeiro imunocompetente. Embora se caracterizem por serem persistentes e incômodas, não são debilitantes nem potencialmente fatais, destacando-se dentre as infecções mais prevalentes no mundo (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; FERREIRA; ÁVILA, 1996; ZAITZ et al, 1998; FISHER; COOK, 2001; FERNANDES et al, 2001; COSTA et al, 2002; LACAZ et al, 2002).

Fungos queratinofílicos podem invadir o cabelo “*in vitro*”, embora as espécies difiram na forma de invasão. O sentido da invasão e o papel patológico dos elementos fúngicos dentro do cabelo são significativamente diferentes entre os fungos (AHO, 1988; OKUDA et al, 1989; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000). A atividade queratinofílica dos dermatófitos foi estudada por muitos pesquisadores (ENGLISH, 1969; WAWRZKIEWICE et al, 1991; FILIPELLO et al, 1994; MARCHISIO et al, 1994; RASHID et al, 1996; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000). Os mecanismos pelos quais os fungos queratinofílicos degradam a queratina de sua fonte natural, tal como o cabelo, parece ser resultado de ações mecânicas dos fungos (RAUBITSCHKE, 1961; BAXTER; MANN, 1969; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000) e da atividade proteolítica da queratinase (YU et al, 1971; SANYAL et al, 1985; ALI-SHTAYEH; JAMOUS, 2000).

Queratinases já foram detectadas de amostras de *Microsporum* (Takiuchi et al,

1984; Mignon et al, 1998), de *Trichophyton* (Deshmukh; Agraval, 1982; Aubaid; Muhsin, 1998; Abdel-Rahman, 2001) e de *Epidermophyton floccosum* (Hopsu-Havu; Tunnela, 1977; Lopez-Martinez, 1994).

Okafor & Ngwogu (2000) estudando as diferenças taxonômicas nas atividades queratinofílicas de cinco espécies distintas de dermatófitos: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum audouinii*, *M. gypseum*, isoladas de crianças de uma escola primária e utilizando cabelo humano como substrato, observaram que todas as espécies testadas apresentavam atividade queratinofílica da primeira à quinta semana, estando, *T. rubrum*, entre as espécies que apresentaram maior atividade queratinofílica. Apenas *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* causaram danos estruturais na haste do cabelo.

Muhsin & Hadi (2001) avaliaram a habilidade de quatro espécies de fungos, sendo dois dermatófitos e dois sapróbios, em degradar três tipos de substratos de queratina, tais como: cabelo humano, pena de galinha e lã. Cabelo humano teve uma elevada taxa de degradação pela colonização por *M. Gypseum* e *Chrysosporium pannicola*, pena de galinha foi altamente degradada por *Aspergillus flavus*, enquanto que a lã foi altamente degradada por *T. mentagrophytes* variedade *erinacei* e *Chrysosporium pannicola*. Os autores concluíram que a concentração protéica no meio de cultura varia entre os fungos estudados e os exames microscópicos demonstraram maceração dos substratos de queratina pelos fungos.

Okafor & Ngwogu (2000) T2 avaliaram cinco espécies distintas de dermatófitos, exceto *E. floccosum*, quanto a atividade queratinofílica, utilizando como substrato cabelo humano. Dentre as espécies testadas, isoladas de crianças, verificou-se que *Trichophyton rubrum* apresentou a maior atividade queratinofílica.

2.4 Potencial de Aplicação das Queratinases

O mercado mundial de enzimas industriais está estimado em 1,5 bilhão de dólares, onde 75% são enzimas hidrolíticas das quais as proteases representam um dos três maiores grupos comercializados. Nesse contexto, o Brasil participa com apenas 2,7% da comercialização de enzimas que corresponde a 40 bilhões de dólares. Nesse mercado, as proteases constituem o segundo grupo de enzimas de maior comercialização, com expressiva participação das que possuem ação terapêutica (RAO et al, 1998; BON; PEREIRA JÚNIOR, 1999; SOARES et al, 1999).

As proteases são usadas para os mais diversos fins, contudo tem destaque na indústria de alimentos, bebidas, detergentes, couros e como agentes terapêuticos. Nos últimos anos o uso de enzimas na indústria farmacêutica e de cosmético tem expandido rapidamente. A razão para o êxito desses biocatalizadores nesse ramo industrial decorre da alta especificidade e eficiência catalítica. Assim sendo, a relevância do uso de enzimas como medicamento, relaciona-se ao fato de que em pequenas quantidades a enzima pode produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas de pH e temperatura (RAO et al, 1998; BON; PEREIRA JÚNIOR, 1999).

As questões ambientais, a fabricação de produtos de melhor qualidade e o controle do consumo de energia, são fatores que vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias não poluentes, mais sofisticadas e de menor custo. Assim sendo, a tecnologia enzimática surgiu como alternativa para substituição gradual de processos químicos pelo uso dos biocatalizadores (TEIXEIRA et al, 1994; BOM; PEREIRA JÚNIOR, 1999).

Devido as suas propriedades catalíticas degradativas e sintéticas, as proteases constituem uma classe particular de enzimas de imensa importância fisiológica e

comercial. Estas enzimas são encontradas universalmente, e são produzidas tanto por animais como por plantas e microrganismos. Estes últimos constituem as fontes mais promissoras para enzimas com potencial para aplicação industrial, cujo mercado mundial tende a movimentar 1 bilhão de dólares anualmente. No entanto, o custo de produção das proteases é o maior obstáculo à sua aplicação industrial. Uma maior produtividade tem sido conseguida por seleção de cepas hiperprodutoras, ou por melhoramento dos meios de cultivo. A biodiversidade constitui uma fonte inestimável para a inovação biotecnológica, favorecendo a procura por novas cepas de microrganismos a serem utilizados para fins particulares na indústria (HODGSON, 1994).

Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases queratinolíticas de origem microbiana começaram a ser usadas em larga escala na bioconversão de resíduos (FRIEDRICH, 2003; FARAG; HASSAN, 2004), nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas e indústrias de cosméticos (FARAG; HASSAN, 2004).

As queratinases representam uma classe de enzimas com importante papel em processos biotecnológicos, destacando-se os seguintes potenciais de aplicação: processamento ecologicamente correto do couro (HOSHINO et al, 1995; RIFFEL et al, 2003); degradação dos resíduos produzidos na indústria avícola (penas de galinha) (BOCKLE et al, 1995; LIN et al, 1996); melhoramento nutricional de rações para animais, a partir de penas (ONAFADÉ et al, 1998); produção de hidrolisados protéicos a partir de resíduos ricos em queratina (KIDA et al, 1995); na formulação de detergentes para eliminação de células epiteliais aderidas a fibras têxteis (HOSHINO et al, 1995); na obtenção de aminoácidos específicos e peptídeos (FRIEDRICH, 2003); como também na

medicina através da eliminação da queratina na acne psoríase e calos humanos (BLANK et al, 1972).

2.4.1 Processamento e bioconversão de resíduos de queratina

Materiais constituídos por queratina tais como: chifres, penas unhas e cabelos são abundantemente encontrados na natureza como descarte ou subprodutos industriais. Estes compostos podem ser convertidos em concentrados protéicos de valor nutricional para animais (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998; KUMAR; TAKAGI, 1999).

As penas acumuladas provenientes do abate das galinhas para consumo humano, representam um grande desperdício e impacto ambiental, sendo a sua reciclagem objeto de interesse na área de nutrição animal, devido ao seu baixo custo de obtenção e grande potencial como fonte alternativa de proteínas para ração animal (LATSHAW et al, 1994; ONIFADE et al, 1998; GESSESSE et al, 2003).

Em alguns países, as penas são utilizadas como complemento para ração animal na forma de farinha de penas (STEINER et al, 1983; PAPADOPOULOS et al, 1986), depois de sofrer tratamento hidrotérmico que elimina aminoácidos termolábeis como lisina, metionina e triptofano, além de formar aminoácidos não essenciais como lisinoalanina e lantionina, resultando assim em um produto de baixa digestibilidade e pouco valor nutritivo, além de proporcionar um custo muito alto no processo produtivo. O uso de enzimas queratinofílicas surge como uma alternativa para hidrólise destes materiais, já que o uso dessas enzimas no processamento de penas mantém o seu valor nutritivo (PAPADOPOULUS, 1989; LATSHAW et al, 1994; WANG; PARSONS, 1997; GESSESSE et al, 2003; WANG et al, 2003). Além disso, frangos tratados com ração suplementada com queratina proveniente de penas submetidas ao processo de hidrólise

enzimática, apresentaram ganho de peso comparável ao da ração suplementada com farinha de soja (STEINER et al, 1983).

Considerando o custo termo energético do processamento convencional das penas, e a sua limitação quanto à diminuição do valor nutricional, torna-se necessário investigar tecnologias alternativas, que aumentem o valor nutricional e não causem danos ambientais, através do uso de biofontes que reduzam os custos do processo. Métodos biotecnológicos envolvendo microrganismos e suas enzimas, parecem ser apropriados para esse processo biotecnológico (ONIFADE et al, 1998).

Trabalhos realizados sobre produção de queratinases por *Aspergillus fumigatus*, indicam que a enzima produzida é capaz de degradar queratina *in natura*, tendo potencial para uso biotecnológico na degradação de penas (LINDBERG et al, 1981).

Uma queratinase microbiana produzida e patenteada pela *Bioresource International's* (BRI), vem sendo utilizada na forma bruta para produção de farinha de pena. Esta enzima produzida a partir de *Bacillus licheniformis*, a primeira queratinase comercializada, foi desenvolvida por Shih e colaboradores da BRI, e tem sido disponibilizada no mercado com o nome de Versazyme (GREGG, 2002).

O rico concentrado protéico da farinha de pena, também pode ser aplicado em agriculturas orgânicas como fertilizante com lenta liberação de nitrogênio (HADAS; KAUTSKY, 1994; CHOI; NELSON 1996). A agricultura orgânica conta com o enriquecimento de nitrogênio do solo, que é consequência da intensificação da atividade microbiana, levando a um melhoramento do crescimento das plantas. Tradicionalmente, guano tem sido largamente utilizado como fertilizante para agricultura orgânica. Contudo, devido ao alto custo do guano, fertilizante comumente utilizado, há uma

necessidade de procurar por alternativas mais convenientes (HADAS; KAUTSKY, 1994).

Farinha de pena sendo rica em nitrogênio (15%) e apresentando baixo custo pode prontamente substituir o guano na agricultura orgânica. Esta, não somente funciona como um suprimento de nitrogênio para as plantas e promove a atividade microbiana, mas também estrutura o solo e aumenta a capacidade de retenção de água. A farinha de pena obtida pela hidrólise enzimática microbiana, apresenta numerosas vantagens em relação a outros fertilizantes orgânicos, como o alto valor nutritivo, a facilidade em sua produção e seu baixo custo (GUPTA; RAMNANI, 2006).

2.4.2 Indústria de processamento do couro

A indústria do couro é o segmento industrial que já vem fazendo uso da biotecnologia das queratinases, que são empregadas para depilar a pele durante o processamento do couro, em substituição ao uso do sulfeto de sódio que é extremamente tóxico e gera gás sulfídrico (KISE et al, 1990; KITAYAMA, 1992.). Esta tecnologia vem se estabelecendo como uma opção viável pela sua efetividade e conseqüente liberação de efluentes de menor impacto ambiental. Neste contexto, a depilação que emprega queratinases tem sido utilizada em curtumes, substituindo total ou parcialmente o uso de sulfetos (KRISTINSSON, 2000). O processamento do couro é uma atividade industrial importante no Brasil, que tem 373 estabelecimentos curtidores. Uma queratinase produzida por uma cepa de *Bacillus sp.*, já está sendo testada em nível industrial (KUDRYA; SIMONENKO, 1999).

2.4.3 Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, queratinases produzidas por *Kryptococcus sedentarius* estão sendo estudadas para a remoção de calosidades em seres humanos. Este microrganismo foi identificado como o agente etiológico de uma doença caracterizada pela erosão da sola dos pés. As enzimas proteolíticas, isoladas de cultivos dessa bactéria e caracterizadas bioquimicamente, revelaram atividade queratinolítica em duas serino-proteases que atuam independentemente uma da outra. Estas enzimas seriam eficazes no tratamento do calo humano, além do uso geral na degradação enzimática de polímeros de queratina (KIM et al, 1999). Em outra possível aplicação farmacêutica, as queratinases podem também ser utilizadas para eliminar a queratina no tratamento da acne, psoríase e na preparação de vacinas na terapia de dermatófitos (BLANK et al, 1972).

2.4.4 Formulação de detergentes

Enzimas proteolíticas têm dominado o mercado de detergentes a um longo tempo. Contudo, há sempre necessidade de enzimas com novas propriedades que possam ampliar a capacidade dos detergentes enzimáticos (GUPTA et al, 2002).

Queratinases têm habilidade para se ligar e hidrolisar substratos sólidos tais como penas. Esta é uma importante propriedade de detergentes enzimáticos, visto que são requeridos para atuar em substratos protéicos aderidos a superfícies sólidas. Eles podem ajudar na remoção de sujeiras queratinosas que são frequentemente encontradas em roupas sujas, tais como golas de camisa, onde a maioria das proteases falha em sua ação (GASSESSE et al, 2003).

Queratinases têm sido utilizadas também em detergentes para limpeza de esgotos obstruídos com lixo queratinoso (FARANG; HASAN, 2004) e para remover cabelos em drenos de banheiro (TAKAMI et al, 1992).

2.4.5 Degradação de prions

Prions são partículas protéicas ricas em queratina, responsáveis por uma doença neurodegenerativa fatal, chamada encefalopatia esponjiforme transmissível (MUSAHL; AGUZZI, 2000). Shih et al da BRI, têm reportado que a queratinase PWD1 (Versazyme) é capaz de degradar completamente prions de tecido de cérebro bovino com encefalopatia esponjiforme (LANGEVELD et al, 2003).

2.4.6 Outras aplicações

Outras aplicações potenciais das queratinases incluem a digestão anaeróbica de resíduos de aves domésticas para produzir gás natural para combustível (BRUTT; ICHIDA, 1999), na modificação de fibras tais como: seda e lã (RISSEM; ANTRANIKIAN, 2001) e na produção de plásticos biodegradáveis (GUPTA; RAMNANI, 2006).

3 Justificativa

Atualmente o mercado mundial de enzimas industriais está estimado em 1,5 bilhão de dólares , onde 75% são enzimas hidrolíticas das quais as proteases representam um dos três maiores grupos comercializados. Enquanto que, nesse contexto, o Brasil participa com apenas 2,7% da comercialização de enzimas que corresponde a 40 bilhões de dólares.

As questões ambientais, a fabricação de produtos de melhor qualidade e o controle do consumo de energia, são fatores que vêm incentivando vários setores industriais na busca de tecnologias não poluentes, mais sofisticadas e de menor custo. Assim sendo, a tecnologia enzimática surgiu como alternativa para substituição gradual de processos químicos pelo uso dos biocatalizadores. Estas enzimas são encontradas universalmente, e são produzidas tanto por animais como por plantas e microrganismos. Estes últimos constituem as fontes mais promissoras para produção de enzimas com potencial para aplicação industrial. No entanto, o custo de produção das proteases é o maior obstáculo à sua aplicação industrial. Uma maior produtividade tem sido conseguida por seleção de cepas hiperprodutoras, ou por melhoramento dos meios de cultivo. A biodiversidade constitui uma fonte inestimável para a inovação biotecnológica, favorecendo a procura por novas cepas de microrganismos a serem utilizados para fins particulares na indústria. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases queratinolíticas de origem microbiana começaram a ser usadas em larga escala na bioconversão de resíduos, nas indústrias de alimentos, têxteis, farmacêuticas e indústrias de cosméticos.

Desta forma, é notório a necessidade de pesquisar novas queratinases com características específicas para as varias aplicações biotecnológicas.

4 Objetivos

4.1 Geral

Detectar em amostras de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, atividade queratinolítica e caracterizar parcialmente a queratinase da amostra que demonstrar maior atividade.

4.2 Específicos

- Confirmar as características taxonômicas das amostras de dermatófitos trabalhadas;
- Detectar atividade colagenolítica em amostras de dermatófitos;
- Produzir por cultivo submerso a queratinase a partir dos maiores produtores;
- Caracterizar a queratinase da amostra de dermatófito que apresentar maior atividade queratinolítica, quanto a pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH, estabilidade à temperatura e ação de inibidores.

5 Material e Métodos

5.1 Microrganismos

Foram utilizados fungos dermatófitos da coleção de culturas Micoteca URM. As seguintes espécies foram utilizadas: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*, sendo cinco amostras de cada espécie como mostra a tabela 1.

Tabela 1- Relação dos microrganismos utilizados para seleção dos produtores de queratinase e seus respectivos substratos de origem.

Microrganismo	Amostra	Substrato
<i>Microsporum canis</i>	4962	escamas epidérmicas (abdômen)
	2708	escamas epidérmicas (costas)
	2741	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2876	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2738	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
<i>M. gypseum</i>	4964	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	3060	escamas epidérmicas (braço)
	6034	escamas epidérmicas (braço)
	3645	escamas ungueais (pé esquerdo)
	4279	areia da praia do Recife
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4156	escamas ungueais (mão direita)
	3239	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	2785	Solo
	4422	escamas epidérmicas (abdômen)
	2875	escamas epidérmicas (abdômen)
<i>T. tonsurans</i>	4965	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	4963	escamas epidérmicas (couro cabeludo)
	4968	escamas epidérmicas (coxa)
	4945	escamas ungueais (pé direito)
	4946	escamas epidérmicas (abdômen)
<i>Epidermophyton floccosum</i>	3345	escamas epidérmicas (região interdigital)
	4151	escamas epidérmicas (região inguinal)
	4799	escamas epidérmicas (mão)
	4798	escamas epidérmicas (coxa)
	3195	escamas epidérmicas (região inguinal)

5.2 Confirmação das características taxonômicas

A confirmação das características taxonômicas foi feita de acordo com os caracteres morfológicos, em análise macroscópica e microscópica das culturas obtidas em meio ágar Sabouraud e meio de teste para dermatófito em placa de Petri (DTM) (REBELL; TAPLIN, 1970).

5.3 Determinação qualitativa da atividade queratinolítica em meio sólido

Para detecção das amostras de dermatófitos produtoras de queratinase foi utilizado o método de Wawrzkievicz et al. (1991). Em meio sólido, como fonte de queratina, foi utilizada pena de galinha. A queratina da pena de galinha foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) segundo Wawrzkievicz et al. (1991) e adicionada ao meio de ágar como única fonte de carbono e nitrogênio. A atividade queratinolítica dos dermatófitos foi detectada por uma zona clara em torno da colônia após incubação à temperatura ambiente durante quatorze dias. Foi mensurado, como atividade qualitativa, o diâmetro da zona clara em torno das colônias.

5.4 Cultivo líquido submerso para produção da enzima

Das amostras de dermatófitos que apresentaram atividade queratinolítica em meio sólido, foram escolhidas: *Microsporum canis*, representando a amostra de maior diâmetro de halo do gênero *Microsporum* e *Trichophyton mentagrophytes*, representando o maior diâmetro de halo do gênero *Trichophyton*. As mesmas foram reativadas em ágar Sabouraud. A partir destas culturas em ágar Sabouraud, foram confeccionados discos de 12 mm de diâmetro da periferia das colônias com quatorze dias de incubação, utilizando um instrumento cortante, previamente esterilizado. Os discos confeccionados, foram

inoculados em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 80 mL do meio líquido de sais, composto por: 1% de pena de galinha, previamente tratadas segundo Wawrzkievicz et al. (1991); 0,025 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L de K_2HPO_4 ; 0,015 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,025 g/L de CaCl_2 e 0,005g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sendo ajustado ao pH 5,5, antes de autoclavar (NICKERSON; MOHAN, 1953). Cada espécie foi inoculada em cinco frascos Erlenmeyers e incubadas à temperatura de 30°C sob agitação de 120 rpm, com o objetivo de obter-se cinco amostras do extrato bruto da enzima a cada cinco dias. Cada amostra obtida foi utilizada para as seguintes determinações: conteúdo protéico, atividade proteásica, atividade queratinolítica, peso seco, pH de produção da enzima, além da caracterização parcial da queratinase obtida do microrganismo maior produtor.

5.5 Determinação do conteúdo protéico e atividade proteásica

O conteúdo protéico foi determinado utilizando o método de Bradford (1976) onde a soroalbumina bovina foi usada como padrão. A atividade proteásica foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Leighton (1973), que usa a azocazeína (Sigma) como substrato. Ambas as determinações foram realizadas a partir do extrato bruto filtrado e centrifugado a 500 x g durante 15 minutos. A atividade proteásica foi expressa como uma unidade de enzima que corresponde a elevação na absorbância do valor de 0,1 a 440nm durante uma hora de incubação da mistura de reação.

5.6 Determinação do peso seco

O peso seco foi determinado pelo método gravimétrico. As amostras incubadas em meio líquido contendo pena como fonte de queratina, ao final de cada período de crescimento fúngico (5, 10, 15, 20 e 25 dias) foram filtradas em papel de filtro. A massa

micelial, juntamente com as penas não degradadas, obtidas da filtração, foram lavadas em solução salina e secas em estufa a 60° num período de 24h e em seguida mantidos em dessecador até que atingissem peso constante (EL-REFAI et al, 2004).

5.7 Variação do pH durante a produção

No sobrenadante obtido após centrifugação das culturas, foi aferido o pH através de potenciometria e os dados obtidos foram utilizados para construção da curva de pH.

5.8 Determinação da atividade queratinolítica

Para determinação da atividade queratinolítica, 0,5 ml do sobrenadante do extrato bruto, 50 mg de pena de galinha e 5ml de solução tampão fosfato 0,3 M pH 7,2 foram misturados e incubados à 37 °C durante duas horas, com homogeneização por inversão a cada 10 minutos. As amostras controles foram feitas da mesma maneira, diferindo apenas pelo tratamento prévio do sobrenadante do extrato bruto, pois o mesmo foi mantido a 100 °C durante 15 minutos. A reação foi parada com banho de gelo durante dez minutos. Após o banho de gelo as amostras foram centrifugadas a 1000 x g e a absorbância do sobrenadante foi mensurada espectrofotometricamente a 280 nm. A atividade queratinolítica foi expressa como uma unidade de enzima correspondendo a elevação na absorbância do valor de 0,1 a 280nm durante 1 hora.. A atividade específica foi expressa como unidades de queratinase por mg de proteína (MUHSIN; AUBAID, 2000).

5.9 Efeito do pH na atividade da enzima

O pH ótimo para atividade da enzima foi determinado utilizando-se os seguintes tampões: tampão citrato 0.2 M (pH 4-6), tampão fosfato 0.2 M (pH 7-8), tampão glicina

NaOH 0.2 M (pH 9-10). A determinação da atividade enzimática foi realizada como descrita no item 5.7, utilizando pena de galinha como substrato nas diferentes soluções tampões (MUHSIN; AUBAID, 2000).

5.10 Efeito da temperatura na atividade da enzima

A temperatura ótima para atividade da enzima foi determinada pela incubação da enzima com o substrato, sendo estes submetidos a diferentes temperaturas, variando entre 25 a 90°C por um período de 1 hora. A atividade enzimática foi realizada como descrita no item 5.7, utilizando pena de galinha como substrato (MUHSIN; AUBAID, 2000).

5.11 Estabilidade da enzima ao pH

Para determinação da estabilidade ao pH a enzima foi previamente submetida à ação de diferentes valores de pH pelo uso das soluções tampões, com pH variando entre 4 e 10 conforme descrito no item 5.8, sendo retirada alíquotas para determinação da atividade queratinolítica nos seguintes intervalos de tempo 0, 15, 30, 60 e 90 minutos. As amostras retiradas a cada tempo foram submetidas à determinação da atividade queratinolítica (item 5.7) (MUHSIN; AUBAID, 2000).

5.12 Estabilidade da enzima a temperatura

Para determinação da estabilidade a temperatura a enzima foi previamente submetida a temperaturas variando de 25 a 90 °C, sendo retirada alíquotas para determinação da atividade queratinolítica nos seguintes intervalos de tempo 0, 15, 30, 60

e 90 minutos. As amostras retiradas a cada tempo foram submetidas à determinação da atividade queratinolítica (MUHSIN; AUBAID, 2000).

5.13 Efeito de inibidores

Para determinação do tipo de protease, foram testados os seguintes inibidores: etilenodiaminotetracético (EDTA, 5 mM), fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF, 1 mM) ácido iodoacético (0,05 mM), pepstatina (1 mM). A enzima contida no extrato bruto foi incubada com cada inibidor durante 30 minutos a 37 °C. O controle foi obtido pela incubação da enzima sem a presença de inibidor. Após o tempo de incubação a atividade queratinolítica residual foi mensurada (GRADSAR et al, 1999). .

6 Resultados

6.1 Detecção da atividade queratinolítica qualitativa em meio sólido

Todas as amostras de dermatófitos submetidas ao teste qualitativo demonstraram atividade queratinolítica através da formação de halos no meio sólido, com exceção da amostra 3195 de *Epidermophyton floccosum* como mostra a tabela 2.

As amostras 4962 de *Microsporum canis* e 4156 de *Trichophyton mentagrophytes*, foram escolhidas para produção e caracterização parcial da enzima, pois demonstraram atividade queratinolítica com formação de halos 7,7 e 5,3 cm de diâmetro respectivamente (Figura 1, 2), sendo estes os maiores halos dentro de cada espécie.

Tabela 2 - Amostras de dermatófitos utilizadas para detecção de atividade queratinolítica e diâmetros de halos obtidos após 14 dias de incubação destes fungos em meio sólido contendo queratina solúvel.

Amostras dos Dermatófitos	Diâmetro do halo (mm)
<i>Microsporum canis</i> 4962	77
<i>Microsporum canis</i> 2876	52
<i>Microsporum canis</i> 2741	49
<i>Microsporum canis</i> 2738	48
<i>Microsporum canis</i> 2708	35
<i>Microsporum gypseum</i> 4279	70
<i>Microsporum gypseum</i> 4964	66
<i>Microsporum gypseum</i> 3645	60
<i>Microsporum gypseum</i> 3060	37
<i>Microsporum gypseum</i> 6034	34
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 4156	53
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 3239	51
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 2875	49
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 4422	42
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 2785	41
<i>Trichophyton tonsurans</i> 4945	44
<i>Trichophyton tonsurans</i> 4946	40
<i>Trichophyton tonsurans</i> 4965	27
<i>Trichophyton tonsurans</i> 4963	27
<i>Trichophyton tonsurans</i> 4968	31
<i>Epidermophyton floccosum</i> 4151	21
<i>Epidermophyton floccosum</i> 3345	16
<i>Epidermophyton floccosum</i> 4798	16
<i>Epidermophyton floccosum</i> 4799	12
<i>Epidermophyton floccosum</i> 3195	0



Figura 1. Atividade queratinolítica qualitativa da amostra *Trichophyton mentagrophytes* 4156 utilizando queratina solúvel a partir de penas como substrato, após 14 dias de crescimento.

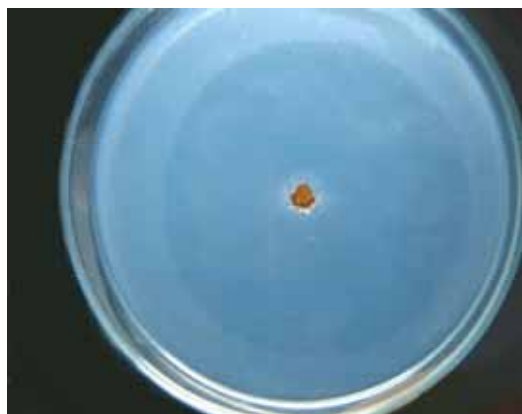


Figura 2. Atividade queratinolítica qualitativa da amostra *Microsporum canis* 4962 utilizando queratina solúvel a partir de penas como substrato, após 14 dias de crescimento.

6.2 Produção de queratinases em meio líquido

6.2.1 Curva de crescimento e do pH durante a produção de queratinases

O peso seco da massa micelial da amostra de *Microsporum canis* 4962 e da pena que não foi solubilizada apresentou um crescimento até o 5º dia de incubação, mantendo-se estável do 5º ao 10º dia de incubação e decrescendo do 10º ao 25º dia, caracterizando três fases distintas de crescimento, respectivamente: fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio (figura 5). Já o peso seco da massa micelial da amostra de *Trichophyton mentagrophytes* 4156 e da pena que não foi solubilizada apresentou um crescimento até o 5º dia de incubação, diferindo do *Microsporum canis* 4962, manteve-se estável do 5º ao 15º dia de incubação e decresceu do 15º ao 25º dia, caracterizando três fases distintas de crescimento, respectivamente: fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio, como demonstrado na figura 6.

Inicialmente as amostras de *Microsporum canis* 4962 e *Trichophyton mentagrophytes* 4156 foram cultivadas em meio de cultura com o valor de pH inicial de

5,5, apresentando no decorrer do crescimento fúngico uma alcalinização do meio, que ocorreu do 5º ao 25º dia cultivo (figuras 5 e 6).

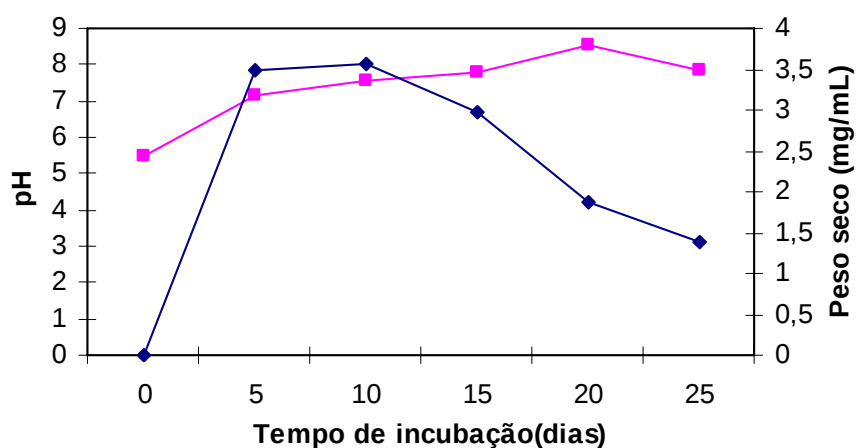


Figura 5 - Curva de biomassa e variação de pH durante a produção de queratinase por *Microsporium canis* 4962 —■— pH —◆— Peso seco (mg/mL)

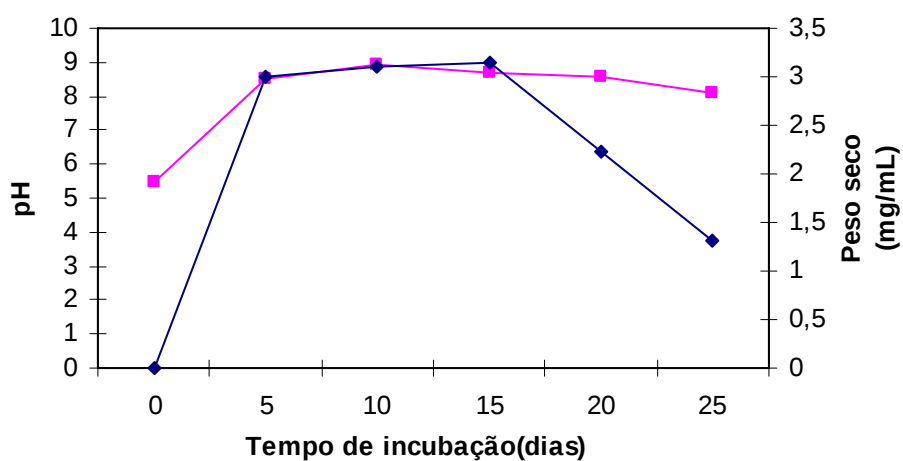


Figura 6 - Curva de biomassa e variação de pH durante a produção de queratinase por *Trichophyton mentagrophytes* 4156 —■— pH —◆— Peso seco (mg/mL)

6.2.2 Curva de Atividade proteásica e conteúdo protéico

A amostra de dermatófito *Microsporum canis* 4962, expressou sua maior atividade proteásica no vigésimo dia de cultivo, apresentando 5458 U/mg de atividade, enquanto que, a amostra *Trichophyton mentagrophytes* 4156, expressou sua maior atividade proteásica específica no quinto dia de cultivo, com 101 U/mg de atividade. Durante o período de cultivo (25 dias), os maiores picos de atividade proteásica coincidiram com os picos de menores valores de concentração protéica para ambas as amostras estudadas, conforme se pode observar nas figuras 7 e 8.

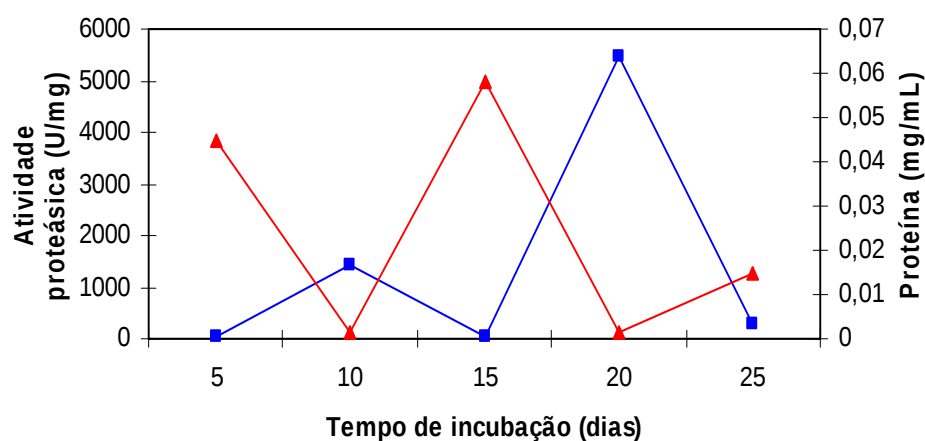


Figura 7. Curva de proteína e atividade proteásica da amostra *Microspoirum canis* 4962, obtida em meio líquido de queratina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

—■— Atividade específica (U/mg) —▲— Proteína (mg/mL)

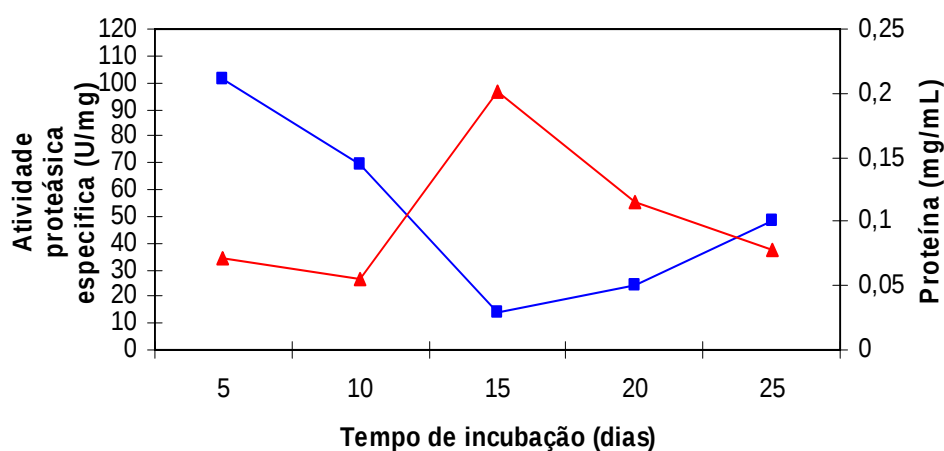


Figura 8. Curva de proteína e atividade proteolítica da amostra *Trichophyton mentagrophytes* 4156, obtida em meio líquido de queratina durante 25 dias a 37°, 120 rpm.

—■— Atividade específica (U/mg) —▲— Proteína (mg/mL)

6.3 Atividade queratinolítica

A amostra de dermatófito *Microsporum canis* 4962, expressou sua maior atividade queratinolítica no décimo dia de cultivo, apresentado o valor de 750 U/mg de atividade, coincidindo com o período onde houve a maior biomassa do microrganismo. Enquanto que, a amostra *Trichophyton mentagrophytes* 4156, expressou sua maior atividade queratinolítica no quinto dia de incubação, apresentando cerca de 19,3 U/mg de atividade, a qual ocorreu ao final da fase exponencial do crescimento. A atividade queratinolítica específica (figuras 5, 6 e 9).

A queratinase presente no extrato livre de células da cultura da amostra *Microsporum canis* 4962 (extrato bruto), expressou uma maior atividade em relação às queratinases da amostra *Trichophyton mentagrophytes* 4156, sendo então a caracterização parcial da enzima realizada a partir das queratinases da amostra *Microsporum canis* 4962.

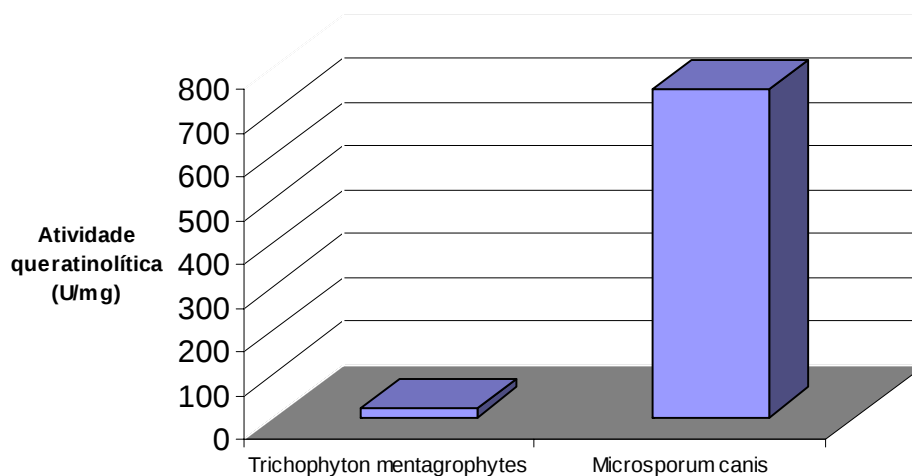


Figura 9 - Atividade queratinolítica obtida utilizando pena de galinha como substrato, a 37° por 2h. ■ Atividade queratinolítica (U/mg)

6.4 Efeito do pH e da temperatura na atividade e na estabilidade da queratinase

A atividade ótima da queratinase da amostra *Microsporum canis* 4962 foi demonstrada ao pH 9,0 e a temperatura de 80 °C (figuras 10 e 11).

A enzima demonstrou atividade considerável quando submetida à variação de temperatura e pH na faixa alcalina durante o período de 90 minutos. Apresentado uma atividade residual de 42% após esse período de incubação quando submetida a uma temperatura de 90 °C, e mantendo uma atividade acima de 60% na faixa alcalina de pH (8,0 a 10,0) acima de 60% (figuras 10 e 11).

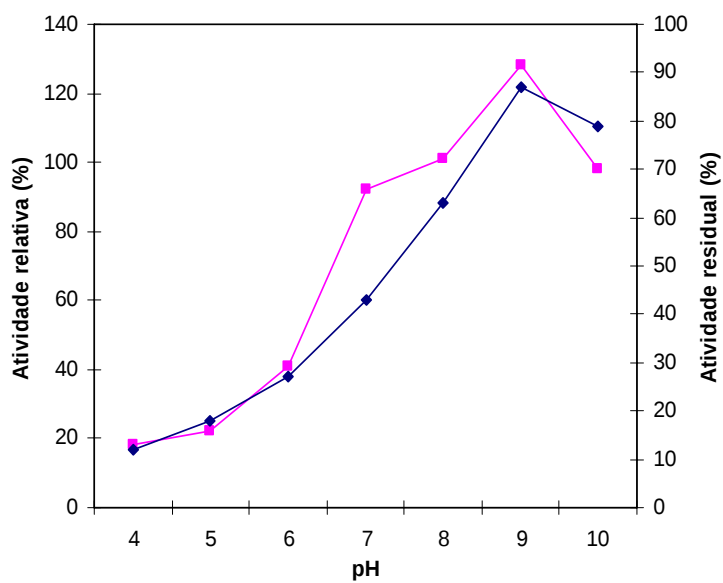


Figura 10 - Efeito do pH na atividade e na estabilidade da queratinase de *Microsporium canis* 4962 —■— Atividade relativa (%) —◆— Atividade residual (%)

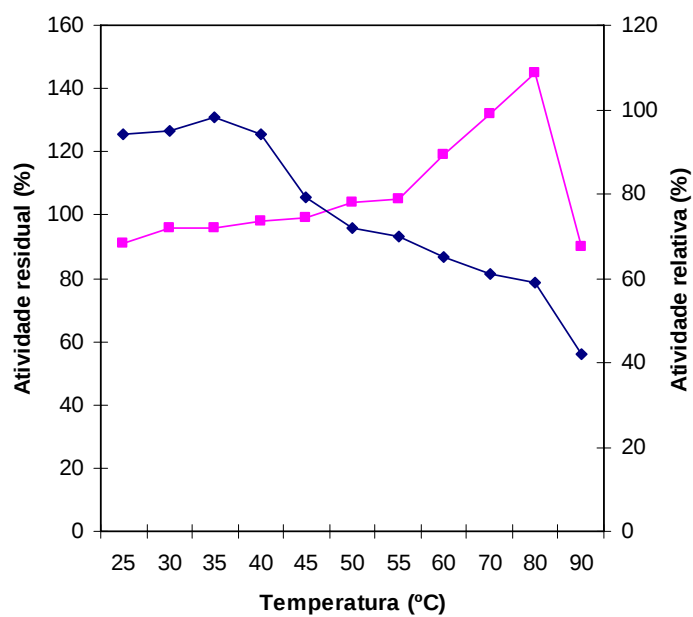


Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da queratinase de *Microsporium canis* 4962 —■— Temperatura ótima (%) —◆— Estabilidade à temperatura (%)

6.5 Ação de inibidores

A queratinase da amostra *Microsporum canis* 4962 foi totalmente inibida pelo inibidor de serino-protease (PMSF) enquanto que o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o ácido iodoacético e a pepstatina não apresentaram efeito inibitório sobre a enzima, demonstrando que a queratinase em estudo trata-se de uma serino-protease.

7 Discussão

As amostras de fungos dermatófitos estudadas sintetizaram uma enzima queratinolítica extracelular quando cultivadas em meios contendo queratina como única fonte de carbono e nitrogênio, confirmando os dados da literatura que afirmam que as queratinases microbianas são enzimas induzíveis pelo substrato (MALVIYA et al, 1992; CHENG et al, 1995; SIESENOP; BOHM, 1995).

A concentração de queratinase extracelular produzida pela amostra de *Microsporum canis* 4962 foi observada ao 10º dia de incubação desta amostra, no qual expressou uma atividade de 750 U/mg degradando a uma temperatura de 37º C por 2 horas. Torna-se difícil comparar a atividade queratinolítica deste microrganismo com os dados encontrados na literatura devido à variedade de queratina testada como substrato, porém a atividade do *Trichophyton mentagrophytes* apresentou 1,22 U/mg utilizando pelo de cobaio como substrato (MUHSIN; AUBAID, 2000), enquanto que uma queratinase isolada de *Trichophyton tonsurans* degradou queratina azule com atividade de 0,14 U/mg (SUSAN; RAHMAN, 2000). Ambas atividades de fungos dermatófitos mostraram-se inferiores à atividade queratinolítica obtida com a enzima da amostra de *Microsporum canis* 4962.

Os efeitos dos inibidores de proteases e os resultados do estudo de caracterização parcial mostraram que as queratinases detectadas podem ser classificadas como serino-proteases com um pH ótimo na faixa do alcalino, como é comum para a maioria das queratinases relatadas na literatura (GUPTA; RAMNANI, 2006).

A queratinase da amostra *Microsporum canis* 4962 mostrou temperatura ótima de 80ºC e termoestabilidade a altas temperaturas (70 - 90ºC), esta termoestabilidade é

comparável a de outras queratinases microbianas isoladas de espécies de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* com finalidades industriais (CHENG et al, 1995; LIN et al, 1992; HAMMED et al, 1996). Adicionalmente, a queratinase detectada da amostra *Microsporum canis* 4962 apresenta como pH ótimo o pH igual a 9,0 e estabilidade na faixa alcalina de pH (8,0 - 10,0), semelhantemente a enzimas como a queratinase de *Kocuria rosea* que vêm sendo estudada para utilização na indústria do couro, visto que estas indústrias requerem a utilização de enzimas que mantenham atividade em faixas elevadas de pH (BERNAL, et al, 2006).

8 Conclusão

As amostras de dermatófitos estudadas apresentaram atividade queratinolítica, com exceção da amostra de *Epidermophyton floccosum* 3195. A amostra de *Microsporum canis* 4962, que demonstrou a maior atividade queratinolítica em meio sólido, teve sua enzima produzida em cultura líquida submersa, apresentando uma atividade queratinolítica de 750 U/mg, temperatura ótima de 80° C e termoestabilidade a altas temperaturas (70 - 90°C), pH ótimo de 9,0 e estabilidade na faixa alcalina de pH entre 8,0 a 10,0, sendo classificada como uma serino-protease. Esta termoestabilidade permite a atuação da enzima em processos industriais que exijam altas temperaturas. Sua estabilidade na faixa alcalina do pH possibilita a atuação desta enzima na indústria do couro oferecendo um biotratamento efetivo particularmente no processo de depilação, sendo adequado para substituir processos químicos que causam poluição ambiental. Além de ser uma enzima promissora na utilização de processos biotecnológicos tais como: produção de ração animal a partir de farinha de pena, uso em cosméticos, biorremediação dos detritos da indústria avícola, entre outros.

Referências Bibliográficas

AGUT, M et al. Keratophilic fungi from soil of Brittany. **Mycopathologia**, França 129:81-82, 1995.

AHO, R. Mycological studies on zoophilic dermatophyte isolates of Finnish and Swedish origin. **Mycoses**, 31:295-302, 1998.

ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M. F. keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p.51-59, 2000.

ANBU, P. et al. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicalis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme Microb Technol**, 36:639-647, 2005.

ANWAR, A; SALEEMUDDIN, M. Alkaline protease: A review. **Bioresource Technology**, 64: 75-183, 1998.

ASAHI, M. R. et al. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. **Biochem J**, 232: 139-44, 1985.

BAXTER, M.; MANN, R. R. Electron microscopic studies of the invasion of human hair in vitro by three keratinophilic fungi. **Mycoses** 7:33-37, 1969.

BLANK, F. et al. Keratinolytic enzyme isolated from *Trichophyton mentagrophytes* and process therefore. **US Patent**, 3,678. 1972.

BÖCKLE A. et al. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Appl Environ Microbiol**, 61:3705-3710, 1995.

BON, E.; PEREIRA JÚNIOR, N. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro, 109p, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.

BRESSOLLIER, P. et al. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Appl Environ Microbiol**, 65: 2570-2576, 1999.

BRUTT, E. H; ICHIDA, J. M. Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. **US Patent 5,877,000**, 1999.

CHITTE, R. R. et al. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Lett Appl Microbiol**, 28: 131-136, 1999.

COSTA, M. et al. Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiânia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Goiania, v.35, p.19-22, 2002.

COULOMBE, P.A.; OMARY, M. B. Hard and soft principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr Opin Cell Biol**, 14: 110-22, 2002.

DAYANANDAN, A. et al. Application of an alkaline protease in leather processing: an eco-friendly approach. **J Cleaner Production**, 11: 533-3, 2003.

DOZIE, I. et al. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Cryosporium*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.563-567, 1994.

EICHNER, R.; KAHN, M. Differential extraction of keratin subunits and filaments from normal human epidermis. **J Cell Biol**, 110:1149-1158, 1990.

ELEWSKI, B. E. **Topics in Clinical Dermatology- Cutaneous Fungi Infection**. New York: Igaku-Shoin, 255 p 1992.

EL-NAGHY, M. A. et al. Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. **Mycopathologia**, v.143, p.77-84, 1998.

EL-REFAI. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. **Procbio**, Egito, v.40, p. 2325-2332, setembro, 2005.

ENGLISH, M.P. The Saprophytic Growth of Non-keratinophilic Fungi and keratinized Substrata. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 48(2) 219-235, 1969.

EVERSON, P. A. G. **Histochemistry the oretical and applied**. V.2, 3º ed., 1968.

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

FERNADES, N. C. et al. Dermatofitoses na criança: estudo de 137 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.43, p.83-85, 2001.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 302p, 1996.

FILIPELLO, M.V. et al. keratinophilic fungi in the soils of Papua New Guinea. **Mycopathologia**, 118: 113-119, 1969.

FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia: fundamentos e diagnósticos**. Rio de Janeiro: Revinter, p.116-147, 2001.

FRIEDRICH, A. B; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order thermotogales. **Appl Environ Microbiol**, 62: 2875-2882, 1996..

FRIEDRICH, J.; KERN, S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 21, 35-37, 2003.

FUCHS, E. Keratins and the skin. **Annu. Rev. Cell Dev.** 11: 123-153, 1995.

GESSESSE, A. et al. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enzyme and Microbial Technology**. V.32, p.519-524, 2003.

GRADISAR, H. et al. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 53: 196-200, 2000.

GREGG, R. From feathers to degradable plastic . BRI: end of mad cows disease. **Triangle Tech Journal** (<http://www.triangle techjournal.com>) 2006.

GUGNANI, H. C. Nodermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. **Polish journal of Environmental Studies**, vol. 12, n 4, 461-466, 2003.

GUPTA, R. et al. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 59:15-32, 2002.

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

HADAS, A. et al. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. **Fertil Res**, 38: 165-170, 1994

HELGREN, I.; VINCENT, J. Lipase activity of some dermatophytes. **J. Med Microbiol.**, v.13, p.155-157, 1980.

HODGSON, J. The changing bulk catalysis market: recombinant DNA techniques have changed bulk enzyme production dramatically. **Bio/Technology**, 12:789-790, 1994.

HOSHINO, E. et al. Hidrolysis of human horny cells by alkaline protease: morphological observation of the process. **JAOCS**, 72:785-791, 1995.

IGNATOVA, Z. et al. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candilus*. **Can J Microbiol**, 45: 217-222, 1999.

JIMÉNEZ, S. M. C. Enzimas extracelulares (fosfolipase, lipase, urease e protease) em amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas Micelial (M) e Leveduriforme (Y). 106f. Dissertação (Mestrado em Criptógamos)-UFPE, Recife, PE, Brasil, 1993.

KAUL, S.; SUMBALI, G. Production of extracellular keratinase by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*). **Mycopathologia**, v. 146, p. 19-24, 1999.

KIDA, K. et al. Enzymatic hydrolysis of the horn and buffalo. **J Ferment Bioeng**, 80: 478-484, 1995.

KIM, J. M. et al. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochem**, 37: 287-291, 2001.

KIM, et al. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria basiana* encoding bassiani I, an insect cuticle-degrading serine protease. **Biotechnology Letters**, 21:777-783, 1999.

KISE, H. et al. Protease-catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzymes in hydrophilic organic solvents. **Journal Biotechnonology**, 14: 239-254, 1990.

KITAYAMA, M. New low-temperature alkaline protease. **Patent JP 4271781**, 1992.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish protein hydrolysates, biochemical, and functional properties. **Critical Review in Food and Science Nutrition**, 40 (1): 43-81, 2000.

KUDRYA, V. A.; SIMONENKO, I. A. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 41: 505-509, 1994.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnological Advances**, 17: 561-594, 1999.

KUNEET, J. et al. Biochemical mechanism of keratin degradation by keratinolytic fungi. **Platinum jubilee volume of Indian Botanical Society**, p.89-98, 1995.

KWON CHUNG; BENNET, **Medical Mycology**, 1992.615p.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica** . 9 edição, Rio de Janeiro: Sarvier, 2002. 1104 p.

LANVEGELD, J. P. M. et al. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. **J Infect Dis**, 188; 1782-1789, 2003.

LATSHAW, J. D. et al. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed. Science Technology*., V.47, p.179-188, 1994.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J.Mol.Biol.**, v.76, p.103-122, 1973.

LETOURNEAU, F. et al. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S. K-02: a new isolated strain. **Lett Appl Microbiol**, 26:77-80, 1998.

LIN, X. et al. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. **Appl Environ Microbiol**, 62: 4273-4275, 1996.

LIN, X. et al. Recombinant Candidropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. **J. Biol. Chem.**, 268: 20143-20147, 1993.

LINDBERG, R.A. et al. Alkaline protease for *Neurospora crassa*. **Journal of Biological Chemistry**, 256: 811-814, 1981.

MALVIYA, H. K. et al. Synthesis and regulation of extracellular keratinase in there fungi isolated from the grounds of a gelatin factory. **Mycopathologia**, Jabalpur, India, v.120, p.1-4, 1992.

MARCHISIO, V. F. et al. Keratinolytic and keratinophylic fungi in the soils of Papua New Guinea. **Mycopathologia**, 115: 113-119, 1991.

MARCHISIO, V. F. et al. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi, **Mycopathologia**, v. 127, p.103-115, 1994.

MATSUBARA, H.; FEDER, J. Other Bacterial, Mold and yeast proteases. In: BOYER, P. D. **The Enzymes**, New York, 3, 721-796, 1996.

MIGNON, B. M. et al. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Med. Mycol.** 36: 395-404, 1998.

MINOCHA, Y. J. et al. Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesion. **Sabouraudia**, v.10, p.79-85, 1972.

MITSUIKI, S. et al. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.482-489, 2004.

MUHSIN, T. M.; HADI, R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Mycrobiologia**, v. 154, p.185-189, 2001.

MUKHOPADYAY, R. P.; CHANDRA, A.L. Keratinase of a streptomycete. **Ind J Exp Biol**, 28: 575-577, 1990.

MUSAHL, C.; AGUZZI, A. **Prions In: Lederberg J (ed) Encyclopedia of microbiology**, 2nd. Academic, San Diego, pp 809-823, 2000.

NAM, G. W. et al. Native feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. **Arch Microbiol**, 178: 538-547. 2002.

NEGI, M. et al. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. **J. Investing. Dermatol.**, 83: 32-36. 1984.

NICKERSON, W. J.; MOHAN, R. R. Studies on the nutrition and metabolism of *Streptomyces*. In: Symposium on Actinomycetales, **International Congress of Microbiology, 6^o Congress**, Roma, pp. 137-146, 1953.

OKAFOR, J. I.; NGWOGU, A. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. **Journal of Communicable Diseases**, v.32(4), p.300-305, 2000.

OKUDA, C. et al. Fungus invasion of human hair in tinea capitis caused by *Microsporum canis*. Light and green microscopic study. **Arch. Dermatol. Res.**, 181: 238-246, 1989.

ONIFADE, A. A. et al. A review: Potentials For Biotechnological Applications Of Keratin-Degrading Microorganisms And Their Enzymes For Nutritional Improvement Of Feathers And Other Keratins As Livestock Feed Resources. **Bioresource Technology**, v.66, p. 1-11, 1998.

OUTTRUP, H.; BOYCE, C. O. L. Microbial Proteinases and Biotechnology. In: FORGATY, W. M.; BOYCE, C. T. **Microbial Enzymes and Biotechnolgy**. 2 ed. New York: Elsevier, 227-253, 1990.

PAPADOPOULOS, M. C. et al. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal feed Science Technology**. V.14, p.279-290, 1986.

PRIEST, F. G. Extracellular Enzymes. **Ammerican Society for Microbiology**, Washington-USA, 79, 1984.

QIN, L. M. et al. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. **Zentralbl. Bakteriol.**, 277: 236-244. 1992.

RAMNANI, P. GUPTA, R. Optimization of médium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RGI using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnol Appl Biochem** 40: 491-496, 2004.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, 3, 597-635, 1998.

RASHID, A. et al. Na in vitro model of dermatophyte invasion of the human hair follicle. **J. Med. Vet. Mycol.**, 34: 37-42, 1996.

RAUBITISCHEK, F. Mechanical versus chemical keratolyses by dermatophytes. **Sabouraudia**, 1: 87-90, 1961.

REBELL, G.; TAPLIN, D. **Dermatophytes: their recognition and identification**. Florida: University of Miami Press, 1970.

RIFFEL, A. et al. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. **J Chem Technol Biotechnol**, 78: 855-859, 2003.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Arch Microbiol**, 179: 258-265, 2003.

RIPPON, J. W. **Tratado de Micologia Médica: hongos e actinomicetos patógenos**. 3 ed. México: Interamericana, 1990. 855 p.

RISSEN, S. ANTRANIKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles** 5: 399-408, (2001)..

SAFRANEK, W.W. Goos RD Degradation of wool by saprophytic fungi. **Can J Microbiol**, 28: 137-140, 1982.

SAID; PIETRO. **Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Eventos p.71-73, 2002.

SANGALI, S.; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Strain kr2. **J Appl Microbiol**, 89: 735-743, 2000.

SANYAL, A. K. et al. Purification and partial characterization of exocellular proteinase from *Trichopyton rubrum*. **Saboraudia**, v.23, p.165-178. 1985.

SIESENOP, U.; BOHM, K.H. Comperetive studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. **Mycoses**, 38: 205-9, 1995.

STEINER, R. J. et al. Feather and hair meals for ruminants. Part: IV. Effect of chemical treatments of feather and processing time on digestibility. **Journal Animal Science.**, V.57, p.495-502, 1983.

SUMNER, J.; MYRBACK, K. **The Enzymes: chemistry and mechanism of action.** New York: Academic Press, 1951.

TAKAMI, H. et al. Reidentification of the keratinize-producing facultatively *alkaliphilic* *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. **Extremophiles**, 3: 293-296, 1999.

TAKIUCHI, I. Y. et al. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. **Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.**, 22: 219-224, 1984.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Catalisadores biológicos e seu potencial industrial. **Rev. UFAM**, Série: Ciências da Saúde, v.3, n.1/2, p.1-12, 1994.

THYS R. C. S. et al. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Lett Appl Microbiol**, 39: 181-186, 2004.

TSUBOI, R. et al. Isolation of a keratinolytic proteinase from *Thichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infect. Immun.**, 57: 3479-3483, 1984.

VIANI, F. C. et al. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**. V. 114, p. 1-8, 1991.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meal. **Poultry Science.**, V. 76, p.491-486, 1997.

WAWRZKIEWICZ, K. Screening the keratinolytic Activity of dermatophytes *in vitro*. **Mycopathologia** 114, 1-8, 1991.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Review**, v. 8, n.2, p. 240, 259, 1995.

YAMAMURA, S. et al. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. **J Biosci Bioeng**, 93: 595-600, 2002.

YU, R. J. et al. Two-cell-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. **Investigation Dermatology**, v.56, p.27-32, 1971.

ZAITS, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998, 43p.