OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES DE FUNGOS PROCEDENTES DO SOLO, ESTOCADOS NA MICOTECA URM

MINELLI ALBUQUERQUE SOUSA

RECIFE

12/2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES DE FUNGOS PROCEDENTES DO SOLO, ESTOCADOS NA MICOTECA URM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia
Nome do aluno: Minelli Albuquerque Sousa
Orientador: Cristina Maria de Souza Motta
Co-orientadores: Ana Lúcia Figueiredo Porto; Adalberto Pessoa Jr.

RECIFE

12/2011

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Sousa, Minelli Albuquerque

Otimização da produção, caracterização enzimática e purificação de queratinases de fungos procedentes do solo, estocados na Micoteca URM / Minelli Albuquerque Sousa- Recife: O Autor, 2011.

142 folhas: il., fig., tab.
Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta
Coorientadores: Ana Lúcia Figueiredo Porto e Adalberto Pessoa Júnior
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2011.
Inclui referências

1. Fungos filamentosos 2. Enzimas proteolíticas 3. Biotecnologia I. Motta, Cristina Maria de Souza (orient.) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (coorient.) III. Pessoa Júnior, Adalberto (coorient.) IV. Título

579.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017- 433

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES DE FUNGOS PROCEDENTES DO SOLO, ESTOCADOS NA MICOTECA URM

MINELLI ALBUQUERQUE SOUSA

Data da defesa: 20/12/2011

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

_____

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Keila Aparecida Moreira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____

Dra. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____

Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Vencerás

Não desanimes.
Persiste mais um tanto.
Não cultive pessimismo.
Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo.
Avança, ainda que entre lágrimas.
Edifica sempre.
Não desista da paciência.
Não creia em realização sem esforço.
Perdão as ofensas.
Estuda, buscando aprender.
Conserve o hábito da oração.
Rsguarda-te em Deus.
Ama sempre.
Age auxiliando. Serve sem apego.
E assim vencerás.

Emmanuel
Psicografia de Chico Xavier

Agradecimentos

Àquele que esteve presente em todos os momentos especialmente os difíceis, concedendo oportunidade de aprendizado, revelando seu poder e sua glória a cada instante da minha vida: **Deus.**

Aos **meus pais, Carlos Augusto Tavares de Sousa e Maria do Socorro Albuquerque Sousa,** pois sem este apoio eu nada seria.

As minhas **irmãs, Mirelli Albuquerque Sousa e Camylla Karine Albuquerque Sousa,** pela ajuda, compreensão, carinho e incentivo fundamentais para a realização desta dissertação.

Ao meu **amor, Davi Rodrigo Lucena Silva,** pela ajuda, compreensão, carinho, incentivo e especialmente pela grande paciência.

À minha orientadora, **Dra. Cristina Maria de Souza Motta** e co-orientadores **Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e Dr. Adalberto Pessoa Júnior** pela excelente orientação, dedicação, compreensão e incentivo fundamentais para a realização desta dissertação.

A professora **Dr. Tatiana Porto**, da Universidade Federal Rual de Pernambuco, Centro Acadêmico de Garanhuns, pelo apoio, ensinamentos e grande colaboração para realização desta dissertação.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, pelos ensinamentos passados e principalmente pela amizade e incentivo durante toda a minha permanência no Departamento de Micologia.

Aos meus queridos amigos do departamento, pela amizade, incentivo, força e pelos momentos de descontração fundamentais para a realização desta dissertação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos (PPGBF), a Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

RESUMO GERAL

Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas comuns, tornando-se importante o estudo de microrganismos produtores de queratinases para ser usado na indústria biotecnológica. O objetivo deste estudo foi selecionar fungos isolados do solo armazenados na Micoteca URM, para ser empregado na síntese de queratinases extracelular, caracterizar as cepas quanto a capacidade queratinolítica, efeito de diferentes substratos, da composição do meio e das condições de cultivo na produção de queratinase em cultivo submerso, otimizara aprodução, caracterizar e purificar a enzima. Para a determinação da capacidade de utilizar substratos queratinosos, 50 cepas fúngicas foram utilizadas. Elas foram cultivadas em fermentação submersa em meio contendo sais e penas durante 10 dias a 30 °C em agitador orbital a 120 rpm. Para avaliar a capacidade queratinolítica e o efeito de diferentes substratos na produção da queratinase foram utilizadas as seguintes cepas: Aspergillus sulphureus URM 5029, A. avenaceus URM5051, A. sclerotiorum URM5586 e Trichoderma aureoviride URM5574. Com a linhagem que apresentou a melhor produção e o melhor substrato, foi realizado estudos do efeito da composição do meio, condições de cultivo na produção da queratinase, otimização da produção, caracterização e purificação da enzima. Aspergillus sulphureus, Trichoderma aureoviride, Aspergillus avenaceus e A. sclerotiorum mostraram os melhores resultados com 7,35 U /ml, 7,2 U/ml, 6,7 U/ml e 6,05 U/ml de atividade queratinolítica, respectivamente. As espécies testadas se destacaram na colonização dos diferentes substratos queratinosos e o melhor substrato para a produção de queratinase foi a pena de frango. A produção de queratinase por A. sulphureus foi incrementada nas seguintes condições: 2 g/50 ml de pena de frango, 0,1 g/50 ml de $NaNo_3$, 0,001 g/50 ml de $CaCl_2$, pH 7,8, 35ºC, 160 rpm e 10^6 esporos/ml em cultivo líquido submerso em 10 dias de incubação. A partir desses resultados foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4, para otimizar a produção da queartinase, e as melhores condições de produção foram: pH 8,0, 36 °C, 120 rpm, 2,5% (p/v) de penas de frango em 10 dias, com a máxima atividade de 10,06 U/ml, mostrando um aumento de 1,44 vezes. A queratinase de A. sulphureus apresentou melhor atividade em pH 10,0 e 35 ºC e é pouco inibida na presença de íons metais (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) e PMSF e fortemente inibida por EDTA, sugerindo ser uma metaloprotease. As melhores condições para purificação da queratinase de Aspergillus sulphureus, após análise estatística, foram: massa molecular do PEG, 8000; concentração do PEG, 20% e concentração de citrato 15%, apresentando aumento de pureza e recuperação queratinolítica de 25,04 e 184,9%, respectivamente. Com base nos resultados, concluímos que a preservação, sob óleo mineral é satisfatório para manter a viabilidade e a taxonomia das culturas por longos períodos de tempo e os microorganismos do solo podem ser uma interessante fonte de fungos produtores de queratinases. Além disso a capacidade da queratinase de A. sulphureus ser estável em uma ampla faixa de pH (6,5–9,0) e temperatura (25–60 °C) sugere o uso desta cepa em processos biotecnológicos industriais.

Palavras-chave: queratinases, produção, purificação, fungos filamentosos.

ABSTRACT

Keratinous materials are insoluble and resistant to degradation by common proteolytic enzymes, making it important to study keratinases producing microorganisms for use in the biotechnology industry. The aim of this study was to select fungi isolated from soil stored in the URM Culture Collection, to be employed in the synthesis of extracellular keratinases, characterize the strains and the ability queratinolítica, effect of different substrates, the medium composition and cultivation conditions in the production of keratinase in submerged culture, aprodução optimize, characterize and purify the enzyme. To determine the ability to use keratinous substrates, 50 fungal strains were used. They were grown in submerged fermentation in medium containing salts and penalties for 10 days at 30 ° C on an orbital shaker at 120 rpm. To assess the ability queratinolítica and the effect of different substrates on keratinase production we used the following strains: Aspergillus sulphureus URM 5029, A. avenaceus URM5051, A. sclerotiorum URM5586 and Trichoderma aureoviride URM5574. With a lineage that had the best production and best substrate, was carried out studies of the effect of medium composition, cultivation conditions on keratinase production, production optimization, characterization and purification of the enzyme. Aspergillus sulphureus, Trichoderma aureoviride, Aspergillus avenaceus and A. sclerotiorum showed the best results with 7.35 U / ml, 7.2 U / ml, 6.7 U / ml and 6.05 U / ml keratinolytic activity, respectively. The species tested stood out in the colonization of different keratinous substrates and the best substrate for the production of keratinase was the poultry feathers. Keratinase production by A. sulphureus was increased in the following conditions: 2 g/50 ml of poultry feathers, 0.1 g/50 ml of NaNO3, CaCl2 0.001 g/50 ml, pH 7.8, 35 ° C, 160 rpm and 106 spore/ml in submerged in liquid culture 10 days of incubation. From these results we carried out a full 2^4 factorial design to optimize the production of queartinase, and the best production conditions were: pH 8.0, 36 ° C, 120 rpm, 2.5% (w/v) feather chicken in 10 days, with maximum activity of 10.06 U/ml, showing an increase of 1.44 times. The keratinase of A. sulphureus showed better activity at pH 10.0 and 35 ° C and is slightly inhibited in the presence of metal ions (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) and PMSF and strongly inhibited by EDTA, suggesting that a metalloprotease. The best conditions for purification of keratinase from Aspergillus sulphureus, after statistical analysis were: molecular weight of PEG 8000, PEG concentration, 20% and 15% concentration of citrate, an increase of purity and keratinolytic recovery of 25.04 and 184.9%, respectively. Based on the results, we conclude that the preservation under mineral oil is satisfactory to maintain the viability and taxonomy of cultures for long periods of time and soil microorganisms may be an interesting source of keratinases producing fungi. Furthermore the ability of keratinase of A. sulphureus be stable over a wide pH range (6.5 to 9.0) and temperature (25-60 ° C) suggests the use of this strain in industrial biotechnology processes.

Key-words: keratinases, production, purification, filamentous fungi.

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1 – Micrografia eletrônica do conídio de *Aspergillus sulphureus* URM5029 (**a**), *Trichoderma aureoviride* URM5574 (**b**), *Aspergillus avenaceus* URM5586 (**c**) and *A. scleroiorum* URM5586 (**d**). **89**

Figura 2 – Efeito e estabilidade ao pH (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029. **94**

Figura 3 - Efeito e estabilidade a temperatura (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029. **94**

Capítulo 2

Figura 1 - Colonização de diferentes substratos após 10 dias: **A-** Pena (*Trichoderma aureoviride* URM5574); **B-** Crina de cavalo (*Aspergillus avenaceus* URM5051); **C-** Cabelo humano (*A. sulphureus* URM5029) e **D-** Unha (*A. sclerotiorum* URM5586). **103**

Figura 2 - Efeitos de diferentes substratos na produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586. **104**

Figura 3 – Efeito e estabilidade ao pH (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029. **109**

Figura 4 - Efeito e estabilidade a temperatura (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029. **110**

Capítulo 3

Figura 1 - Gráfico de Pareto sobre os efeitos das diferentes variáveis, com 10 dias de fermentação, testadas no experimento para a produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus*. O ponto em que os efeitos são estatisticamente significativos (p = 0,05) é indicado pela linha vertical tracejada. **121**

Figura 2 - Gráfico de Pareto sobre os efeitos das diferentes variáveis no **(a)** aumento de pureza; **(b)** recuperação queratinolítica e **(c)** coeficiente de partição. O ponto em que os efeitos são estatisticamente significativos (p = 0,05) é indicado pela linha vertical tracejada. **125**

Lista de tabelas

Fundamentação teórica

Tabela 1 - Trabalhos mostrando as principais características da queratinase produzida por diferentes fungos. **19**

Tabela 2 – Aplicação das queratinases. **26**

Tabela 3 - Técnicas de isolamento, substratos e gêneros de fungos queratinofílicos. **33**

Tabela 4 - Condições de cultivo de fungos produtores de queratinase e substratos utilizados. **53**

Tabela 5 - Melhores condições para a produção de queartinase por diferentes fungos, variáveis estudadas e metodologia aplicada. **54**

Tabela 6 - Métodos de purificação, características bioquímicas e substratos degradados pela queratinase purificada por diferentes fungos. **69**

Material e métodos

Tabela 7 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de queratinase com 5, 7, 9 e 10 dias de produção. **80**

Tabela 8 - Níveis dos fatores utilizados na extração da queratinase por SDFA (PEG/Citrato). **83**

Capítulo 1

Tabela 1 – Viabilidade, autenticação taxonômica e atividade queratinolítica de cultura de fungos preservadas em óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM. **92**

Tabela 2 – Efeito de inibidores na atividade da queratinase secretada por *Aspergillus sulphureus*. **96**

Tabela 3 - Efeito de íons metal na atividade da queratinase secretada por *Aspergillus sulphureus*. **96**

Capítulo 2

Tabela 1 - Efeito da concentração de penas na produção de queratinases. **105**

Tabela 2 - Efeito da concentração de $NaNo_3$ na produção de queratinases. **106**

Tabela 3 - Efeito da concentração de $CaCl_2$ na produção de queratinases. **106**

Tabela 4 - Efeito do pH na produção de queratinases. **107**

Tabela 5 - Efeito do inóculo na produção de queratinases. **108**

Tabela 6 - Efeito da agitação na produção de queratinases. **108**

Tabela 7 - Efeito da temperatura na produção de queratinases. **108**

Tabela 8 - Efeito dos inibidores na atividade queratinolítica de *A. sulphureus* URM5029. **112**

Tabela 9 - Efeito de ínos metálicos na atividade da queratinase secretada por *A. sulphureus* URM5029. **112**

Capítulo 3

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de queratinase com 5, 7, 9 e 10 dias de produção. **117**

Tabela 2 - Níveis dos fatores utilizados na extração da queratinase por SDFA (PEG/Citrato). **118**

Tabela 3 - Matriz de planejamento estatístico dos níveis de variáveis experimentais, para produção de queratinase após fermentação em 5, 7, 9 e 10 dias por *Aspergillus sulphureus* URM5029, utilizando penas de frango como substrato. **120**

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial experimental completo 2^3, coeficiente de partição (K), recuperação queratinolítica (RQ) e aumento de pureza (AP) na fase de topo. **123**

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	**14**
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	**17**
2.1. Queratinases	**17**
2.2. Caracterização das queratinases	**19**
2.3. Potencial de Aplicação das Queratinases	**26**
2.3.1. Processamento e bioconservação de resíduos de queratina	**28**
2.3.2. Indústria de processamento do couro	**30**
2.3.3. Indústria Farmacêutica	**31**
2.3.4. Formulação de detergentes	**31**
2.3.5. Degradação de "prions"	**32**
2.3.6. Outras aplicações	**32**
2.4. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos	**33**
2.5. Produção e otimização de produção das queratinases	**52**
2.6. Purificação das queratinases	**68**
3. MATERIAL E MÉTODOS	**78**
3.1. Amostras de fungos	**78**
3.2. Reativação das culturas	**78**
3.3. Autenticação taxonômica	**78**
3.4. Cultivo submerso	**78**
3.5. Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica	**79**
3.6. Potencial queratinolítico	**79**
3.7. Efeito de diferentes parâmetros na produção da queratinase	**79**
3.8. Produção de queratinase	**80**
3.8.1. Design estatístico experimental	**80**
3.8.2. Design Box, Hunter & Hunter	**80**
3.9. Métodos analíticos	**81**
3.9.1. Determinação da biomassa e do pH	**81**
3.9.2. Determinação da atividade enzimática	**81**
3.9.3. Dosagem do conteúdo de proteínas	**81**
3.10. Caracterização do extrato bruto	**81**
3.10.1. Efeito e estabilidade ao pH e temperatura	**81**
3.10.2. Efeito dos inibidores de protease e íons metais	**82**
3.11. Purificação da enzima	**82**
3.11.1. Estudos de partição da queratinase em sistema bifásico aquoso PEG/Citrato	**82**
3.11.2. Planejamento fatorial para otimização da extração da queratinase	**82**
3.11.3. Fator de purificação, recuperação queratinolítica e coeficiente de partição	**83**
4. CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR FUNGOS ISOLADOS DO SOLO PRESERVADOS EM ÓLEO MINERAL NA MICOTECA URM	**84**
Resumo	**84**
Introdução	**84**
Material e métodos	**86**
Fungos	**86**
Reativação das culturas	**86**

Cultivo submerso **86**
Dosagem da atividade queratinolítica **87**
Efeito e estabilidade ao pH e temperatura **87**
Efeito de inibidores na atividade queratinolítica **87**
Efeitos de ínos metais na atividade queratinolítica **88**
Resultados e discussão **88**
Viabilidade das culturas de fungos **88**
Produção da queratinase **89**
Efeito do pH e temperatura na atividade da queratinase e estabilidade **93**
Efeitos de químicos e ions metais na atividade queratinolítica **95**
Conclusões **98**
5. CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS DA COMPOSIÇÃO DO MEIO E DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE QUERATINASES POR FUNGOS EM CULTIVO LÍQUIDO SUBMERSO **99**
Resumo **99**
Introdução **99**
Material e métodos **100**
Amostras de fungos **100**
Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica **100**
Potencial queratinolítico **101**
Determinação da atividade enzimática **101**
Efeito de diferentes parâmetros na produção da queratinase **101**
Caracterização da queratinase **102**
Efeito e estabilidade ao pH e temperatura **102**
Efeito dos inibidores de protease e íons metais **102**
Resultados e discussão **102**
Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica **102**
Potencial queratinolítico **103**
Efeitos da concentração de substrato, $NaNO_3$ e $CaCl_2$ na produção de queratinases **105**
Efeitos das condições de cultura na produção de queratinases **107**
Caracterização do extrato bruto **109**
Efeito e estabilidade ao pH e temperatura **109**
Efeito dos inibidores de protease e íons metais **111**
Conclusões **114**
6. PURIFICAÇÃO E CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA PRODUÇÃO DE QUERATINASE POR *Aspergillus sulphureus* URM5029 USANDO PENA DE FRANGO COMO SUBSTRATO **115**
Resumo **115**
Introdução **115**
Material e métodos **117**
Micro-organismo **117**
Produção de queratinase **117**
Design Box, Hunter & Hunter **117**
Determinação da atividade enzimática **117**
Purificação da enzima **118**

Estudos de partição da queratinase em sistema bifásico aquoso PEG/Citrato **118**
Planejamento fatorial para otimização da extração da queratinase **118**
Fator de purificação, recuperação queratinolítica e coeficiente de partição **118**
Resultados e discussão **119**
Produção de queratinase **119**
Purificação da queratinase **123**
Conclusões **126**
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS **127**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **128**

1. INTRODUÇÃO

A coleção de Culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, conta atualmente com cerca de 9.000 culturas de fungos filamentosos e leveduras, preservadas pelos métodos liofilização, óleo mineral e água destilada esterilizada, procedentes de diversos substratos e ambientes, dentre os quais destacamos o solo.

O solo tem sido considerado um reservatório natural de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos. Substratos de várias origens ricos em queratina podem juntar-se ao solo na forma de pêlo, cabelo, unha, casco, chifre e apêndices relacionados. Em geral, os ambientes mapeados e relatados como ricos destes fungos, são os solos de áreas densamente povoadas, jardins públicos, "playgrounds", fazendas de galináceos e de gado e outros lugares ocupados por animais e materiais orgânicos em decomposição (Mercantini et al., 1989; Ali-Shtayeh, 1989; Al-Musallam, 1990; Kaul e Sumbali, 1994).

Os fungos queratinofilicos pertencem ao maior grupo de organismos capazes de usar a queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. Secreção de enzimas queratinoliticas tem sido demonstrada em alguns fungos patogênicos que podem causar infecções por invadir a pele ou couro cabeludo de mamíferos, entretanto, tais enzimas não são exclusivamente associadas a fungos patogênicos visto que também são encontradas em algumas espécies geofílicas (Moallaei et al., 2006).

As queratinases (E.C. 3.4.9.11) pertencem ao grupo das hidrólises de serinas que são capazes de degradar a queratina, um polipeptídio formado por unidades de aminoácidos, com massa molar da ordem de 10.000 $g.mol^{-1}$, apresentando resíduos de cisteína na proporção de 7 a 20% do número total de resíduos de aminoácidos (Onifade et al., 1998). Pertencem a classe das proteínas fibrosas, com formação de pontes disulfeto inter e intramolecular, resultando em um material com características de conformação rígida e tenaz, devido à rede tridimensional das fibras de queratina (Schrooyen et al, 2001; Romnani e Gupta, 2004; Anbu et al., 2007).

As queratinases microbianas têm se tornado biotecnologicamente importantes, devido a capacidade destas enzimas de hidrolisar a queratina, uma escleroproteína, insolúvel em água e em solventes orgânicos, e resistente a ácidos e álcalis diluídos. Estas enzimas são amplamente produzidas por microrganismos na presença de

substratos queratinosos como cabelo, pena, lã, unha, chifre, etc., durante sua degradação. O complexo mecanismo da queratinólise envolve ações cooperativas dos sistemas sulfitolíticos e proteolíticos. As queratinases atuam em uma ampla faixa de temperatura e pH e são na maioria das vezes, serina ou metalo proteases.

Uma grande diversidade de bactérias e fungos são fontes de queratinases que são, na maioria das vezes, extracelulares. Em geral, os fungos queratinolíticos pertencem aos fungos imperfeitos, incluindo espécies dos gêneros: *Chrysosporium, Aspergillus, Alternaria, Trichurus, Curvularia, Cladosporium, Fusarium, Geomyces, Gleomastis, Monodictys, Myrothecium, Paecilomyces, Stachybotrys, Urocladium, Scopulariopsis, Sepedonium, Penicillium, Doratomyces* (Gradisar et al., 2000).

Embora as queratinases dos dermatófitos sejam bastante conhecidas em relação à natureza patogênica destes fungos (Sohnle e Wagner, 2000), estas enzimas ganharam recentemente impulso biotecnológico, devido ao isolamento de queratinases de microrganismos não patogênicos que possuem habilidade em degradar a queratina insolúvel de penas e transformá-las em alimentos economicamente úteis (Lin et al., 1999; Riffel et al., 2003), fertilizadores nitrogenados, colas e lâminas (Friedrich e Antranikian, 1996; Schrooyen et al., 2001; De Toni et al., 2002). As queratinases são utilizadas tradicionalmente em diversos setores industriais como na produção de detergentes, de cosméticos, de couros, de ração (Farag e Hassan, 2004), na medicina, assim como em novos campos como no tratamento da doença do mal da vaca louca (Langeveld et al., 2003) e na manufatura de plásticos biodegradáveis.

Por outro lado, resíduos ambientais são encontrados em grandes quantidades em muitos países. Embora alguns deles contenham uma considerável quantidade de proteínas e vários compostos de carbono, pouca atenção tem sido dada para utilização ou reciclamento desses resíduos no meio tecnológico. Adicionalmente, o acúmulo de alguns desses resíduos na natureza é considerada uma séria fonte de poluição e um perigo para a saúde. Sendo as penas compostas por queratina (90% ou mais), resíduo de penas representam uma alternativa potencial para a expansiva dieta alimentar de animais de interesse pecuário (Santos et al., 1996). Geralmente, estes resíduos passam por tratamentos físicos e químicos. Esses processos requerem significante energia e também destroem certos aminoácidos (Noronha et al., 2002). Portanto, a biodegradação da queratina por microrganismos representa um método alternativo para melhorar o valor nutricional de resíduos de penas e para prevenir a contaminação do ambiente (Farag e Hassan, 2004; Gupta e Rammani, 2006).

As enzimas queratinolíticas são geralmente produzidas em fermentação submersa por fungos e bactérias (Onifade et al., 1998). Essa produção é muito influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e por outros fatores como concentração do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação, essencialmente, cada organismo ou extrato tem suas condições especiais de produção máxima da enzima (Puri et al., 2002; Anbu et al., 2007). O estudo de processos de otimização através de um design fatorial e análise das respostas são importantes para determinar as condições ótimas do processo de produção da queratinase extracelular (Anbu et al., 2007).

As queratinases purificadas até hoje são principalmente proteína serina alcalina com alto nível de atividade em substratos de proteínas insolúveis. Os estudos de caracterização e purificação das queratinases têm caminhado na direção do entendimento dos mecanismos de degradação da queratina, identificação molecular dos genes envolvidos e otimização da produção e uso dessas enzimas (Bernal et al., 2006).

Este trabalho de tese teve por objetivo avaliar a capacidade queratinolítica de fungos filamentosos do solo, estocados na Micoteca-URM, selecionar a linhagem mais promissora para a produção da queratinase e avaliar parâmetros de melhores condições para produção dessa enzima, caracterizar e purificar a queratinase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Queratinases

As queratinases pertencem ao grupo das proteases, 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 sitio ativo (Said e Pietro, 2004).

De acordo com o comitê internacional de nomenclaturas (International Union of Biochemisty), proteases são hidrolases classificadas no subgrupo 5, do grupo 3. Essas enzimas têm classificação diversificada, não obedecem facilmente as regras de nomenclatura, devido a diversidade de ação e estrutura (Rao et al., 1998).

Com base no ponto de clivagem da cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são grosseiramente divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas as extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (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 valores de pH entre 6,0 e 8,0. em relação as proteases alcalinas, essas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 (Rao et al., 1998).

As proteases sugerem a atividade patogênica de fungos de importância médica, estando relacionada com a propagação no hospedeiro durante o processo invasivo (Weitzman e Smmerbell, 1995).

As queratinases da maioria das bactérias, actinomicetos e fungos apresentam pH ótimo na faixa de neutro a alcalino (Letourneau et al., 1998; Gradisar et al., 2000; Sangali e Brandelli, 2000; Rissen e Antranikian, 2001; Riffel et al., 2003; Farag e Hassan, 2004; Thys et al., 2004; Anbu et al., 2005). Contudo, um pequeno número de queratinases possui pH ótimo na faixa de alcalinidade extrema, acima de 12,0 (Takami et al., 1999; Mitsuiki et al., 2004).

A temperatura ótima das queratinases está em uma 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 de atividade excepcionalmente alta entre 90 e 100 °C, com meia vida de 30 e 90 minutos, respectivamente.

Gupta e Ramnani (2006) fizeram uma revisão sobre as queratinases microbianas que se tornaram biotecnologicamente importantes, uma vez que o objetivo da hidrólise da "Queratina", formada por polipeptídios fortemente cruzados. Essas enzimas são largamente produzidas na presença de substratos de queratina na forma de cabelos, penas, lã, unhas, durante a sua degradação. O complexo mecanismo queratinolítico envolve ação cooperativa de sistemas proteolítica e sulfitolítico. Queratinases são enzimas estáveis, com atividade em uma ampla faixa de temperatura e pH e são na sua maioria serinas ou metaloproteases. Seqüência de homologias de queratinases indicou a sua relação com a família das serina proteases. Destacam-se entre proteases, uma vez que atacam os resíduos de queratina da pena e, conseqüentemente, encontram aplicação no desenvolvimento custo-benefício dos subprodutos para alimentação animal e fertilizantes. Sua aplicação também pode ser estendida para industrias de detergentes e de couro onde servem como enzimas especiais. Além disso, essas enzimas também encontram aplicação na limpeza da lã e seda e na indústria do couro. Além disso, sua aplicação na perspectiva desafiante do domínio da degradação do “prion” iria revolucionar o mundo das proteases em um futuro próximo.

Brandelli et al. (2010) estudaram as queratinases que são enzimas proteolíticas que possuem a capacidade de degradar proteínas insolúveis como a queratina. Essas enzimas são produzidas por diversos microorganismos pertencentes aos domínios Eucarya, Bacteria e Archea. As queratinases possuem uma grande diversidade em suas propriedades bioquímicas e biofísicas. A maioria as queratinases são otimamente ativas em pH neutro a alcalino e 40-60 °C, mas exemplos de microrganismos queratinolíticos em condições alcalínica e termofílica foram bem documentados. Varias queratinases têm sido associadas a família subtilisina de proteases do tipo serina. Estudos com substratos específicos e inibidores indicaram que as queratinases muitas vezes são serina ou metaloproteases com preferência por resíduos hidrofóbicos e aromáticos na posição P1. As enzimas queratinolítica possuem diversas aplicações atuais e potenciais em agroindustrias, farmacêuticas e biomédicas. Seu uso na conversão da biomassa em

biocombustíveis pode chamar a atenção para a crescente preocupação com a conservação de energia e reciclagem.

2.2. Caracterização das queratinases

As queratinase são classificadas de acordo com seu pH e temperatura ótimos de atividade, neste contexto apresentam pH ótimo na faixa de neutro a alcalino e temperatura ótima está em uma faixa entre 30 e 80 °C. Além disso, as queratonases são clasificadas em serina proteases ou metaloproteases de acordo com o seu sítio ativo, assim, queratinases inibidas por EDTA e EGTA possuem no seu sítio ativo diferentes metais e neste caso são classificadas como metaloproteases, quando o sítio ativo da enzima é inibido por PMSF são classificadas como serina proteases. Na Tabela 1 é mostrado alguns trabalhos com as principais características apresentadas pela queratinase produzida por difrentes fungos.

Tabela 1 Trabalhos mostrando as principais características da queratinase produzida por diferentes fungos.

Fungos	**Caracterização**	**Referências**
Candida sp	Inibida: Pepstatina A	Ray e Payne 1990
Aspergillus funigatus	Atividade reduzida por agentes redutores e cátions. Inibida: EDTA, 1, 10-fenantroline e fosforamido. Metaloprotease	Monod et al. 1993
Doratomyces microsporus	pH ótimo 8,0-9,0 e 50 °C; Inibida: PMSF. Serina.	Gradisar et al. 2000
Microsporum canis	pH ótimo 8,0 e 50 °C; Inibida: EDTA. Metaloprotease.	Brouta et al. 2001
Chrysosporium keratinophilum	pH ótimo 8,0 e 40 °C.	Singh 2002
Aspergillus oryzae	pH ótimo 8,0 e 50 °C; Inibida: EDTA, Pb. Metaloprotease.	Farag e Hassan 2004
Scopulariopsis brevicaulis	pH ótimo 8,0 e 40 °C; Inibida: PMSF. Serina.	Anbu et al. 2005

Cont.

Fungos	**Caracterização**	**Referências**
Trichophyton vanbreuseghemii	pH ótimo 8,0. Serina.	Moallaei et al. 2006
Mirothecium verrucaria	pH ótimo 8,0-9,0 e 40 °C; Inibida: PMSF. Serina.	Moreira et al. 2007
Trichoderma atroviride	pH ótimo 8,9-9,0 e 50-60 °C; Inibida: SDS e PMSF. Serina.	Cao et al. 2008
Pichia pastoris recombinante	pH ótimo 8,0 e 60 °C. Inibida: Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{3+}	Lin et al. 2009
Penicillium sp.	Enzima Ahm1: pH 6,0-8,0 a 50 °C; Enzima Ahm2: pH 6,0-11,0 a 60-65 °C; Inibidas: EDTA e EGTA. Metaloprotease.	El-Gendy 2010

Ray e Payne (1990) caracterizaram proteinases ácidas de *Candida* sp. A enzima apresentou pH ótimo de 2.5 para 5.5 e vários substratos específicos, incluindo para queratina, colágeno desnaturado, hemoglobina, caseína e albumina. As proteinases ácidas foram inibidas por pepstatina A, mais não por EDTA ou fenilmetilsulfonil fluoride. Com isso os autores concluíram que a produção dessas proteases por *Candida* sp é um potencial fator de virulência que pode facilitar a colonização e invasão da pele por *Candida*.

Rojanavanichi et al. (1990) caracterizaram uma protease extracelular de um estirpe de crescimento rápido *Hendersonula toruloidea* quando foi cultivado em meio líquido contendo albumina de soro bovino como única fonte de nitrogênio. A enzima purificada foi uma serina protease, como indicado pela forte inibição da atividade por fluorofosfatado diisopropilo, Fenilmetilsulfonil flúor, L-1-cetona tosylamido phenylethylchloromethyl-2, e quimostatina e a boa cinética constante de um substrato sintético, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA. A enzima apresentou pH ótimo de 9, Constituintes da pele, como estrato córneo e unha, mas não cabelo, eram facilmente digeridos pela presente enzima.

Monod et al. (1993) caracterizaram a metaloprotease de *Aspergillus fumigatus* cultivado na presença de colágeno como única fonte de carbono e nitrogênio. Agentes de redução e cátions bivalentes reduziram bastante a atividade da enzima, enquanto detergentes não iônicos não tiveram efeito. As metaloproteases de *A. fumigatus* foram

totalmente inibidas por EDTA, 1, 10-fenantroline e fosforamido, mais não foram por inibidores específicos como as proteases serina, aspartame e cisteína. Estas metaloproteases não foram capazes de clivar a elastina e é termo-sensível.

Gradisar et al. (2000) estudaram a produção de uma queratinase extracelular por *Doratomyces microsporus* em cultivo líquido submerso aeróbico em um meio contendo uma proteína para induzir a síntese da enzima. A queratinase foi purificada apresentou ótimos de pH entre 8,0-9,0 e temperatura 50 °C. A queratinase foi totalmente inibida por PMSF (Phenilmethilsulphonil Fluoride), sendo capaz de hidrolisar diferentes materiais queratinosos, bem como algumas proteínas não-queratinosas. A hidrólise de alguns substratos sintéticos, específicos para proteínas conhecidas, sugeriu que a queratinase de *D. microsporus* é próxima a proteinase K.

Muhsin e Aubaid (2000) caracterizaram a queratinase extracelular de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* isolados de pacientes com tinea cruris. O pH ótimo da queratinase purificada foi 5.5 e a temperatura ótima para alta atividade da queratinase foi 50 ^{0}C. A atividade da enzima foi especificamente aumentada contra pêlo do porquinho da Índia, e proteínas fibrosas e inibida por Flúor Fenilmetilsulfonil (PMSF). A caracterização da queratinase de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* mostrou que esta enzima pertence ao grupo das serinas.

Brouta et al. (2001) estudaram a protease queratinolítica secretada por um isolado clínico de felino o *Microsorum canis* cultivado em caldo contendo queratina do felino como única fonte de nitrogênio. Esta enzima foi purificada exibiu atividade significativa contra queratina azure, vermelho congo elastina e colágeno desnaturado tipo I (azocoll). Usando este ultimo substrato, o pH ótimo foi em torno de 8.0 e a temperatura ótima em torno de 50 °C. A protease foi inibida fortemente por 1,10-fenantroline, fosforoamido e EDTA, confirmando que essa queratinase é uma metaloprotease.

Singh (2002) caracterizou a queratinase de *Chrysosporium keratinophilum* isolado de resíduos de organoóluentes. A queratinase foi ótima em pH 8,0 e a 40 °C. A enzima enzibiu altos índices de atividade nos substratos queratinosos, pele e cabelo de búfalo.

Farag e Hassan (2004) caracterizaram a queratinase livre da cultura de degradação de pena de *Aspergillus oryzae*. A enzima purificada foi capaz de hidrolisar diferentes substratos mostrando uma alta atividade proteolítica em soro albumina bovina e caseína seguida por queratina, penas de frango, colágeno, penas de pato e lã de ovelha.

O ph ótimo da enzima livre foi 8.0. A temperatura ótima da reação foi determinada como sendo 50 ^{0}C. A queratinase livre reteve 42,05% de sua atividade a 70 ^{0}C (60 min). A enzima pura foi ativada por íons cálcio e bário enquanto EDTA e Pb inibiram a atividade.

Anbu et al. (2005) estudaram a queratinase extracelular produzida por *Scopulariopsis brevicaulis* isolada do solo de fazendas de aves domésticas de Nammakkal, Índia. A queratinase extracelular deste fungo aprsentou pH ótimo 8,0 e a temperatura ótima a 40 °C. A atividade da queratinase purificada em relação ao pH. A enzima foi bastante inibida por Flúor Fenilmetilsulfonil (PMSF), o que sugere um resíduo de serina no ou próximo ao sítio ativo.

Kim e Lei (2005) estudaram a seriana protease de *Thermomonospora fusca* expressa na levedura *Pichia pastoris*, que é termo-estável (até 85 °C) e tem atividade uma ampla faixa de pH e forte resistência aos detergentes. A queratinase da levedura mostrou pH e temperatura ótimos de 8,5 e 80 °C, respectivamente, utilizando azocaseina como substrato.

Gradisar et al. (2005) compararam as características de *Paecilomyces marquandii* e *Doratomyces microsporus*. Todas as queratinases são serina proteases. A atividade queratinolítica de *P. marquandii* em estrato córneo foi detectado em uma ampla gama de valores de pH (pH 6 a 11), com a atividade máxima em pH 8. O pH ótimo de atividade para *P. marquandii* e *D. microsporus* é em torno de pH 8. A queratinase *P. marquandii* possui temperatura ótima a 60 e 65 °C. Íons Ca^{2+} não alterou significativamente a estabilidade da enzima. Ambas as queratinases purificadas foram totalmente inibida pelo inibidor da protease serina PMSF e parcialmente pelo EDTA (cerca de 30%), enquanto iodoacetamida não causou qualquer inibição. O aumento máximo de atividade da enzima no estrato córneo queratina foi observado por a presença do agente redutor DTT. A atividade da queratinase foi aumentada em dobro para *P. marquandii* e triplicada para *D. microsporus*. O agente redutor β-ME causous um ligeiro aumento da atividade do *P. marquandii* e aumentou significativamente a atividade queratinolítica de *D. microsporus*. O DMSO não influenciou a atividade da queratinases até uma concentração de 5%, enquanto o isopropanol diminuiu a atividade em cerca de 13% na concentração de 1%. SDS inibiu ambas as enzimas a uma concentração de apenas 0,1%.

Moallaei et al. (2006) caracterizaram a proteinase extracelular do dermatófito geofílico *Trichophyton vanbreuseghemii*. A atividade da proteinase foi ótima a pH 8.0,

mais permaneceu alta na faixa de pH 7.0-11. A enzima parcialmente purificada apresentou atividade queratinolítica evidenciada no teste de queratina azure. O perfil inibitório e a boa atividade da enzima foram na direção do substrato sintético *N*-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida sugerindo que esta enzima pertence ao grupo das serinas proteases.

Li et al. (2007) caracterizaram e expressaram o sfp2, um gene que codifica uma protease serina queratinolítca de *Streptomyces fradiae* var. k11 que foi expresso na levedura *Pichia pastoris*. A queratinase do sfp2 recombinante purificada foi caracterizada. Os ótimos de pHs e temperaturas de sfp2 para proteólise da caseína e queratina azul foram pH 10,0, 60 °C e pH 9,0, 55 °C, respectivamente. A atividade de sfp2 ficou estável em pHs entre 3,0 e 11,0. A atividade da enzima foi inibida por Co^{2+} e Cr^{3+} e melhorada por Ni^{2+} e Cu^{2+}.

Moreira et al. (2007) estudaram a queratinase de *Myrothecium verrucaria* crescido em fermentação submersa e semi-sólida usando penas de frango como único substrato. A atividade proteolítica foi detecdada em vários valores de pH, com o ótimo entre 8 e 9, e dentre as temperaturas o Maximo de atividade foi a 40 °C. A enzima hidrolizou eficientemente pena de frango, lã de ovelha, unha e cabelo humano. A atividade queratinolítica foi fortemente inibida por PMSF e parcialmente inibida por EDTA.

Ya-Peng et al. (2007) estudaram a queratinase de uma nova cepa de Streptomuces sp, pele humana do pé foi foi usada como unica fonte de nitrogênio para o caracterizar o micro-organismos para sua capacidade de degradar queratina. De cerca de 200 cepas, uma cepa de *Streptomyces* sp foi selecionada por possuir a maior atividade queratinolítica, e a atividade total da cultura foi de 110 KU/ml. Teste de especificidade de substrato indicou que o queratinase degrada queratina azul, cabelo humano, penas de galo e colágeno. O pH ótimo da queratinase variarou entre 7,5 e 10 e a temperatura entre 40 °C e 55 °C. Concluindo-se que as excelentes características da queratinase de *Streptomyces* sp pode levar a sua aplicação no tratamento de resíduos e na indústria de couro e desenvolvimento de remédios e cosméticos.

Anbu et al. (2008) estudaram um fungo queratinofílico nativo de penas degradantes, *Trichophyton* sp. HA-2, isolado de pena do solo na Índia O pH ótimo e temperatura foram determinados como sendo 7,8 e 40 °C, respectivamente. Esta enzima foi completamente inibida pelo Flúor Fenilmetilsulfonil (PMSF), indicando a presença de proteases.

Cao et al. (2008) estudaram fungos não patogênico degradores de penas isolados por um novo método baseado na simulação de um processo de decomposição no ambiente e caracterizaram a querainase produzida. O isolado F6 com atividade queratinolítica alta foi identificado como *Trichoderma atroviride* com base em características morfológicas e análise da seqüência ITS1-5.8S-ITS2. A queratinase purificada pertencia a serina protease. Seu pH ótimo, temperatura ótima, e especificidade de substrato são diferentes das outras proteases de serina de espécies de *Trichoderma*. O pH ótimo e temperatura da queratinase purificada foram 8,0-9,0 e 50-60 °C. A enzima foi estável em ph entre 7-11 mantendo 60% de sua atividade iniciam e em temperatura entre 40 °C mantendo 100% de atividade e a 50 °C manteve 60% de atividadede. A queratinase foi ativa em caseína, gelatina, soro albumina bovina, penas e substratos sintéticos (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA and Suc-Ala-Ala-Ala-pNA). A enzima foi inibida por SDS e PMSF e aprcialmente inibida por Hg^{2+} e Cu^{2+} e a atividade foi aumentada na presença de Ca^{2+}.

Lopes et al. (2008) estudaram a queratinase de *Coccidioides immitis*. Esta teve sua atividade totalmente inibida por fenolmetilsulfonil flúor (PMSF), um inibidor de serina peptidase. Por outro lado, metalo, cisteína e inibidores da peptidase aspartil não alteraram o comportamento da enzima. Esta serina peptidase extracelular foi capaz de degradar a queratina, além de clivar diferentes substratos de proteína, incluindo gelatina, caseína, hemoglobina e albumina.

Moreira-Gasparin et al. (2009) caracterizaram a protease de *Myrothecium verrucaria* e exploraram a sua capacidade de degradar penas de aves nativas. A enzima purificada apresentou pH ótimo de 8,3 e manteve-se estável ao longo de um ampla faixa de pH (5,0 a 12,0). A temperatura ótima foi de 37 °C, com estabilidade térmica a temperaturas até 45 °C. A enzima foi capaz de hidrolisar β-queratina, sem necessidade química ou enzimática de redução das ligações dissulfeto. Considerando que, todos os dias, as aves processadas produzem penas como resíduos de produtos, esta protease pode ser útil em processos biotecnológicos com o objetivo de melhorar a transformação de penas de aves através de solubilização da β-queratina em peptídeos utilizável. Além disso, ela também pode ser útil em processos com o objetivo de reduzir a poluição ambiental causada pelo acúmulo de penas.

Lin et al. (2009) caracterizaram a queratinase recombinante (rK) expressa em *Pichia pastoris*. A rK foi purificada foi estável em pH 6,0-9,0 e 1-60 °C e teve um pH e temperatura ótimos de 8,0 e 60 °C, respectivamente. Ba^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+},

ditiotreitol, glutationa, e β-mercaptoetanol ativaram a atividade da queratinase rK, enquanto Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{3+}, ácido tetraacético de etileno glicol, ácido tetraacético de diamina e *p*-chloromercuriobenzoato inibiram a sua atividade.

El-Gendy (2010) selecionou o fungo endofítico queratinolítico *Penicillium* spp. Morsy1 isolado do coral marinho *Dendronephthya hemprichii*, como a cepa queratinolítica hiperativa em fermentação sólida com substrato de diferentes agriculturas e resíduos de aves de capoeira. Os parâmetros cinéticos das queratinases purificadas foram otimizados para a hidrólise de azoqueratina pela enzima Ahm1 (pH 7.0-8.0, estável na faixa de pH de 6.0 a 8.0 a 50 °C) e enzima Ahm2 (pH 10.0-11.0, estável na faixa de pH 6.0-11.0 a 60-65 °C). Enquanto que inibidores das proteases serina (Fenilmetilsulfonil flúor) e cisteína (iodoacetamida) tiveram efeitos menores na atividade de ambas Ahm1 e Ahm2, ambas queratinases foram fortemente inibidas por agentes quelantes EDTA e EGTA. Estes resultados sugerem que resíduos de serina e cisteína não estão envolvidos nos mecanismos catalíticos, e elas são metaloproteases.

Saber et al. (2010) caracterizou a atividade queratinolítica de culturas de *Alternaria tenuissima* K2 e *Aspergillus nidulans* K7. A atividade da queratinase foi ótima em condições alcalinas entre pH 8,0 e 9,0 para *A. tenuissima* K2 e entre pH 7,5 e 9,0 para *A. nidulans* K7, com ótimo em pH 8,5 para ambas as enzimas. Em uma ampla faixa de temperatura (de 25 °C a 65 °C), a queratinase de *A. nidulans* K7 mostrou um máximo de atividade a 40 °C e atividades queratinolíticas maiores a temperaturas mais altas foi encontrada para queratinase de *A. tenuissima* K2.

Vermelho et al. (2010) caracterizaram a queratinase de uma cepa de levedura isoladas a partir de resíduos de penas de frango foi identificada como *Candida parapsilosis*. A levedura foi capaz de crescer em tampão fosfato suplementado com 1% de pena nativas como o única fonte de carbono e nitrogênio. 20 vezes da concentração do sobrenadante da cultura de *Candida parapsilosis* cultivadas em penas foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE contendo ou 1% de gelatina ou 1% de queratina como substratos, apresentando uma única banda com massa molecular aproximada de 60 kDa com atividades gelatinolítica e queratinolítica. A atividade proteolítica foi totalmente inibida por PMSF, sugerindo ser uma enzima extracelular pertence a classe da serina peptidase. Este foi o primeiro relato de uma serina peptidase extracelular produzida por *C. parapsilosis* com atividade queratinolítica.

2.3. Potencial de Aplicação das Queratinases

O mercado mundial de enzimas industriais foi 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). Na tabela 2 é mostrada algumas das principais aplicações da queratinase.

Tabela 2 Aplicações das queratinases.

Aplicações	**Referências**
Processamento do couro	Riffel et a. 2003 Pillai e Archana 2008 Prakash et al. 2010 Tiwary e Gupta 2010 Chenggang et al. 2011
Degradação de resíduos agrícolas	Lin et al. 1996 Gioppo et al. 2009 Zaghloul et al. 2011
Ração animal	Onifade et al. 1998 Gioppo et al. 2009 Stark et al. 2009
Formulação de detergentes	Hoshino et al. 1995 Rai et al. 2010 Rai e Mukherjee 2011
Indústria farmacêutica	Kim et al. 2004
Fertilização de plantas	Veselá e Friedrich 2009
Indústria têxtil	Cai et al. 2011
Degradação de “prions”	Langeveld et al. 2003 Chen et al. 2005

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 excesso 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 com condições fisiológicas de pH e temperatura (Rao et al., 1998).

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 a substituição gradual de processos químicos pelo uso de biocatalizadores (Teixeira et al., 1994).

Devido as suas propriedades catalíticas degradativas e sintéticas, as proteases constituem uma classe particular de enzimas de imensa importância fisiológica e comercial. Essas 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. 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 utilizadas para fins particulares na indústria (Hodgson, 1994).

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

As queratinases representam uma classe de enzimas com importante papel em processos biotecnológicos, destacando-se os seguintes potenciais de aplicação: processamento economicamente 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 (Onifade et al., 1998); produção de hidrolisados protéicos a partir dos 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 e Kern, 2003); como

também na medicina através da eliminação da queratina na acne, psoríase e calos humanos (Kim et al. 2004).

2.3.1. Processamento e bioconverção de resíduos de queratina

Materiais constituídos por queratina tais como: chifres, penas, unhas e cabelos são abundantemente encontrados na natureza como descarte ou subproduto industrial. Estes compostos podem ser convertidos em concentrados protéicos de valor nutricional para animais (Anwar e Saleemuddin, 1998).

Stark et al. (2009) estudaram a eficácia da suplementação do Versazyme (VZ) com a queratinase produzida por *Bacillus licheniformis* PWD-1. 192 pintos machos foram alimentados com esta ração, estes apresentaram ganho de 55 g de peso corporal com 21 dias de idade.

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 a seu baixo custo de obtenção e grande potencial como fonte alternativa de proteínas para ração animal (Latshaw et al., 1994; Onifade et al., 1998; Gassesse et al., 2003).

Zaghloul et al. (2011) estudaram o potencial da queratinase secretada por células recombinantes de *Bacillus subtilis* degradar penas em biorreator 14 L Bio Flo 110 de laboratório. Altas quantidades de produtos finais da hidrolise das penas foram liberadas no meio e as células recombinantes de *Bacillus subtilis* se manteram 100% estáveis até o quinto dia de fermentação. Esses resultados mostram a grande eficiência do uso de cepas queratinolíticas na biorremediação de penas que são liberadas no ambiente.

Em alguns países, as penas são utilizadas como complemento para ração animal na forma de farinha de penas (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 lationina, resultando assim em um produto de baixa digestibilidade e pouco valor nutritivo, além de proporcionar um custo muito alto no processo produtivo. Considerando o custo termo energético do processamento convencional das penas, e a sua limitação quanto à diminuição do valor nutricional, trona-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). O uso de enzimas queratinofílicas surge como uma alternativa para a hidrolise destes materiais, já que o uso dessas enzimas no processamento de penas mantém o seu valor nutritivo (Papadopoulos, 1989; Latshaw et al., 1994; Wang e 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 (Onifade et al., 1998).

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

O rico concentrado protéico da farinha de pena, também pode ser aplicado em agriculturas orgânicas como fertilizante com lenta liberação de nitrogênio (Hadas e Kautsky, 1994; Choi e Nelson, 1996). A agricultura orgânica conta com o enriquecimento de nitrogênio do solo, que é conseqüência 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, há uma necessidade de procurar por alternativas mais convenientes (Hadas e Kautsky, 1994).

Veselá e Friedrich (2009) estudaram a hidrólise enzimática de resíduos de cascos e chifres por uma queratinase de *Paecilomyces marquandii*, para uso em produtos de fertilização de plantas. Com a queratina em pó a 50 °C e pH 8 entre 34 a quase 60% de nitrogênio os resíduos foram solubilizados em 5 h, dependendo da concentração da enzima. Os produtos de hidrólise consistiu em uma mistura de proteínas solúveis, peptídeos e aminoácidos livres. Entre este último, 18 aminoácidos comuns foram detectados. Vários deles foram previamente reconhecidos como tendo um efeito positivo sobre as plantas. Comparado com outras proteínas hidrolisadas destinada para fertilizantes sugere que a degradação de produtos de queratina, obtida por hidrólise enzimática, tem potencial para ser utilizada para adubação foliar, sozinho ou em combinação com outros hidrolisados complementares de uma fonte diferente.

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 e Ramnani, 2006).

2.3.2. 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. Uma queratinase produzida por uma cepa de *Bacillus* sp., já esta sendo testada em nível industrial (Kudrya e Simonenko, 1994). Espécies de *Bacillus subtilis* tem sido estudas para seu potencial de aplicação na depilação do couro utilizando diferentes substratos de queratina (Pillai et al., 2011).

Prakash et al. (2010) estudaram a degradação de penas de aves e remoção de cabelo do couro de cabras pela queratinase secretada por *Bacillus halodurans* PPKS-2. A enzma foi efetivamente utilizada tanto na degradação das penas como na remoção do cabelo do couro de cabra. Mostrando que esta cepa pode ser utilizada em processos de biorremediação de penas no ambiente e na indústria de processamento do couro.

Tiwary e Gupta (2010) estudaram a aplicação da queratinase produzida por *Bacillus licheniformis* ER-15 para a degradação de penas de aves e depilação do cabelo da pele de búfalo e constataram a efeciência desta enzima na degradação das penas em 12 horas a pH 8 e 50 °C e na depilação do cabelo da pele de búfalo no prazo de 16 h na presença de 3% $Ca(OH)_2$.

Chenggang et al. (2011) estudaram o potencial de aplicação da queratinase produzida por *Bacillus subtilis*, condiçoes ótima para a degradação de penas e de depilação foram estudados. Obtiveram como resultados que 10 e 15 g de pena/L, pH inicial 8,5, 32 °C, 2% de inóculo são as condiçoes ótima para degradação das penas com 45% e 68% de degradação após 121 e 128 °C de tratamento por 20 min; a queratinase cultivadas também ap´resentou habilidade para depilar o cabelo da pele de bezerros e cabras em 8-12 e 12-16 horas, respectivamente.

2.3.3. Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, queratinases produzidas por *Cryptococcus sedentarius* foram estudadas para a remoção de calosidades em seres humanos. Este microrganismo foi identificado como agente etiológico de uma doença caracterizada pela erosão da sola dos pés. As enzimas proteolíticas, isoladas de cultivo desse fungo 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 polímero de queratina (Kim et al., 2004). Em outra possível aplicação farmacêutica, as queratinases podem também ser utilizadas para eliminar a queratina da acne, psoríase e na preparação de vacinas na terapia de dermatófitos.

2.3.4. Formulação de detergentes

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

Queratinases têm habilidade para se ligar e hidrolisar substratos sólidos tais como penas, que é uma importante propriedade para os detergentes enzimáticos, visto que são requeridos para atuar em substratos protéicos aderidos a superfícies sólidas. Esses detergentes podem ajudar na remoção de sujeiras que são freqüentemente 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 (Farag e Hassan, 2004) e para remover cabelos em dreno de banheiro (Takami et al., 1992).

Rai et al. (2010) estudaram uma protease alcalina bacteriana (AS-S24-II). A enzima foi estável na maioria dos detergentes para roupa comerciais testados em temperatura ambiente, melhorando o desempenho dos detergentes, demonstrando assim a sua viabilidade para a inclusão em formulações de detergente para a roupa.

Rai e Mukherjee (2011) testaram a queratinase produzida por *Brevibacillus* sp AS-S10-II para sua capacidade de depilação do pêlo em pele de cabra e seu uso em formulações de dertentes. A queratinase purificada de *Brevibacillus* sp se mostrou

estável nos detergentes para rroupa comerciais testados e propriedade de depilação da pele de cabra. Tronando a inclusão da queratinase desta bactéria viável para a formulação de detergentes de lavanderia e na industria do couro.

2.3.5. Degradação de "prions"

"Prions" são partículas protéicas ricas em queratina, responsáveis por uma doença neurodegenerativa fatal, chamada encefalopia espongiforme transmissível (Musahl e Aguzzi, 2000). Shih et al. reportaram que a queratinase PWDI (Versazyme) é capaz de degradar completamente "prions" de tecido de cérebro bovino com encefalopatia espongiforme (Langeveld et al., 2003).

Chen et al. (2005) estudaram as propriedades para degradação da proteína Sup35NM isolada de uma levedura não patogênica, que foi clonada e expressa em *E. coli*, purificada e caracterizada. Esta proteína corresponde ao prion de proteína da encefalopatia espongiforme transmissível de bovinos. A proteína Sup35NM foi facilmente degradada por queratinase e protease K, entretanto os agregados desta proteína foram mais resistentes para ambas as enzimas.

2.3.6. Outras aplicações

Outras aplicações potenciais das queratinase incluem a digestão anaeróbica de resíduos de aves domésticas para produzir gás natural para combustível (Brutt e Ichida, 1999), na modificação de fibras tais como: seda e lã (Rissem e Antranikian, 2001), na produção de plásticos biodegradáveis (Gupta e Ramnani, 2006) e como pesticidade de um nematóide de galhas (*Meloidogyne incógnita*) a partir da queratinase de *Bacillus* sp 50-3, quando o nematóide foi exposto a 50 lg/l da solução de queratinase 98,5% de taxa de mortalidade de *Meloidogyne incógnita* foi obtida após 24 h (Yue et al. 2011).

Cai et al. (2011) avaliaram o tratamento de tecido de lã pela queratinase produzida por uma espécie de *Pseudomonas* isolada da lão. O extrato bruto dessa bactéria foi utilizado para o tratamento de tecidos de lã e os autores encontraram como as melhores condições para o tramento as seguintes condições: 30 °C, pH inicial 7,6 e 160 rpm de agitação, além da eficácia do tratamento do tecido de 4,1% em 6 h a força têxtil do tecido não foi perdida.

2.4. Fungos queratinofílicos e queratinolíticos

A atividade queratinolítica dos dermatófitos e outros fungos queratinofílicos foi estudada por muitos pesquisadores (English, 1969; Filipello Marchisio et al., 1994; Warzkiewice et al., 1991; Marchisio et al., 1994; Rashid et al., 1996; Ali-Shtayeh e Jamous, 2000). Os mecanismos em que os fungos queratinolíticos degradam a queratina de sua fonte natural, tal como o cabelo, parece ser resultado de ações mecânicas dos fungos (Baxter et al., 1969; Ali-Shtayeh e Jamous, 2000) e da atividade enzimática proteolítica da queratinase intracelular (Yu et al., 1971; Ali-Shtayeh e Jamous, 2000). Na tabela 3 são mostradas algumas técnicas de isolamento de alguns fungos queratinofílicos e o substrato onde foram isolados.

Tabela 3 Técnicas de isolamento, substratos e gêneros de fungos queratinofílicos.

Procedência	**Técnica de isolamento**	**Gêneros**	**Referências**
Cabelo e couro cabeludo	Isca de cabelo	*Cladosporium, Penicillium, Aspergillus, Microsporum Aphanoascus, Chrysosporum, Trichophyton*	Ali-Shtayeh et al. 2000
Pássaros dosméticos	Isca de cabelo	*Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Fusarium, Mucor, Rhizopus*, *Penicillium* e *Trichoderma*	Efuntoye e Fashanu 2001
Solo	Isca de cabelo	*Arthroderma*, *Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Microsporum*, *Pseudogymnoascus*, *Trichophyton*	Deshmukh 2002b
Solo	Isca de cabelo	*Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Microsporum*, *Trichophyton*	Deshmukh e Agrawal 2003
Solo	Isca de cabelo	*Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Emmonsia*, *Geomyces*, *Keratinophyton*, *Microsporum*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Sporotrichum* e *Trichophyton*	Saxena et al. 2004
Solo	Isca de cabelo	*Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Uncinocarpus*	Zaki et al. 2005
Solo	Isca de cabelo	*Aphanoascus*, *Auxarthron*, *Chrysosporium, Ctenomyces*	Deshmukh e Verekar 2006

Cont.

Procedência	**Técnica de isolamento**	**Gêneros**	**Referências**
Solo	Diluição em placa e isca de cabelo	*Aspergillas*, *Microsporum*, *Cunninghamella*	Irun et al. 2007
Solo	Agar Sabouraud	*Aphanoascus*, *Arthroderma*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Gyminoascus*, *Penicillium*, *Trichophyton*	Maghraby et al. 2008
Pena de aves	Agar Mycobiotic	*Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Arthroderma*, *Scopulariopsis*, *Sepedonium*	Mandeel et al. 2009
Solo	Isca de cabelo	*Auxarthron*, *Chrysosporium*, *Gymnoascus*, *Microsporum*	Deshmukh e Verekar 2010

A diferença entre fungos queratinofílicos e queratinolíticos esta baseada na utilização e/ou destruição da queratina. Os fungos queratinolíticos são capazes de decompor a queratina presente no substrato, sendo potencialmente patógenos ao homem e animais. Por outro lado, espécies queratinofílicas são capazes apenas de usar materiais naturalmente associados com a queratina, ou resultantes de sua degradação (Marchisio et al., 1991; Ulfig et al., 1997).

Malviya et al. (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 compacto. Evidências para a 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 a clivagem enzimática das ligações peptídicas (Onifade et al., 1998). De acordo com as evidências disponíveis, pode-se presumir que a queratinólise mecânica preceda a queratinólise enzimática até haver a produção de exoproteases pelo micélio. 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 queratinolíticos são capazes de utilizar a queratina como única 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).

Kaul e Sumbali (1999) coletaram amostras de solo de dez aviários de Jammu, norte da Índia, e estudaram quanto a presença de fungos queratinofílicos pela técnica de isca de queratina. Vinte espécies pertencentes a nove gêneros (*Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, *Gliocladium*, *Circinella*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*) foram isolados. Algumas delas são conhecidas por serem agentes patogênicos potenciais.

Ali-Shtayeh e Jamous (2000) demostraram que a irrigação de esgoto da cidade parece afetar as densidades populacionais das comunidades de fungos queratinofílicos, sendo as maiores densidades populacionais encontradas em solos de campo altamente poluídos, enquanto que a baixa densidade populacional ocorre em solos de campo não poluídos. No entanto, as semelhanças na biodiversidade de comunidades de fungos queratinofílicos existentes em ambos os solos não poluídos e poluídos e matérias-primas de esgoto da cidade. As espécies mais comumente encontradas incluem *Alternaria alternata*, *Aspergillus candidus*, *Geotrichum candidum* e *Paecilomyces lilacinus*. Os solos de campo que recebem o esgoto da cidade crua ou água de irrigação normal mostraram-se ricos em fungos queratinofílicos patogênicos e potencialmente patogênicos, incluindo dermatófitos, com o maior percentual nos esgotos da cidade, seguido pelos campos moderadamente poluídos, campos não poluídos, e campos fortemente poluídos. Os fungos dermatófitos obtidos destes habitats incluem *Microsporum gypseum*, *Trichophyton ajelloi*, *Arthroderma cuniculi*, *A. curreyi*, *Chrysosporium keratinophilum*, *C. tropicum* e *C. pannorum*. A capacidade de 55 espécies de fungos cicloheximida-resistente (117 isolados) para degradar cabelo humano “in vitro” foi investigada. As espécies foram isoladas de solos de campos poluídos (cidade das águas residuais da irrigação) e não poluídos (irrigação normal) e de águas residuais das cidades-primas. A intensidade da atividade queratinolítica (IKA) foi estimada em uma escala de 0-100, com base na expressão morfológica de queratinólises. Uma elevada percentagem das espécies testadas (48/55, 87%)

demonstraram um grau variável de atividade queratinolítica. *Chrysosporium keratinophilum, Microsporum gypseum, Penicillium frequentans, Rhizopus stolonifer* e *Trichophyton ajelloi* mostraram IKA forte, e foram capazes de produzir estruturas invasivas relacionadas com a penetração radial e erosão superficial. Por outro lado, sete de todas as espécies testadas, incluindo espécies de *Acremonium*, *Aspergillus carneus*, *Nectria inventa*, *Penicillium citrinum*, *Paecilomyces variotii*, *Plectosphaerella cucumerina* e *Verticillium nubilum*, não apresentaram atividade queratinolítica. A atividade queratinolítica das seguintes espécies é registrada neste estudo, pela primeira vez: *Acremonium strictum*, *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium tricinctum*, *Gliocladium viride*, *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*, *Nectria ventricosa*, *Penicillium griseofulvum*, *P. islandicum*, *Verticillium catenulaume* e *V. psalliotae*. Isolados da mesma espécie podem variar em seu IKAs. Assim, essa característica não parece ser constante ou espécie-específico.

Ali-Shtayeh et al. (2000) avaliaram a microbiota do cabelo e couro cabeludo de 1.389 crianças clinicamente normais com idade entre 6-12 anos de 12 escolas do Distrito de Nablus, Autoridade Palestina. As coletas ocorreram em três ocasiões ao longo do período de 8 meses (Outubro de 1998 a maio de 1999) utilizando a técnica de isca de cabelo. Cento e uma espécies de fungos pertencentes a 33 gêneros foram encontrados: 6 dermatófitos, 16 fungos queratinofílicos como dermatófitos e 79 espécies de outros fungos queratinofílicos. As espécies variaram consideravelmente em sua freqüência de ocorrência e abundância com base em seus valores de importância relativa (RIVs). As espécies mais freqüentes e abundantes foram: *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Penicillium chrysogenum* e *Aspergillus flavus*. *Microsporum canis*, *Aphanoascus fulvescence* e *Chrysosporum sulfureum* foram as espécies mais freqüentes e abundantes de todos os dermatófitos e fungos queratinofílicos isolados. Os dermatófitos mais freqüentes e abundantes em diferentes comunidades foram *M. canis* em áreas rurais (RIV 0,87) e em crianças urbanas (0,45) e *Trichophyton violaceum* (1,41) em crianças do campo de refugiados. Espécies de *Chrysosporium* foram as mais freqüentes e abundantes dentre os fungos queratinofílicos em crianças de todas as localidades seguido por *Aphanoascus fulvescence*. Resultados comparáveis sobre a freqüência e abundância da microbiota de fungos no cabelo e couro cabeludo foram obtidos com base na faixa etária e sexo das crianças. O maior número de espécies foi isolado nos meses da primavera (73 espécies) do que nos meses de outono (57) e inverno (44). Em vista destes resultados, pode-se concluir que a

microbiota do couro cabeludo e cabelos de crianças em idade escolar é rico em fungos patogênicos e potencialmente patogênicos incluindo dermatófitos. Essas crianças podem, portanto, atuar como uma fonte direta de infecção para outros colegas, membros da família e outros em contato direto com elas, ou como uma fonte indireta de infecção através da contaminação da sala de aula e áreas de habitação. Melhorar as condições de higiene no ambiente da escola e hábitos de higiene das crianças pode contribuir para a diminuição dessas infecções fúngicas.

Deshmukh et al. (2000) coletaram em Mysore, Índia, 88 amostras de solo de diversas áreas e habitats e rastrearam quanto a presença de fungos queratinofílicos e dermatófitos. Os dados mostram que apenas 55 das 88 amostras apresentaram fungos queratinofílicos. Um total de 12 espécies de quatro gêneros foram isoladas. *Chrysosporium indicum* foi a espécie mais freqüentemente isolada (21,6%), mas o percentual de ocorrência é relativamente baixo nesta área. *Microsporum gypseum* foi o segundo mais isolado (13,6%), seguido de *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (9,1%). *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium pannorum* e *Chrysosporium tropicum* ocorreram em 2,3, 2,3 e 6,8% das amostras, respectivamente, e, além disso, três espécies não identificadas de *Chrysosporium* também foram isoladas. Um isolado do dermatófito *Trichophyton mentragrophytes* também foi isolado.

Filipello Marchisio (2000) estudou os fungos queratinofílicos colonizadores naturais dos substratos queratinosos. Alguns são queratinolíticos e desempenham um papel ecológico importante na decomposição da queratina, uma proteina fibrosa insolúvel, por causa da sua cadeia polipeptídica em estruturas de α-hélice e as suas ligações por pontes de dissulfeto, que são pouco biodegradáveis. Duas formas principais de ataque foram identificadas: erosão da superfície e penetração radial. Na erosão de superfície, a seqüência do processo de degradação como o nível de queratinização (as ligações cruzadas cistina) dos componentes da matriz queratinosa são aumentados. Na penetração radial, por outro lado, hifas especializadas podem penetrar, como uma broca na matriz, independentemente do grau de queratinização. Isto pode ilustrar como o crescimento pode mudar de direção e como atividade secretora pode concentrar-se nas pontas das hifas de penetração.

Ghosh e Bhatt (2000) isolaram do solo do lago Chilka-Índia fungos queratinofílicos/queratinolíticos, obtendo espécies raras e novas de Orissa e da Índia: *Chrysosporium zonatum*, *Malbranchea aurantiaca* e *Malbranchea* anamorfo de *Uncinocarpus reesii*. *Aphanoascus fulvescens* com a maior taxa de isolamento (55,9%)

mostrou afinidade com a queratina do caranguejo misturado com o solo. Os isolados também incluíram vários "oportunistas" patógenos, relatados em casos clínicos do homem e de animais: *Acremonium* sp., *Altenaria alternata*, *Chrysosporium tropicum*, *Ch. zonatum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Gymnoascoideus petalosporus*, *Penicillium lilacinum*, *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *Paecilomyces varioti* e *Rollandina hyalinospora*.

Gugnani (2000) estudou os fungos queratinofílicos que incluem uma variedade de fungos filamentosos, principalmente compreendendo Hyphomycetes e vários outros grupos taxonômicos. Hyphomycetes incluem dermatófitos e uma grande variedade de fungos filamentosos não dermatófitos. A maior parte dos últimos ocorre como saprófitas no solo, e alguns são patógenos de plantas. Espécies de *Chrysosporium* são os fungos filamentosos mais comuns não dermatófitos e são predominantemente recuperados do solo e outros substratos naturais pela técnica de isca de cabelo. *C. tropicum* e *C. pannicola* têm sido freqüentemente isolado de lesões de pele humana e animal, mas a sua relação etiológica não tem sido estabelecida. *Nattrassia mangiferae*, um Coelomyceto, é um patógeno de planta bem conhecido, e tem sido freqüentemente relatado durante as últimas três décadas como agente etiológico de infecções da pele humana e infecções de unhas. Outra espécie de *Scytalidium*, *S. hyalinum*, considerado como um albino mutante de *S. dimidiatum* também tem sido freqüentemente conhecido por causar infecções semelhantes. *Phoma*, outro Coelomyceto, inclui várias espécies patogênicas para os seres humanos. Entre outros fungos filamentosos não dermatófitos queratinofílicos conhecido por causar infecções humanas estão as espécies de *Fusarium*, *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Onychocola*, *Microascus*, *Aphanoascus* e *Chaetomium*. Várias espécies de fungos Gymnoascaceous, *Ctenomyces serratus*, *Gymnoascus reesii*, *G. intermedius* e *Gymnascella dankaliensis* são frequentemente isoladas de solo pela técnica de iscagem de cabelo, tem sido também ocasionalmente recuperados das lesões de pele humana, mas sem qualquer evidência de relação etiológica. Os critérios considerados importantes para avaliar o papel dos fungos filamentosos não dermatófitos em infecções de pele são a demonstração de elementos miceliais em microscopia direta de raspados de pele ou biópsia compatível com os da cultura, repetidas culturas positivas a partir de material clínico, e a exclusão de infecção devido a um dermatófitos ou um fungo diferente do que está em questão.

Guzman-Chavez et al. (2000) estudaram a presença de fungos queratinofílicos com especial referência para dermatófitos em cães e gatos que vivem nas cidades do México e Nezahualcoyotl na área metropolitana da Cidade do México. Duzentas amostras foram coletadas de cães e gatos utilizando a técnica de MacKenzie de escovas de dente. As amostras foram processadas por métodos de rotina micológica de fungos dermatófitos e os resultados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS®. Foram isolados 67 e 90 cepas de queratinofílicos das amostras de gato e cães, respectivamente. Os fungos mais comumente isolados em cultura pura neste estudo foram *Chrysosporium* spp (25%), seguido pelo *Trichophyton terrestre* (22%), *Microsporum gypseum* (5%), *M. canis* (4%), bem como culturas mistas com *Chrysosporium* spp. & *M. gypseum* (2%) e *T. terrestre* & *T. mentagrophytes* (1%). Os fungos queratinofílicos foram encontrados em maior número na pelagem do gato (67%) do que no cão (45%) e o mesmo ocorreu em relação à dermatófitos, com 12 isolados de 100 amostras de gatos e 7 isolados de 200 amostras de cães. Isto pode representar um risco à saúde dos seres humanos em contato com um gato ou um cão infectado com dermatófitos.

Katiyar e Kushwaha (2000) isolaram de 144 amostras de sedimentos de água, 183 fungos pertencentes a nove gêneros e 22 espécies. Cinqüenta e nove isolados de *Acremonium*, 26 de *Chrysosporium indicum*, 22 de *Chrysosporium keratinophilum*, 17 de *Malbranchea* sp. e 10 de *Microsporum gypseum* foram isolados. *Acremonium implicatum*, *Chrysosporium georgii*, *Chrysosporium xerophilum* e *Geomyces pannorum* foram relatados pela primeira vez na Índia. A sobrevivência em longo prazo de fungos queratinofílicos potencialmente patogênicos pode representar um risco a saúde, nomeadamente na Índia, onde as pessoas tomam banhos em rios, lagoas e lagos.

Kaul e Sumbali (2000) coletaram penas de aves vivas e estudaram a presença de fungos queratinofílicos sobre elas. Todas as amostras investigadas foram positivas e quatorze espécies de fungos queratinofílicos em dez gêneros foram isolados. Destes, *Malbranchea chrysosporoidea* é uma nova adição à micoflora indiana.

Efuntoye e Fashanu (2001) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos e dermatófitos em pássaros domésticos na Nigéria. Penas, garras e bicos de cem aves comuns (galinhas, patos, perus e pombos), foram examinados utilizando a técnica "Hair Bait", usando como substratos penas, lã e bicos para o isolamento de fungos. Foram isoladas 15 espécies, pertencentes aos gêneros, *Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

Microsporum gypseum foi a espécie mais freqüentemente isolada (35%). O gênero mais comum foi *Chrysosporium*, sendo *C. keratinophilum* a espécie mais freqüente (28,3%). Os autores concluíram que as espécies isoladas incluem fungos potencialmente patógenos e produtores de micotoxinas (*Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Fusarium oxysporum*).

Maghazy (2001) estimou a prevalência de dermatófitos e outros fungos nos cabelos e unhas de crianças saudáveis, ntre nove meses a 4 anos, de 5 creches de Assiut. Noventa e duas amostras de cabelo e 85 amostras de unhas (grupos de 10 dedos de cada criança) foram coletadas. A partir das amostras de cabelo foram isoladas 22 espécies, *Trichophyton* (2 espécies) e *Microsporum* (2 espécies) foram os únicos dermatófitos isolados, além do gênero conhecido como queratinofílico *Chrysosporium* (4 espécies). A partir das amostras de unhas, 18 espécies foram identificadas, *Trichophyton* foi representada por quatro espécies, *Microsporum* duas espécies e *Chrysosporium* 4 espécies. Além disso, vários outros saprófitas e fungos cicloheximida-resistentes foram isolados. Os dados aqui representados indicaram que quase todas as espécies de fungos que colonizaram os cabelos e as unhas de crianças saudáveis são principalmente geofílicos e quanto ao maior número de espécies nas unhas pode ser devido a falta de higienização das mesmas. A ocorrência desses fungos sobre os cabelos ou unhas pode desempenhar um papel favorável, invadindo a pele, cabelo e as unhas causando infecção primária ou secundária. Os dados ajudam também a concluir que a variação dos fungos observados em crianças saudáveis nos cabelos e unhas em creches, parece refletir um padrão complexo de interações entre muitos outros fatores, ou seja, a imunidade, a estirpe de patogenicidade e o nível de atividades sociais das crianças.

Muhsin e Hadi (2001) estudaram a habilidade de quatro espécies de fungos, dois dermatófitos e dois sapróbios, em degradar três tipos de substratos de queratina, cabelo, pena de galinha e lã. Cabelos tiveram uma elevada taxa de degradação por *Chrysosporium pannicola* e *Microsporum gypseum*, pena de galinha foi altamente degradada por *Aspergillus flavus*, enquanto a lã foi altamente degradada por *C. pannicola* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. Os autores concluíram que a proteína liberada dentro do meio de cultura varia entre os fungos estudados. O pH dos meios alcalinos estudados altera com o tempo de 6,5 para 7,8 e os exames microscópicos apresentaram maceração dos substratos de queratina pelos fungos.

Ali-Shtayeh et al. (2002) estudaram a ecologia de dermatófitos e outros fungos queratinofílicos em piscinas e locais poluídos e não poluídos em Nabu, distrito da

Palestina. Utilizando a técnica "Hair Baiting" e a de diluição e plaqueamento em superfície de meios de cultura, os autores isolaram 50 espécies de fungos queratinofílicos dos ambientes aquáticos, das quais 22 foram procedentes das piscinas. Destas, seis foram dermatófitos (*Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*) ou espécies relacionadas à dermatófitos (*Chrysosporium merdarium*, *C. tropicum, C. keratinophilum* e *T. terrestres*). As espécies que ocorreram com maior freqüência em três piscinas foram *Acremonium strictum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geotrichum candidum* e *Paecilomyces lilacinus*, e as mais abundantes foram *Acremonium strictum* e *Aspergillus flavus*. Os autores concluíram que nas piscinas e nos locais poluídos e não poluídos estudados, foram considerados como sendo ricos em fungos patógenos e potencialmente patógenos.

Deshmukh (2002 a) estudaram as amostras de solo coletadas dos bancos de geleira de Gulmarg, Khilanmarg, Sonamarg Tangmarg e do vale da Caxemira, para a prevalência de fungos queratinofílicos e dermatófitos afins. A partir das 72 amostras positivas (67,3%), um total de sete gêneros com onze espécies foram isoladas *Chrysosporium keratinophilum* (3,7%), *Chrysosporium tropicum* (5,6%), *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (11,2%), *Geomyces pannorum* (2,8%), *Malbranchea* sp. (0,9%), *Microsporum gypseum* (20,6%), *Microsporum nanum* (1,9%), *Microsporum vanbreuseghemii* (0,9%), *Trichophyton ajelloi* (15%), *Trichophyton terrestre* (2,8%) e *Uncinocarpus reesii* (1,9%).

Deshmukh (2002 b) estudou a incidência de fungos queratinofílicos de solo de várias áreas de quatro distritos de Kerala (Índia). Utilizou para o isolamento destes fungos a técnica "Hair bait" de Vanbreuseghem et al. (1979), usando como isca cabelo humano esterilizado. Das 158 amostras de solo coletadas, 96 foram positivas para estes fungos, um total de 15 espécies foram isoladas, *Arthroderma simii*, *Chrysosporium indicum*, *C. keratinophilum*, *C. lobatum*, *C. pannicola*, *C. tropicum*, *C.* an. *Arthroderma cuniculi*, *Malbranchea aurantiaca*, *M. fulva*, *Microsporum gypseum*, *Pseudogymnoascus roseus*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. terrestre*. O autor concluiu neste estudo que uma rica variedade de fungos queratinofílicos existe em Kerala, podendo ser atribuído ao clima e condições ambientais, tais como, tipo de solo, vegetação, fauna e habitação humana.

Katiyar e Kushwaha (2002) estudaram a habilidade de degradação do cabelo humano e liberação de proteína de substratos queratinosos *in vitro* pela ação de 12 fungos isolados da poeira de uma casa em Kanpur, Índia. Foram testados 12 fungos

queratinofílicos quanto a sua habilidade de colonizar e invadir o cabelo e liberar proteína no meio de cultura em um período de 30 dias. *Chrysosporium indicum* e *Microsporum gypseum* colonizaram o cabelo humano com seis dias, enquanto espécies de *Acremonium* (GPCK 531) levaram 24 dias para colonizar o cabelo. A deterioração completa do cabelo foi observada em *Chrysosporium indicum*, *C. tropicum* e *C. tropicum* (atípico) ao final de 24 dias. Espécies de *Acremonium* (GPCK 531) mostraram invasão mínima do cabelo depois de 30 dias. A maior quantidade líquida de proteína liberada do cabelo humano foi por *Chrysosporium indicum* e a menor por espécies de *Acremonium* (GPCK 531).

Khanam e Jain (2002) selecionaram sessenta amostras de solo coletadas de diversas áreas da cidade de Damoh para o isolamento de fungos capazes de colonizar e atacar substratos queratinosos. Sessenta fungos foram isolados. A distribuição de fungos queratinofílicos em vários tipos de solos e em diferentes tipos de substratos de queratina foi discutida. A partir das amostras positivas (50,0%), um total de oito espécies pertencentes a dois gêneros foram isoladas.

Kiziewicz e Czeczuga (2002) investigaram a ocorrência do fungo queratinofílico *Lagenidium humanum* Karling, utilizando o método de iscas, em relação às condições ambientais nas águas superficiais do rio Bug, Supraśl e Zwierzyniec em Podlasie nos anos 1995-2000. Este foi o fungo mais comum nas águas do Supraśl River e Biała, e exúvia de serpente foi a isca mais freqüentemente colonizada. Foi revelado que a ocorrência de *Lagenidium humanum* nos reservatórios de água foi mais afetado pelo conteúdo de biogenes, sólidos suspensos, oxidantes e temperatura. Sua aparência foi sazonal, sendo mais comum na primavera e no outono.

Shadzi et al. (2002) coletaram 330 amostras de solo e poeira de diferentes locais em 13 escolas elementar e sete parques públicos na província de Isfahan, Irão e examinaram para a freqüência de fungos queratinofílicos pela técnica de isca de cabelo. Duzentos e quatorze isolados de fungos queratinofílicos pertencentes a sete espécies foram identificados. O isolado mais freqüente foi *Chrysosporium keratinophilum* (54,2%). Os resultados ajudam a conlcuir que o ambiente de escolas públicas e parques são contaminados com fungos queratinofílicos potencialmente patogênicos, e assim mais atenção aos cuidados higiênicos deve ser dada nestes lugares, para proteger este grupo suscetível de crianças de infecções fúngicas.

Deshmukh e Agrawal (2003) coletaram um total de 112 amostras de solo de diversas áreas de Jammu, na Índia, rastreadas para a prevalência de fungos

queratinofílicos e dermatófitos afins. De 65 amostras positivas (58,1%), um total de seis gêneros e 13 espécies foi isolado (*A. conjugatum*, *C. indicum*, *C. keratinophilum*, *C. pannicola*, *C. queenslandicum*, *C. tropicum*, *C. zonatum*, *C. serratus*, *K. ajelloi*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentragrophytes*, *T. terrestre*). Os autores concluíram com este estudo que a flora queratinofílica de Jammu difere de outras partes da planície indiana, podendo este fato ser atribuído ao clima e condições ambientais de Jammu– maior altitude, clima frio e solo rico em húmus compacto com uma densa vegetação. Em comparação, as planícies da Índia possuem um clima seco com temperaturas mais elevadas durante a maior parte do ano e solo arenoso que suporta apenas uma fina vegetação escassa.

Ulfig (2003) examinaram fungos queratolíticos e queratinofílicos do lodo de esgoto pelo método de iscagem utilizando fios de cabelo, que foram colocados em diferentes temperaturas (23, 26, 29, 33, 37 e 45 °C). Os resultados indicam que este método pode ser uma ferramenta útil para a determinação da influência da temperatura e outros fatores sobre a composição fúngica em lodo e avaliação de riscos para a saúde. A utilização de diversas temperaturas possibilitou o isolamento de uma maior numero de espécies do que o método tradicional em temperatura ambiente. O método foi adaptado para fins quantitativos. O efeito do peso de discos de lodo em placas de Petri sobre a composição fúngica foi determinado. Um peso de 10 g deve ser utilizado em estudos qualitativos, enquanto os pesos maiores são mais adequados para a determinação da influência de fatores ambientais sobre o crescimento de fungos e composição.

Anbu et al. (2004) estudaram solos de 10 fazendas avícolas de Namakkal e 12 aterros de penas de Chennai quanto a presença de fungos queratinofílicos. Um total de 34 espécies pertencentes a 19 gêneros e um fungo não-esporulante foram isolados. Dezesseis espécies de fungos e um fungo não-esporulante foram comuns aos dois sítios, oito espécies foram específicas para Namakkal e nove espécies foram específicas para Chennai. Dermatófitos e fungos queratinofílicos não dermatófitos foram representados por seis espécies, pertencentes a cinco gêneros. Espécies de fungos comumente encontrados nas amostras de solo incluiram *Chrysosporium keratinophilum* (73%), *Trichophyton mentagrophytes* (68,2%), *Microsporum gypseum* (64%), *Myceliopthora vellerea* (32%), *Chrysosporium* estado de *Arthroderma tuberculatum* (27,3%) e *Geomyces pannorum* (23%). Fungos não dermatófitos foram representados por 28 espécies pertencentes a 14 gêneros e um fungo não-esporulante.

Deshmukh (2004) relataram os resultados de um levantamento preliminar de fungos queratinofílicos associados com penas de pombos em edifícios altos em distrito de Thane, Maharashtra (Índia). Um total de 100 amostras foram examinadas, das quais 67 amostras foram positivas para fungos queratinofílicos. No total, 67 cepas de fungos pertencentes a 10 espécies de sete gêneros foram isolados *Chrysosporium indicum* (24%), *Chrysosporium* sp. (2%), *Chr. tropicum* (8%), *Chrysosporium* anamorfo de *Arthroderma tuberculatum* (3%), *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (15%), *Malbranchea pulchella* (3%), *Malbranchea* sp. (1%), *Microsporum gypseum* (5%), *Myriodontium keratinophilum* (2%) e *Trichophyton terrestre* (4%).

Deshmukh (2004) vinte amostras de solo das salinas e seus arredores em torno de Mumbai e Thane (Índia) foram selecionados para a ocorrência de fungos queratinofílicos e dermatófitos. Dez espécies classificadas em seis gêneros foram isoladas usando como isca a crina de cavalo. As espécies isoladas foram relatadas na seguinte ordem de dominância: *Chrysosporium indicum* (12,0%), *Microsporum gypseum* (7,2%), *C. tropicum* (5,6%), *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (4,0%), *Trichophyton terrestre* (3,2%), *Malbranchea aurantiaca* (2,4%), *C. fluviale* (1,6%), *Uncinocarpus reesii* (1,6%), *Malbranchea* sp. (0,8%) e *T. mentagrophytes* (0,8%).

Lachoria et al. (2004) estudaram a distribuição de fungos queratinofílicos do solo em diferentes localidades do distrito de Sagar (Índia), tendo em vista a importância microbiológica e patológica destes microrganismos. Para isso as amostras de solo foram coletadas em fazendas de aves, perto de lojas de barbeiro, casas de animais e dos hospitais vizinhos. Trinta e uma amostras de solos foram coletadas de diferentes locais do distrito de Sagar para o estudo da presença de fungos queratinofílicos e dermatófitos. Estas amostras renderam um total de 34 espécies pertencentes a 16 gêneros. A prevalência de fungos queratinofílicos em diferentes amostras de solo foi 67,74%.

Saxena et al. (2004) observaram a diversidade da microbiota queratinofílica no solo de Agra durante um ano (Julho 2001-junho 2002), o isolamento dos fungos queratinofílicos foi através do método de iscagem. A freqüência de ocorrência de fungos queratinofílicos em 284 amostras de solo coletadas de vários hospitais, quintais do gado, granjas avícolas, playgrounds e campos de cultivo foi determinado. Em 204 amostras (72%) foram positivas para estes fungos. Um total de 33 espécies classificadas em 11 gêneros (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Emmonsia*, *Geomyces*, *Keratinophyton*, *Microsporum*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Sporotrichum* e

Trichophyton) foram encontradas. Espécies de *Sporotrichum* foram dominantes, seguidas por *Trichophyton simii*. O percentual de isolamento de fungos queratinofílicos encontrado nas amostras estudadas variou entre 62-80%. No solo dos playgrounds foi verificado o número máximo de espécies (80%), enquanto o menos dominante foi o solo de hospital (62%). Entre todas as iscas utilizadas ocorreu o máximo de fungos em cabelos humanos (82%) seguido de pena de galinha (74%), lã (61%) e menos em chifres (45%). O espectro de fungos queratinofílicos isolados em diferentes locais diferem consideravelmente de acordo com a freqüência de uso pelos seres humanos.

Vidyasagar et al. (2005) isolaram fungos queratinofílicos da poeira do corredor de 11 hospitais e solos de 21 lugares públicos, utilizando uma técnica de isca de cabelo. Um total de 41 espécies pertencentes a 24 gêneros foram isoladas. Entre os dermatófitos e espécies afins, *Microsporum gypseum* foi predominante, seguido por *Chrysosporium keratinophilum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *M. nanum* e *Ch. tropicum*. Outras espécies foram representadas por 32 espécies pertencentes a 21 gêneros. A maioria das espécies isoladas são conhecidas por serem agentes de infecções em humanos e animais ou que tenham sido isoladas de lesões humana e animal. O presente estudo revela que os hospitais e lugares públicos de Gulbarga são ricos em fungos queratinofílicos.

Zaki et al. (2005) estudaram a incidência de fungos queratinofólicos em cem amostras de solo lamacento coletados a partir de sete áreas nos arredores do Cairo usando a técnica de isca de cabelo para o isolamento dos fungos. Quarenta amostras de fungos queratinofílicos foram recuperadas e identificadas através das características macro e micromorfológicas. As características fisiológicas e moleculares foram estudadas por determinação da composição ubiquinona (Coenzima Q) e seqüências de DNA de (ITS1-5.8S-ITS2) e seqüências da região 18S rRNA. Os queratinofílicos isolados foram identificados como *Chrysosporium carmichaelii*, *C. queenslandicum*, *C. zonatum*, *C. indicum*, *Aphanoascus mephitalis* e *Uncinocarpus reesii*. *Chrysosporium zonatum* foi a espécie mais freqüente e representou 42,5% do número total de isolados. Cada um dos *C. carmichaelii* e *C. queenslandicum* eram iguais em sua prevalência e representou 15%. *C. indicum* vem em seguida constituindo com 12,5%, seguido por *Uncinocarpus reesii* que representou 10%. A espécie menos prevalente no estudo foi *Aphanoascus mephitalis*, que foi representada por apenas 5% do total de queratinofílicos isolados.

Deshmukh e Verekar (2006) coletaram trinta e duas amostras de solo em seis locais nas proximidades do lago Lonar, uma cratera de um meteorito e rastrearam para a

presença de fungos queratinofílicos usando a técnica de isca de cabelo para o isolamento. Dezessete isolados foram identificados através das características macro e micromorfológicas. A identificação foi confirmada pela pesquisa BLAST de seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA em relação aos do banco de dados NCBI/Gene bank e comparados com sequências depositadas. Sete espécies de quatro gêneros foram isolados *Aphanoascus durus* (9,38%), *Aphanoascus punsolae* (3,125%), *Auxarthron kuehnii* (3,125%), *Chrysosporium indicum* (25,00%), *Chrysosporium tropicum* (3,125%), *Chrysosporium* sp. (3,125%), *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (6,25%).

Hosamani e Vidyasagar (2006) avaliaram os fatores ecológicos de distribuição dos fungos queratinofílicos em solos cultivados e não cultivado de Bidar distrito de Karnataka, na Índia. Foram coletadas amostras de diferentes locais do distrito de Bidar. Um total de 28 espécies de fungos pertencentes a 20 gêneros foram isoladas. Dos solos cultivados e não cultivados, 25 e 23 espécies de fungos foram isoladas, respectivamente. Entre os isolados, *Mucor racemosus*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cunninghamella echinulata*, *Chrysosprium tropicum*, *Malbrachea flava*, *Alternarai alternata*, *Verticillium alboatrium* e *Trichophyton mentagrophytes* foram recuperados de ambos os solos. Estes solos foram quase neutros e levemente alcalinos, com alto teor de carbono orgânico, sulfato, nitrato, cálcio e magnésio.

Moallaei et al. (2006) isolaram de cinqüenta amostras solo coletadas em várias áreas de florestas e fazendas na Província de Golestan, na parte norte do Irã, e determinaram a prevalência de fungos queratinofílicos e espécies dominantes. Um total de 357 colônias de fungos, incluindo 13 gêneros e 11 espécies foram isoladas: *Anixiopsis stercoraria* (16,24%), *Arthroderma cuniculi* (12,04%), *Reniospora flavissima* (9,24%), *Fusarium oxysporum* (9,24%), *Aspergillus flavus* (8,68%), *Chrysosporium keratinophilum* (8,40%), *Trichophyton vanbreuseghemii* (7,84%) e outros fungos (37,56%). O teste de McNemar mostrou que os fungos não queratinolíticos foram dominantes na presente investigação ($P < 0,05$). *Anixiopsis stercoraria* (16,24%) foi o fungo queratinofílico mais prevalente e dominante ($P < 0,05$). Pode-se concluir que os solos da floresta e pátios de Golestan são ricos em fungos queratiofílicos incluindo dermatófitos.

Irun et al. (2007) o solo é bem conhecido por apoiar a contínua existência de fungos queratinofílicos e potenciais fontes de infecção para os seres humanos e animais. Fungos queratinofílicos do solo do Distrito Jamshoro, Sindh foram investigados de

cinco sítios, Universidade de Ciencias Médicas e da Saúde, estrada super, perto Pitaro, cabeça Phulalli e da estação Kotri, no período de junho de 2005 a maio de 2006. Quarenta amostras de solos foram coletadas da superfície, 10, 20 e 30 centímetros de profundidade para determinar a prevalência de fungos queratinofílicos e espécies dominantes. Os fungos queratinofílicos do solo foram estudados pelo método de diluição em placa e técnicas de iscagem. Onze espécies de fungos queratinofílicos foram identificadas, *Aspergillas niger* (31,59%), *A. flavus* (21,40%), *A. fumigatus* (2,82%), *A. candidus* (11,55%), *A. ustus* (2,35%), *A. wentii* (5,26%), *A. nidulans* (2,05%), *Microsporum gypseum* (8,60%), *M. canis* (5,99%), *Cunninghamella echinulata* (4,10%) e *C.eleguns* (4,23%). Os maiores números de espécies foram recuperados do sítio da Universidade de Ciencias Médicas e da Saúde em comparação com outros sítios; em todos os sítios as espécies foram isoladas moderadamente.

Deshmukh et al. (2008) coletaram oitenta amostras de solo de vários locais do Bahrein e rastrearam para a presença de fungos queratinofílicos usando técnicas de isca de cabelo. Trinta e seis isolados foram recuperados e identificados. As culturas foram identificadas através das características macro e micromorfológicas. A identificação também foi confirmada pela pesquisa no BLAST de seqüências da região ITS1-5.8S-ITS2 rDNA em relação aos de banco de dados NCBI/Gene bank e comparado com seqüências depositadas para confirmação. Oito espécies de cinco gêneros foram isoladas *Aphanoascus fulvuscence* (8,75%), *Aphanoascus punsolae* (20,00%), *Chrysosporium indicum* (2,50%), *Chrysosporium tropicum* (2.50%), *Chrysosporium zonatum* (3,75%), *Spiromastix warcupii* (1,25%), *Microsporum gypseum* (3,75%) e *Trichophyton mentagrophytes* (2,50%). Os autores concluíram que através deste estudo comprovou-se que os fungos queratinofílicos ocorrem em vários solos do Bahrein. Além disso, a estreita diversidade e baixa densidade de fungos queratinofílicos nos solos investigados eram esperadas.

Ergin et al. (2008) estudaram ateliers de recreação onde os restos arqueológicos são restaurados às suas formas originais, esses lugares são fechados e possui taxas de umidade elevadas. As mãos e as unhas dos trabalhadores de arqueologia ficam em contato direto com os fungos queratinofílicos durante o trabalho de restauração arqueológica. O objetivo deste estudo foi investigar a presença e distribuição de fungos queratinofílicos no atelier Laodikeia da antiga cidade de recreação (região de Pamukkale, parte do Mar Egeu da Turquia). Um total de 18 amostras foram coletadas dos remanescentes arqueológicos durante o ano de 2006. As amostras foram isoladas

quanto a prevalência de fungos queratinofílicos pela técnica de “Hair bait” e os isolados foram identificados por métodos convencionais micológicos. Das amostras, 38,9% (7/18) foram positivos e a distribuição de fungos queratinofílicos foram os seguintes: *Chrysosporium* spp. (22,2%) (dois deles foram *C. keratinophilum*), *Aphanoascus* spp. (11,1%), *Auxarthron* spp. (5,5%) e *Trichophyton rubrum* (5,5%). Concluiu-se que o histórico do paciente, incluindo condições de vida e de trabalho, pode ser útil para identificar os fungos queratinofílicos que crescem em meio de cultura contendo cicloheximida e os trabalhadores de arqueologia devem ser informados das doenças que podem ser causadas por fungos queratinofílicos ambientais.

Maghraby et al. (2008) estudaram os fungos queratinolíticos que incluem os fungos que degradam a queratina vigorosamente, bem como um número importante de dermatófitos patogênicos ao homem. Foram identificadas 41 espécies e uma variedade, pertencentes a 19 gêneros em 50 amostras de poeira do chão após a cultura em Sabouraud dextrose ágar a 28 °C. Dermatófitos e fungos estreitamente relacionadas foram representados por seis espécies *Aphanoascus fulvescens*, *Aphanoascus* sp. *Arthroderma cuniculi*, *Chrysosporium lucknowense*, *Gymnoascus uncinatus* e *Trichophyton rubrum*. Trinta e cinco espécies foram isoladas, sendo espécies de *Aspergillus* e *Penicllium* as mais prevalentes. Vinte e sete espécies e uma variedade pertencentes a 14 gêneros foram identificados a partir de 24 amostras de poeira recolhida no intervalo de 2 semanas da casa de estudante masculina em El-Kenose entre Janeiro e dezembro de 2005, cultivadas em Sabouraud dextrose ágar a 28 °C. A quantidade de fungos queratinofílicos mostrou flutuações irregulares, com um pico em abril e um ponto mais baixo em novembro. Dermatófitos e fungos taxonomicamente relacionados foram representados por *Aphanoascus fulvescens*, *Aphanoascus* sp., *Chrysosporium lucknowense*, *Gymnoascus uncinatus* e *Trichophyton rubrum*. Com estes resultados os autores comprovaram a incidência de alguns dermatófitos na poeira do chão de casas de estudantes da South Valley University, Egito.

Shrivastava et al. (2008) estudaram a prevalência de fungos queratinofílicos no solo das várzeas durante as diferentes fases do cultivo, transplante, perfilhamento, drenagem e maturação. Do total 76 amostras de solo, 65 amostras foram consideradas positivas para os fungos queratinofílicos. Quatorze espécies pertencentes a um único gênero *Chrysosporium* foram isolados. *C. keratinophilum* (17,1%), seguido por *C. tropicum* (13,15%) foram as espécies geofílicas dominantes. A maior porcentagem de

fungos queratinofílicos apareceu durante a fase da ordenha (100%) de cultivo de arroz, seguido do estágio de maturação (89,47%).

Papine et al. (2008) estudaram a ocorrência de agentes micóticos pela técnica de isca de cabelo no casco de 162 lontras (*Myocastor coypus*) e 64 ratos selvagens marrons (*Rattus norvegicus*) provenientes da mesma área protegida na região central da Itália. Os isolados de lontras (29,6%) foram identificados como *Microsporum gypseum* (14,8%), *Trichophyton terrestre* (9,8%), *Alternaria* sp. (3,7%), *Trichophyton mentagrophytes* (2,5%), *Cladosporium* sp. (1,8%), *Scopulariopsis* sp. (1,2%), e *Chrysosporium keratinophilum* (0,6%), enquanto que os isolados de ratos (46,7%) foram identificados como *M. gypseum* (28,1%), *T. mentagrophytes* (12,5%), *Chrysosporium tropicum*, *T. terrestre* (3,1% cada) e *Chrysosporium inops* (1,6%). Estatisticamente, os ratos marrons eram mais prováveis para abrigar agentes fúngicos (P <0,05) em seu revestimento do que as lontras, especialmente *T. mentagrophytes* (P <0,01) e *M. gypseum* (P < 0.05). Nenhum animal apresentou lesões dermatológicas. Os resultados deste estudo são as informações básicas dando o primeiro passo para o conhecimento da microflora dos cascos de lontras de uma população selvagem. Os autores concluíram que as lontras, um roedor alóctone na Itália, podem desempenhar um papel como reservatório animal natural de dermatófitos e como portador de fungos sapróbios e queratinofílicos como seu novo habitat, embora em menor quantidade que os ratos selvagens. Portanto, as pessoas que estão expostas ao risco de contato com os cascos coypus e ratos devem tomar todos os cuidados necessários para se proteger de agentes micóticos potencialmente transmissíveis ao homem.

Blyskal (2009) estudou as espécies de microrganismos responsáveis pela destruição de substratos particulares, uma das tarefas básicas no campo da biodeterioração, e identificou fatores que impactam o nível de danos causados por estes microorganismos. Mesmo em 1839, era sabido que existiam alguns fungos capazes de atacar tecidos queratinizados, embora, naquele momento, só foram reconhecidos dermatófitos. A literatura relevante relativos à deterioração microbiológica dos substratos queratinosos inclui 299 fungos pertencentes a 100 gêneros. Representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Microsporum*, *Trichophyton* e *Acremonium* parecem ser os mais comuns. Das 299 espécies coletadas, 107 pertencem principalmente à Onygenales e Eurotiales e são patogênicos para o homem. A investigação centrada sobre a capacidade microbiana para colonizar e destruir materiais ricos em queratina tem sido realizada principalmente em lã de ovinos,

pêlos e penas, mas apenas alguns autores têm lidado com a biodeterioração de tecido de lã, que é de particular importância para a preservação de tecidos antigos.

Hedayati e Mirzakhani (2009) isolaram fungos queratinofílicos de lamas das estações de tratamento de águas residuais na cidade de Sari, na província de Mazandaran, República Islâmica do Irã. As amostras foram coletadas a partir de 7 estações de tratamento com diferentes tecnologias de tratamento de esgoto. De 35 amostras de lodo cultivados em ágar Sabouraud com cicloheximida e cloranfenicol, 326 colônias de fungos pertencentes a sete espécies foram isoladas. *Geotrichum* (59,5%), *Cladosporium* (13,8%), *Alternaria* (11,3%) e *Penicillium* (10,7%) espécies foram os gêneros mais prevalentes. Não houve crescimento de fungos queratinofílicos neste meio. No entanto, usando a técnica "Hair bait", *Microsporum gypseum*, *Chrysosporium* spp. e *Geotrichum* spp. foram isoladas.

Mandeel et al. (2009) estudaram a ocorrência de fungos queratinofílicos associados com pena de 10 espécies de aves utilizando Agar Mycobiotic e incubando a 25 ± 2 °C durante 4 semanas. Um total de 225 amostras de penas foram cultivadas, das quais 157 (69,77%) apresentaram fungos queratinofílicos. No total, 184 isolados fúngicos representados por 11 espécies e agrupados em cinco gêneros foram recuperados: *Chrysosporium*, *Trichophyton*, *Arthroderma*, *Scopulariopsis* e *Sepedonium*. Com base nos valores de densidade relativa para classificar a prevalência das espécies, o gênero mais freqüente foi *Chrysosporium*. *Chrysosporium keratinophilum* foi a espécie predominante (54,34%) na maioria das espécies de aves, seguido por *Chrysosporium tropicum* (17,93%). A densidade relativa de menos de 10% foi observada com *Chrysosporium merdarium* (8,69%), seguido por *Scopulariosis* spp. (7,06%). A mais baixa densidade de ocorrência foi obtida com *Arthroderma tuberculatum* (0,54%) e *Sepedonium* spp. (0,54%). Papagaios Alexandrino e galinhas rendeu a mais ampla diversidade de espécies de fungos queratinofílicos (6), seguido de codornas, patos e pombos (5), enquanto pombinhos mostraram estreita diversidade de espécies (1). Os números médios de espécies e isolados por ave é de 3,7 e 18,4, respectivamente. O estudo mostrou ainda que, aparentemente, penas de aves saudáveis podem abrigar uma variedade de fungos que podem ser consideradas como uma fonte potencial de transmissão de patógenos de importância clínica.

Singh et al. (2009) estudaram os dermatófitos, fungos queratinofílicos e oportunistas da poeira de 46 hospitais e 47 imóveis em Kanpur, Índia. Um total de 19 espécies representadas por 1 gênero foram isoladas pela técnica da isca de cabelo de 230

e 235 amostras dos hospitais e imóveis, respectivamente. Os fungos isolados foram *Acreminium implicatum* (Coleção de Cultura Tipo Indiana) ITCC 5266, *A. strictum* (Centro Germoplasma para Fungos Queratinofílicos) GPCK 1137, *Aphanoascus fulvescens* GPCK 1081, *Arthroderma simii* GPCK 1275, *Chrysosporium queenslandicum* ITCC 5270, *C. indicum* ITCC 5269, *C. pannicola* GPCK 1022, *C. tropicum* GPCK 1269, C*tenomyces serratus* ITCC 5267, *Gymnoascus reessii* ITCC 5265, *Malbranchea fulva* GPCK 1075, *Malbranchea pulchella* ITCC 5268, *Mycrosporum gypseum* GPCK 1038, *M. cookei* GPCK 2001, *M. fulvum* GPCK 2002, *Paecilomyces lilacinus* GPCK 1080, *Penicillium expansum* GPCK 1082, *Trichophyton mentagrophites* GPCK 2003 e *T. terretre* GPCK 2004. Em hospitais a freqüência mínima foi de *Ctenomyces serratus* ITCC 5267 enquanto que a freqüência máxima foi de *Arthroderma simii* GPCK 1275. Em imóveis, *Chrysosporium queenslandicum* ITCC 5270 e *C. tropicum* GPCK 1269 foram os que apresentaram a freqüência mínima e máxima, respectivamente. Este foi o primeiro relato para estes fungos com habilidade queratinolítica em poeiras de hospitais e imóveis em Kanpur, Índia.

Singh et al. (2009) isolaram cento e nove fungos pertencentes a 10 gêneros, representando 20 espécies de fungos queratinofílicos, do solo de vasos de barro plantados em ambientes fechados de 15 localidades de Kanpur, Índia, pela técnica de isca de cabelo. *Microsporum gypseum*, *Trichophyton vanbreuseghemii* e *Botryotrichum piluliferum* produziram 698,66, 512,99 e 519,99 µg/ml de proteína líquida, respectivamente, enquanto *Arthroderma cuniculi* produziu o mínimo, 107,99 µg/ml. Todos os outros isolados foram ativos queratinoliticamente. Os solos de vasos de plantas de interior podem ser um reservatório significativo de determinados fungos queratinofílicos nas casas porque os solos de plantas de interior têm sido associados a casos de dermatomicose e outras doenças.

Deshmukh e Verekar (2010) estudaram cinquenta e três amostras de solo coletadas em vários locais nos arredores de Vedanthangal Water Bird Sanctuary e rastreados quanto a presença de fungos queratinofílicos, usando a técnica de isca de cabelo para o isolamento. Vinte e oito isolados foram recuperados e identificados pelo reconhecimento das características macro e micromorfológicas. Sete espécies relacionadas a cinco gêneros foram registradas *Auxarthron conjugatum* (1,89%), *Chrysosporium fluviale* (3,77%), *Chrysosporium indicum* (20,75%), *Chrysosporium tropicum* (7,55%), *Chrysosporium* anamorfo de *Ctenomyces serratus* (5,66%), *Gymnoascus petalosporus* (1,89%) e *Microsporum gypseum* (11,32%). O estudo mostra

que as aves migratórias abrigam uma grande variedade de fungos queratinofílicos e pode ser uma fonte potencial de transmissão desses fungos a partir de um local para outro.

Korniłłowicz-Kowalska e Bohacz (2010) estudaram a sucessão de comunidades de diferentes bactérias e fungos, principalmente os proteolíticos e queratinolíticos, durante a compostagem de penas de frango com casca de pinus (FB) e palha de centeio/casca de pinus (FBS). A sucessão foi dominada por fungos de comunidades bacterianas. Bactérias, incluindo actinomicetos, cresceram intensamente durante as primeiras (2-4) semanas de compostagem e incluíam principalmente populações proteolíticas, raramente celulolíticas, depois, as bactérias foram gradualmente substituídas por fungos. Fungos meso e termofílicos foram onipresentes, incluindo os celulolíticos, que apareceram entre os primeiros, enquanto que cepas queratinolíticas foram detectadas na compostagem de biomassa na 6ª semana do processo. O desenvolvimento de linhagens dentro do segundo grupo de fungos foi significativamente mais intenso do que os de populações celulolíticas. A intensidade do crescimento de comunidades particulares ecológicas-fisiológicas foi encontrada como sendo dependente da composição química e relação C/N da biomassa e o crescimento foi mais intenso em C/N = 25 compostos.

2.5. Produção e otimização de produção das queratinases

As queratinases têm especificidade por um grande grupo 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, extrato córneo e azoqueratina (Bressollier et al., 1999; Friedrich e Kern, 2003). Essas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparada com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases de outras proteases (Onifade et al., 1998). As queratinases pertencem ao grupo das 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 serinas proteases extracelulares, com exceção

das queratinases produzidas por leveduras que pertencem ao grupo das aspartato proteases extracelulares (Negi et al., 1984; Lin et al., 1992). Na tabela 4 é mostrada a atividade queratinolítica de alguns fungos protutores de queratinase e os substratos e condiçoes de cultivo desses micro-organimos.

Tabela 4 Condições de cultivo de fungos produtores de queratinase e substratos utilizados.

Fungos	**Substratos e condições de cultivo**	**Referências**
Dermatófitos	Cultivo líquido submerso. Cabelo, de pêlos de porquinho-da-índia e de penas de galinha.	Wawrzkiewicz et al. 1991
Aspergillus fumigatus	Cultivo lpiquido submerso. Pena de galinha, glicose e nitrato, queratina azul.	Santos et al. 1996
Chrysosporium, *Malbranchea*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, *Gliocladium*	Cultivo líquido submerso. Cabelo humano e cabelo humano suplementado com glicose.	Kaul e Sumbali 1997
Espécies de *Chrysosporium*	Cultivo líquido submerso. Penas de galinha branca, cabelo humano e bovino, lã de ovelha.	El-Naghy et al. 1998
Chrysosporium, *Malbranchea*, *Chaetomium*, *Sepedonium*, *Microascus*, *Scopulariopsis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*	Cultivo líquido submerso. Cabelo humano.	Kaul e Sumbali 1999
Acremonium, *Aphanoascus*, *Amauroascus*, *Botryotrichum*, *Chrysosporium*, *Ctenomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea*, *Microsporum*, *Narashimella*, *Verticillium*	Cultivo líquido submerso. Penas de galinha.	Parihar e Kushwaha 2001

Cont.

Fungos	**Substratos e condições de cultivo**	**Referências**
Microsporum, *Trichophyton*, *Brevicaulis Scopulariopsis*, *Alternaria*, *Geotrichum*	Cascos de eqüino e pele.	Apprich et al. 2006
Aspergillus carbonarius	Cultivo submerso com penas de frango e sais.	Sales et al. 2007
Beauveria bassiana	Cultivo líquido submerso com farinha de penas de aves de capoeira.	Marcondes et al. 2008
Aspergillus, *Cladosporium*, *Metharrhizium*, *Neurospora* e *Westerdikella*	Fermentação em estado sólido com farelo de soja, triptona e pêlo de vaca.	Elíades et al. 2010

As enzimas queratinolíticas são geralmente produzidas em fermentação submersa por fungos e bactérias (Onifade et al., 1998). Essa produção é muito influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e por outros fatores como concentração do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação, essencialmente, cada organismo tem suas condições especiais de produção máxima da enzima (Singh et al., 1995; Ignatova et al., 1999; Puri et al., 2002; Anbu et al., 2007). O estudo de processos de otimização através de um *design* fatorial e análise das respostas são importantes para determinar as condições ótimas do processo de produção da queratinase extracelular (Anbu et al., 2007). Na tabela 5 são mostradas as melhores condições de cultivo de alguns fungos produtores de queratinase.

Tabela 5 Melhores condições para a produção de queartinase por diferentes fungos, variáveis estudados e metodologia aplicada.

Fungos	**Fatores**	**Metodologia**	**Melhores condições**	**Referências**
Doratomyces microsporus	pH, temperatura, concentração de queratinase, substrato, tempo de incubação	Design experimental	28 °C; pH 9,5; QL, 0,94%; pele, 4,9%; e 5 h. pH 9,2; QL, 0,11%; unha, 4,9% e 6 h.	Vignardet et al. 1999

Cont.

Fungos	Fatores	Metodologia	Melhores condições	Referências
Kocuria rósea	Penas e magnésio	Metodologia de superfície de resposta.	NH_4Cl, 0,3 g; NaCL, 0,3 g; K_2HPO_4, 4,0 g; $MgSO_4.6H_2O$, 0,5 g; extrato de levedura, 0,1 g; e pena (30 g)	Bernal et al. 2006
Scopulariopsis brevicaulis	pH, T, tempo de incubação, glicose, $NaNO_3$, pena e $CaCl_2$.	Metodologia de superfície de resposta.	pH 7,5; 30 °C; 1% glicose; 2% $NaNO_3$; 1,5% pena; 1mM $CaCl_2$.	Anbu et al. 2007
Aspergillus carbonarius	Agitação, substrato e tempo de incubação.	Palanejamento fatorial completo 2^3.	120 rpm, 0,5% de penas de frango e sete dias de cultivo.	Sales et al. 2008
Myrothecium verrucaria	Diferentes fontes de C e N e pó de penas de aves de capoeira (PFP).	Cultivo submerso e em estado sólido.	Suplementação do meio com PFP e com bagaço de mandioca.	Gioppo et al. 2009
Myceliophthora thermophila	Composição do meio, condições de cultura	Planejamento fatorial.	Amido, uréia, tiossulfato de sódio e $CaCl_2$ f. Uréia e pH significativos.	Liang et al. 2011

As atividades para enzimas queratinolíticas 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 produzida por *Chrysosporium keratinophilum* que hidrolisava somente queratina, e não mostrava nenhuma atividade para a caseína e soroalbumina bovina. Isto indica que a enzima isolada era especifica 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 e 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 intracelular para o meio externo (Onifade et al., 1998).

Wawrzkiewicz et al. (1991) estudaram a habilidade de 16 extratos de dermatófitos em utilizar substratos de queratina como única fonte de carbono e nitrogênio. Os substratos utilizados incluem solubilizados de queratina natural do cabelo, de pêlos de porquinho-da-índia e de penas de galinha. Tem sido demonstrado que a preparação de queratina de pena, constitui um modelo conveniente para uma estimação preliminar da atividade de fungos queratinolíticos e pode ser uma fonte de informação sobre a localização da enzima. Foi observado que, das 16 amostras de fungos, 13 sintetizaram principalmente queratinase intracelular, enquanto três amostras de *Trichophyton verrucosum* liberaram enzimas principalmente para o meio. A queratina procedente do cabelo e pena foi degradada por poucas amostras dos fungos estudados que, em condições experimentais, desenvolvem esporos característicos. A solução de queratina de pêlo do porquinho-da-índia foi atacada apenas por *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum* e *Keratinomyces ajelloi*, e apenas *T. gallinae* cresceu em queratina natural de pena de galinha.

Santos et al. (1996) estudaram a capacidade do *Aspergillus fumigatus* utilizar a queratina (pena de frango) como única fonte de carbono e nitrogênio. Devido a conversão enzimática da queratina nativa ser facilmente utilizada em produtos de interesse econômico, esse fungo foi estudado quanto a capacidade de produzir e secretar proteinases que hidrolisam a queratina. A hidrólise da queratina-azul foi quantificada no filtrado do meio de cultura que continha a queratina. Foi encontrada uma baixa atividade em culturas contendo glicose e nitrato, como única fonte de carbono e nitrogênio, e também nas culturas contendo queratina, glicose e nitrato. A secreção da queratinase em *A. fumigatus* foi induzida pela queratina, porém reprimida por fontes de carbono e nitrogênio de baixo peso molecular. A quantidade de enzima queratinolítica presente no filtrado foi dependente do pH inicial do meio de cultura. O extrato bruto também hidrolisa a queratina e caseína *in vitro*. A hidrólise foi ótima a pH 9,0 e 45 °C. O extrato bruto foi notavelmente termoestável. A 70 °C reteve 90% de sua atividade

original por 1,5 h. Os resultados obtidos indicam que a atividade queratinolítica de *A. fumigatus* pode ser adequada para melhoramento enzimático das rações a base de pena.

Kaul e Sumbali (1997) estudaram espécies de *Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Scopulariopsis*, *Microascus* e *Gliocladium* isoladas de aves de capoeira e cultivaram em dois meios de queratina: meio basal com cabelo humano como única fonte de carbono e nitrogênio e meio basal com cabelo humano suplementado com glicose. Todos os fungos testados poderam crescer em queratina (cabelo humano) e degradá-lo, liberando compostos sulfidrílicos detectado como queratinase extracelular, cisteína e proteínas totais. O meio de queratina suplementado com glicose apresentou o máximo de atividade queratinolítica. A atividade queratinolítica também alterou o pH do meio para a alcalinidade e as espécies com capacidade queratinolítica fortes tornaram a cultura mais alcalina do que aquelas que foram menos queratinolítica.

Singh (1997) estudou a habilidade de *Trichophyton simii* HN 50, isolado do Santuário de Pássaros de Gana, Índia, em produzir queratinase extracelular. A enzima foi produzida em meio líquido contendo sais e queratina a pH 7 e temperauta de 28 ± 1°C. A secreção da enzima foi melhor após 15 dias de incubação. A adição de asparagina e queratina foram repressoras da enzima em comparação com a gelatina. Não foi observada relação entre a produção da enzima e biomassa. Os açucares exógenos suprimiram a produção de queratinase em oredem decrescente: glicose>manose>maltose>arabinose>frutose. A enzima mostrou habilidade para degradar os três substratos de queratina (pele de búfalo, unha humana e pena de frango). Pele de búfalo foi a mais degradada na ausência de glicose enquanto penas de frango tiveram o mínimo de degradação em sua presença.

El-Naghy et al. (1998) usaram a técnica de isca de cabelo para isolar *Chrysosporium georgiae* a partir de penas de galinha. Vinte e oito diferentes fungos foram isolados e avaliados quanto à capacidade de produzir enzimas queratinolítica em meio basal contendo como fonte de queratina ou penas de galinha branca ou uma suspensão preparada de queratina de penas. As espécies de *Chrysosporium* foram capazes de usar a queratina. *Chrysosporium georgiae* degradou completamente a queratina adicionada após 9 dias de incubação. A degradação de penas por *C. georgiae* foi afetada por vários fatores culturais. A maior atividade queratinolítica ocorreu após três semanas de incubação em pH 6 e 8 a 30 ºC. *Chrysosporium georgiae* foi capaz de degradar penas de galinha branca, enquanto que o cabelo humano e bovino, lã de ovelha não foram degradados e não apoiaram o crescimento do fungo. A adição de 1% de

glicose para o meio contendo queratina melhorou o crescimento do fungo e aumentou a produção da enzima. A suplementação do meio de sal e queratina com minerais como o NH_4Cl e $MgSO_4$ aumentou ligeiramente o crescimento micelial, mas diminuiu a produção de queratinase extracelular. Enzimas queratinolíticas não foram muito produzidas na ausência de queratina, indicando sua natureza induzível. Análise de queratinases endocelular no homogeneizado de micélio indicou maior atividade de queratinase intracelular, em comparação com a enzima extracelular em filtrados de cultura. *Chrysosporium georgiae* foi superior para produção de queratinase entre as espécies de *Chrysosporium* testadas na presença ou ausência de glicose.

Letourneau et al. (1998) estudaram a produção de alta atividade queratinolítica por um novo isolado de *Streotomyces* sp. $S.K_{1-02}$, isolado de pena naturalmente degradada, quando cultivado em meio de pena como única fonte alimento. A degradação máxima da queratina obtida do fluído sobrenadante de uma cultura desse organismo foi observado a 70 °C e pH 10. A atividade queratinolítica foi parcialmente inibida por EDTA ou PMSF, sugerindo que a atividade queratinolítica total foi suportada por proteases diferentes. A comparação entre atividades proteolíticas derivados desse novo isolado $S.K_{1-02}$ e proteases comerciais indicou que $S.K_{1-02}$ pode ser um instrumento biotecnológico para a valorização de resíduos contendo queratina, ou no processo de depilação na indústria do couro.

Kaul e Sumbali (1999) estudaram 14 espécies de fungos queratinofílicos pertencentes a dez gêneros (*Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Chaetomium*, *Sepedonium*, *Microascus*, *Scopulariopsis*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*), isoladas de aproximadamente cem aves domésticas. Os fungos isolados das penas foram comparados quanto a atividade queratinásica após o crescimento em dois meios de cultura diferentes: (1) solução mineral contendo queratina natural (cabelo humano) como única fonte de carbono e nitrogênio; (2) meio suplementado com a menor quantidade de carbono facilmente assimilável junto com queratina natural. Em todos os testes observou-se o crescimento dos fungos no substrato de queratina, degradando e liberando ligações sulfidrilas, contendo compostos detectados como cisteína, proteínas totais e queratinase extracelular. A liberação máxima de enzima por esses fungos ocorreu no caldo suplementado com glicose e vitaminas, indicando uma correlação entre biomassa micelial e produção de queratinases proteolíticas.

Friedrich et al. (1999) estudaram aproximadamente 300 fungos que foram caracterizados quanto a síntese de queratinase extracelular. Mais ou menos 54% dos

fungos cresceram em placas com Ágar e queratina solúvel e liberou a enzima. Apenas representantes de *Fusarium*, *Acremonium* e *Geotrichum* foram os mais ativos. Entretanto, quando cultivadas as colônias promissoras em condições submersas, contendo no meio de cultura solubilizado de unha como única fonte de carbono e nitrogênio, outros fungos mostraram sua atividade. *Aspergillus flavus* foi o maior produtor da queratinase extracelular, seguido por *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotrys atra*.

Singh (1999) estudou a habilidade de *Malbranchea gypsea* IMI 338168, isolado do solo do Parque Nacional Keoladeo, Índia, de produzir proteases extracelulares no meio de glicose-gelatina pH 7, 28 °C. A produção de proteases foi ótima após 15 dias de incubação. A asparagina foi a protease de maior expressão, não existiu relação entre e a quantidade de produção da enzima e o aumento da biomassa. Açúcares exógenos suprimiram a produção da enzima em ordem decrescente: glicose>manose>maltose>arabinose>frutose. As enzimas mostraram habilidade para degradar os substratos queratinosos testados. Pele de búfalo foi o substrato mais ativamente degradado na presença de glicose exógena, e foi também a mais resistente a degradação na ausência de glicose. A taxa de degradação da queratina foi independente da atividade da enzima. A partir desses resultados, concluiu-se que a produção de proteases especialmente as queratinases são importantes em locais como o Parque Nacional porque cada enzima degrada detritos queratinosos derivados de mamíferos e aves. O acúmulo desses resíduos pode ser uma causa de poluição e pode promover uma reprodução local de vários tipos de patógenos.

Vignardet et al. (1999) estudaram a influência do pH, temperatura, concentração de queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação para a liberação de proteínas solúveis pela queratinase produzida por *Doratomyces microsporus* em um "design" experimental. Apenas 16 análises espectrofotométricas foram requeridas. Esse estudo foi realizado para medir, de acordo com o método de Smith's, a concentração de proteínas liberadas pela enzima a partir de dois substratos humanos: extrato córneo e unha. Os resultados das condições ótimas da queratinase para liberar as proteínas solúveis foram: 28 °C; pH 9,5; concentração de queratinase, 0,94% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 4,9% (peso da pele pó/volume final); e 5 h e 50 min. de incubação para extrato córneo e 37 °C; pH 9,2; concentração de queratinase, 0,11% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do

substrato, 4,9% (peso da unha pó/volume final); e 6 h e 10 min. de incubação para unhas.

Muhsin e Salih (2000) isolaram 16 espécies de fungos de 182 espécimes coletados de quatro ruminantes (búfalo, camelo, gado e ovelha), no sul do Iraque. Representantes de cinco espécies de dermatófitos e 11 espécies de outros fungos foram caracterizados quanto a atividade de quatro enzimas: queratinase, protease, lipase e amilase. As queratinases foram produzidas por todos os dermatófitos e não dermatófitos, exceto por *Paecillomyces variotii* e *Scytalidium lignicola*. Foram observadas altas atividades de queratinase entre os dermatófitos, particularmente *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* e *Microrporum gypseum*. Três dermatófitos, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton verrucosum* e *T. mentagrophytes* var. *nodulare*, foram capazes de produzir proteases, lípases e amilases. Entretanto, *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* apresentou alta atividade proteásica, e não produziu lipase e amilase. Ao contrário, muitas espécies de não dermatófitos revelaram altas atividades de protease e lipase. C*urvularia* sp. apresentou altas atividades de lipases e proteases, enquanto *Aspergillus parasiticus* apresentou alta atividade de lipases e amilases. Nenhuma correlação foi observada entre atividade enzimática e a taxa de crescimento dos fungos examinados.

Parihar e Kushwaha (2001) estudaram cem fungos queratinofílicos pertencentes a *Acremonium*, *Aphanoascus*, *Amauroascus*, *Botryotrichum*, *Chrysosporium*, *Ctenomyces*, *Gymnoascus*, *Malbranchea*, *Microsporum*, *Narashimella* e *Verticillium* quanto ao potencial de utilizar a penas de galinha como resíduos queratinosos. *Acremonium* sp. 2 e *Chrysosporium europae* liberaram 494,33 e 457,33 µg/ml de queratinase a partir das penas, respectivamente. *Microsporum gypseum* liberou 698,66 µg/ml de queratinase a partir das penas. Algumas dessas cepas queratinofílicas e outros *Microsporum* podem ser utilizados para degradação rápida não apenas das penas, mas outros substratos rígidos de queratina, e seus produtos finais podem ser de importância industrial.

Al-Sane et al. (2002) estudaram a ocorrência de fungos e actinomycetes degradadores da queratina no solo do Kuwaiti. A avaliação e melhoramento para sua atividade queratiolítica e a caracterização da queratinase forma investigadas. As amostras de solo foram coletadas de diferentes partes do Kuwaiti usando como isca lã animal em placas de Petri, incubadas a 25 °C por 8 semanas, constantemente umedecidas com água contendo cloranfenicol para evitar o excessivo crescimento

bacterial. As espécies mais freqüentes pertenceram a *Chrysosporium*, contudo, espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* e *Acremonium* e três actinomycetes foram também isolados. A indução da produção da queratinase por *Chrysosporium zonatum*, *C. pannicola* e *Streptomyces* sp. foi seletivamente investigada *in vitro* usando um meio impregnado de queratina. Um melhoramento considerável na produção da queratinase foi obtido por cultivo direto do microrganismo em meio de sais com queratina. Aumento do inóculo, tamanho do substrato e agitação mecânica por 200 rpm, foram mais importantes para aumentar a degradação do substrato e encurtar o tempo de fermentação. A protease extracelular dos organismos queratinolíticos foi concentrada no meio de cultura por frações de sulfato de amônia ate 80% para a caracterização físico-química. Os autores concluíram que o solo do Kuwaiti é rico em microrganismos produtores de queratinases. E que são justificados mais estudos para aplicações biotecnológicas, ambientais e industriais das queratinases.

Singh (2002) estudou a capacidade de *Chrysosporium keratinophilum* (IMI 338142), isolado de águas contaminadas com organo-poluentes, para produzir proteases extracelulares em meio de gelatina-glicose. A secreção da enzima foi melhor no décimo quinto dia de incubação, pH 8,0 e temperatura de 40 ºC. Asparagina reprimiu a expressão da protease. Não foi observado uma relação entre produção da enzima e aumento em biomassa. Açúcares exógenos reprimiram a produção da enzima na seguinte ordem decrescente: glicose>arabinose>maltose>manose>frutose. A enzima liberada possui a habilidade de decompor dois substratos de queratina testados (pele de búfalo e pêlo da cauda de búfalo). A presença de glicose reprimiu a produção da enzima e degradação da queratina. Entretanto, a taxa de degradação da queratina foi independente da produção da enzima.

Ghahfarokhi et al. (2003) estudaram o efeito de extratos de cebola e alho no crescimento fúngico e atividade queratinolítica de *Trichophyton mentagrophytes*, um dos maiores agentes etiológicos de dermatofitoses em humanos e animais no Irã e outras partes do mundo. Para selecionar a melhor produção da queratinase, condições de cultivo de 30 isolados de *T. mentagrophytes* procedentes de dermatofitoses humanas, foram otimizados em meios específicos, sólidos e líquidos. Todos os isolados produziram a enzima em ambos os meios de cultura. A atividade queratinolítica máxima para culturas submersas foi mostrado para o isolado número 1, num período de crescimento de 12 dias a 32 °C. A atividade da queratinase extracelular foi entre 0,28 e 2,18 U/mg de proteína nos diferentes isolados em condições ótimas pré-determinadas. O

crescimento de *T. mentagrophytes* N˚ 1 foi inibido na presença de várias concentrações de extratos de cebola e alho. Essa inibição alcançou seu máximo de 100% para ambos os extratos em concentrações de 10% v/v. A síntese da queratinase extracelular foi também inibida pelos dois extratos com máximos entre 58,54 e 71,36% e concentrações de 5%. Em contraste com o crescimento fúngico, a atividade queratinolítica foi inibida mais por extratos de alho quando comparada com extrato de cebola. Esse é o primeiro relato sobre inibição da queratinase por esses dois compostos naturais. Sendo o crescimento fúngico e atividade queratinolítica fatores importantes na patogenicidade desses dermatófitos. Essa inibição indica que extratos de cebola e alho podem ter valor potencial no tratamento dos dermatofitoses em humanos e animais.

Khanam et al. (2004) estudaram quarenta e sete fungos isolados do solo utilizando a técnica de isca de cabelo quanto a degradação da queratina e produção de lipase e gelatinase. A maioria dos fungos degradou uma maior quantidade de penas de galinha que cabelos humanos. Todos os fungos produziram lipase, enquanto que apenas 42 fungos produziram protease extracelular (gelatinase). *Scytalidium album* MA3 causou um máximo de 57,5 ± 0,04 % de degradação de penas de galinha em 20 dias a 28 ± 2 °C, enquanto CH1 e CH3 isolados de *Chrysosporium*, F7 e F8 de *Fusarium* e MI 3 de *Microsporum* degradaram entre 40-50 % das penas no mesmo período. Esse fungos possuem uma grade importância na bioconversão de resíduos de queratina em produtos de valor acrescentado.

Scott e Untereiner (2004) determinaram a degradação da queratina azure por fungos. A queratina azure foi adicionada sobreposta ao meio basal de alto pH. O lançamento e a difusão do corante azure na camada indicaram produção de queratinase. Cinqüenta e oito amostras de fungos, incluindo 49 membros de Arthrodermataceae, Gymnoascaceae e Onygenaceae (Ordem Onygenales), foram avaliados quanto a degradação da queratinase usando este método. Muitas das cepas testadas mostraram rápida resposta com difusão até 7 dias, entretanto uns poucos isolados conhecidas como espécies queratinolíticas mostraram degradação negativa da queratina após 4 semanas de incubação e apenas produziram fraca difusão do corante após 6 semanas. Entre os 20 membros de Artrodermataceae 5 difundiram o corante com ste dias de incubação e seis apenas com 28 dias e 9 não produziram queratinase. Dos 24 membros de Onygenaceae três demonstraram claramente a difusão do corante até 7 dias, essa proporção aumentou para 10 depois de 28 dias de incubação. As 5 espécies de Gymnoascaceae e seis de Trichocomaceae testadas nenhuma apresentou produçao de queratinase ate 28 dias de

incubação. Os resultados deste estudo demonstram que a degradação da queratina azure por fungos pode ajudar na identificação dos caracteres espécies-especificos de membros de Onygenaceae.

Gradisar et al. (2005) baseados em prévias caracterizações para fungos queratinolíticos não-patogênicos, selecionaram as espécies *Paecillomyces marquandii* e *Doratomyces microsporus*, para avaliar a produção de queratinases potentes. As enzimas foram purificadas e as principais características bioquímicas determinadas (massa molecular, temperatura ótima e pH para atividade queratinolítica e seqüência dos aminoácidos N-terminal). Estudos de substratos específicos revelaram que constituintes da pele, tais como a camada córnea, e anexos como unhas, penas e lã, foram eficientemente hidrolisados pela queratinase de *Paecillomyces marquandii* e aproximadamente, menos de 40% pela queratinase de *Doratomyces microsporus*. A hidrólise da queratina pode ser aumentada pela presença de agentes redutores. As propriedades catalíticas das queratinases foram estudadas e comparadas com algumas conhecidas queratinases comerciais. A queratinase de *Paecillomyces marquandii* exibiu uma baixa atividade em comparação com as queratinases microbiológicas apresentadas na literatura, e sua eficiência catalítica foi alta em comparação a queratinase e proteína K de *Doratomyces microsporus*.

Saxena et al. (2005) estudaram a degradação microbiana de cinco fungos queratinofílicos, *Chrysosporium* anamorfo de *Rollandina vriesii*, *Geomyces pannorum*, *Microsporum fulvum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. terrestre* em condições de agitação. A degradação microbiana foi estimada em termos de porcentagem de perda de peso e lançamento de proteína, queratinase, cisteína, cistina, metionina e mudança no pH do filtrado da cultura. *Geomyces pannorum* mostrou liberação de proteína, queratinase, cistina e metionina máxima com uma considerável mudança no pH para a alcalinidade.

Apprich et al. (2006) estudaram as propriedades queratinolíticas de dois dermatófitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*) e três não dermatófitos (*Brevicaulis Scopulariopsis*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*) isolados de cascos de eqüinos doentes, para melhor compreender os mecanismos patogênicos que levando os eqüinos a desenvolveram a onicomicose. Cascos de eqüino e pele, bem como casco de queratina e tecido cutâneo de queratina extraído dos tecidos correspondentes, foram utilizados como única de carbono e nitrogênio em cinco tubos de ensaio para cada fungo. Dentro de 18 dias, sobrenadantes de todos os tubos foram

repetidamente analisados quanto a atividade queratinolítica por SDS-PAGE e análise Western blot. Além disso, as taxas de crescimento fúngico foram determinadas para identificar o tecido preferencial dos fungos individualmente. Dentre os fungos analisados, *M. gypseum* foi a espécie mais queratinolítica, seguido por *T. mentagrophytes* e *S. brevicaulis*. Na concentração aplicada, os não dermatófitos *A. alternata* e *G. candidum* mostraram atividade queratinolítica mínima. Com respeito as taxas de crescimento, *M. gypseum* foi favorecido com cascos, *S. brevicaulis* e *G. candidum* preferiram a pele como fonte de queratina, ao passo que para os outros dois fungos não foi detectada clara preferência.

Bernal et al. (2006) estudaram o aumento da produção da queratinase por *Kocuria rosea* obtido em lotes de fermentação utilizando a metodologia superfície de resposta. "Designs" fatoriais foram utilizados para selecionar os componentes do meio de cultura que mostrou um significante efeito na produção da queratinase. Um ponto central-ortogonal compôs o "design" experimental realizado, com apenas dois (penas e magnésio) dos nove compostos iniciais, sendo analisado pela metodologia de superfície de resposta. Uma ótima produção de queratinase foi obtida com a seguinte composição do meio (por litro): NH_4Cl, 0,3 g; NaCL, 0,3 g; K_2HPO_4, 4,0 g; $MgSO_4.6H_2O$, 0,5 g; extrato de levedura, 0,1 g; e pena moída (30 g). O meio foi agitado a 400 rpm com um período de incubação de 14 h e 40 °C.

Anbu et al. (2007) estudaram os fatores que influenciam a produção da queratinase por *Scopulariopsis brevicaulis*, isolado de fazenda de aves domésticas. Os parâmetros foram otimizados por "design" fatorial. O máximo de produção da enzima foi obtido a pH 7,5, temperatura de 30 °C e crescimento em um período de 5 semanas. A produção da enzima foi melhorada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%), nitrato de sódio (2%), pena (1,5%) e Cl_2Ca (1mM).

Moreira et al. (2007) descreveram a capacidade de *Myrothecium verrucaria* crescer em culturas submersa e sólida usando penas de aves domésticas como único substrato. Este fungo produziu uma protease com uma incomum atividade queratinolítica entre os fungos patogênicos de plantas. A protease hidrolisou substratos queratinosos em pH 9,0 e 40 °C na seguinte ordem: queratina de penas de aves domésticas > queratina de lã de ovelha > queratina de unha humana > queratina de cabelo humano. A atividade da protease foi altamente sensível para fenilmetil sulfonil fluoride (PMSF) indicando que esta enzima pertence a família das serina- proteases.

Sales et al. (2007) selecionaram espécies de *Aspergillus* capazes de produzir enzimas queratinolíticas em meio contendo pena. Nove amostras deste microrganismo foram crescidas em cultura liquida submersa de penas e sais, após centrifugação o sobrenadante foi usado para verificar a atividade enzimática. A atividade proteásica, queratinolítica e o pH do meio foram analisados. O melhor produtor da queratinase foi *Aspergillus carbonarius* que apresentou uma atividade queratinolítica de 21,28 U/mL em pH 7,4 com atividade proteolítica de 0,64 U/mL. Esses resultados mostram que *Aspergillus carbonarius* pode ser usado pela indústria biotecnológica para a bioconversão de penas para ração rica em proteínas.

Marcondes et al. (2008) isolaram 106 fungos filamentosos de resíduos de exploração de aves de capoeira, 13 espécies pertencentes a sete gêneros (*Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauvaria*, *Curvularia*, *Paecilomyces* e *Penicillium*) foram capazes de crescer e produzir queratinase em cultura estacionária com farinha de penas de aves de capoeira apenas como substrato. Os quatro produtores mais eficientes de queratinase foram selecionados para um estudo comparativo, estudo da produção de queratinase em condições submersas e estacionárias. As maiores atividades queratinolítica foram produzidas após 4-6 dias de cultivo em fermentação submersa com as seguintes atividades: 53,8 ± 6,1 U/mL (*Alternaria tenuissima*), 51,2 ± 5,4 U/mL (*Acremonium hyalinulum*), 55,4 ± 5,2 U/mL (*Curvularia brachyspora*) e 62,8 ± 4,8 U/mL (*Beauveria bassiana*). Estes novos fungos queratinolíticos não dermatófitos têm potencial de utilização em processos biotecnológicos envolvendo hidrólise de queratina.

Sabino et al. (2008) testaram sessenta diferentes espécies de fungos, isolados de amostras clínicas, para a perfuração do cabelo em testes *in vitro*, observando a erosão superficial, onde os fungos destroem gradualmente os cabelos de fora (da cutícula) para dentro (da medula). Neste tipo de erosão, dois tipos diferentes de erosão superficial podem ocorrer: a erosão superficial uniforme e erosão superficial localizada. Na penetração radial, espécies de fungos produzem hifas especializadas que penetram em ângulos retos na superfície do cabelo. Estas hifas atravessam todos os componentes de cabelo, da cutícula a medula. O tipo mais especializado de produção de hifas é o órgão de perfuração. De acordo com as observações feitas, o índice de intensidade da atividade queratinolítica (IKA) foi calculado para todos os espécimes. Com base neste índice IKA que determinou que 35% dos fungos estudados mostram uma forte atividade queratinofílica (Incluindo os fungos ambientais *Chrysosporium keratinophilum*, *Scedosporium apiospermum, Scytalidium dimidiatum, Scopulariopsis brevicaulis*), 40%

apresentaram uma média atividade queratinofílica (incluindo os fungos ambientais *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium chlamydosporum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium strictum*), 20% apresentaram após semanas atividade queratinofílica e os restantes 5% não apresentam qualquer atividade queratinofílica. Observou-se uma elevada proporção de espécies que tinham média ou forte atividade queratinofílica. Os autores observaram que todos os fungos queratinofílicos têm capacidade de invadir o cabelo *in vitro*, apesar das diferenças em como elas conseguem, e também observaram as diferentes estruturas desenvolvidas pelos fungos não dermatófitos a fim de metabolizar a queratina. Os autores concluíram que alguns fungos do ambiente possuem atividade queratinofílica surpreendentemente elevada.

Sales et al. (2008) estudaram a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM1546, tendo-se como substrato penas de frango, por meio de planejamento fatorial completo 2^3. Todos os parâmetros estudados (agitação, concentração do substrato e tempo de cultivo) e as interações de segunda ordem foram estatisticamente significativos. O máximo de atividade queratinolitica (48,9 U/mL) foi obtida com 120 rpm, 0,5% (p/v) de penas de frango e sete dias de cultivo. Desta forma, *Aspergillus carbonarius* URM1546 mostrou-se eficiente na utilização de penas de frango como substrato para produção de queratinase.

Gioppo et al. (2009) estudaram *Myrothecium verrucaria* um fungo filamentoso não dermatófito capaz de crescer e produzir queratinase em meio cultura submersa (93,0 ± 19 U / ml) e o em estado sólido (98,8 ± 7,9 U / ml), utilizando pó de penas de aves de capoeira (PFP) como único substrato. Os autores verificaram como diferentes fontes de nitrogênio e carbono podem influenciar a produção de queratinase pelo fungo. A adição de carboidratos, como glicose e sacarose, provocou apenas uma leve melhora na produção de queratinase, mas a adição de amido causou uma melhoria significante (135,0 ± 25 U / ml). Os mais altos níveis de atividade de queratinase, no entanto, foi obtido pela suplementação das culturas com níveis PFP e com bagaço de mandioca, 168,0 ± 28 U / ml e 189,0 ± 26 U / ml em culturas submersas e em estado semi-sólido, respectivamente. Ao contrário, a suplementação do meio PFP com fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico, como caseína, proteína de soja, gelatina, nitrato de amônio e alanina, diminuiu a produção de queratinase em ambos os tipos de culturas (cerca de 20 U / ml), mostrando que a produção de queratinase por *M. verrucaria* é reprimida pelas fontes de nitrogênio. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a associação dos dois resíduos PFP mais bagaço de mandioca pode ser uma excelente opção como um

meio de cultura barato para a produção de queratinase em culturas no estado submerso e semi-sólido.

Elíades et al. (2010) estudaram 69 cepas fúngicas isoladas de calcários-alcalino, solos neutro e sódico-alcalino bem como os materiais vegetais associados, para determinar a sua capacidade de crescer em pH alcalino. Um total de 32 fungos foram selecionados por sua capacidade de produzir queratinase alcalina em culturas submersas suplementado com farelo de soja (FS), triptona e pêlo de vaca (PV), sob condições de fermentação em estado sólido. Embora várias cepas fúngicas produzam atividade queratinolítica em ambos os FS e PV, eles diferiram nos níveis detectados. *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Metarrhizium anisopliae*, *Neurospora tetrasperma* e *Westerdikella dispersa* foram os melhores produtores, com níveis superiores a 1.2 U/mL. Diferentes espécies de fungos foram relatadas pela primeira vez quanto a sua capacidade de produzir atividade queratinolítica em pH alcalino. Com isto, os autores concluíram que os fungos isolados da Reserva "Parque Costero Del Sur" (Buenos Aires, Argentina), possuem capacidade de produzir atividade queratinolítica a pH 9.0. Neste sentido, esses isolados cerscidos em meios ricos em substratos protéicos, como farinha de soja e pêlo de vaca, diferiram em seus níveis de produção da enzima bem como a sua contribuição para a perda de massa da farinha de soja.

Saber et al. (2010) estudaram a capacidade de 82 fungos biodegradarem residuos queratinosos, destes 27 isolados apresentaram atividade queratinolítica. Os que apresentaram as melhores atividades foram as culturas de *Alternaria tenuissima* K2 e *Aspergillus nidulans* K7 com 53,4 com 6 dias de incubação e 55,8 U/ml com 5 dias de incubação, respectivamente, usando pó de penas de aves como única fonte de carbono e nitrogênio. Usando fontes de carbono e nitrogênio adicionais não foi observado uma maior produção de queratinase, exceto quando se usou amido e maltose. pH 7,5, 35 °C e 7,5% de inoculo foram as melhores condições de produção e solubilização das penas encontradas para ambos os fungos. Entre os diferentes resíduos de queratina penas de frango, pato e ganso foram os resíduos de queratina mais degradados por *Alternaria tenuissima* K2 e *Aspergillus nidulans* K7.

Liang et al. (2011) investigaram o efeito da composições de meio e condições de cultura sobre a produção de queratinase pelo fungo termifílico *Myceliophthora thermophila* (Apinis) Oorschot GZUIFR-H49-1. Entre as composições de meio testadas, o solúvel amido (AS), uréia, tiossulfato de sódio e $CaCl_2$ foram as mais eficientes fontes de carbono, nitrogenio, enxofre e íon mineral, respectivamente. A uréia e o valor de pH

foram os fatores significativos (P <0,05) para a produção queratinase nas condições experimentais usando planejamneto fatorial Plackett-Burman. As condições de produção de queratinase foram otimizadas pelo design Box-Behnken. Ocorreu um aumento da atividade da queratinase de 6,4 vezes (5100 U/1) do valor inicial (800 U/1). Este estudo indicou que o projeto de otimização provou ser uma ferrramenta útil e poderosa para o desenvolvimento de composições de meios e condições de cultura ótimos para a produção da queratinase. *Myceliophthora thermophila* GZUIFR-H49-1 é um fungo promissor para a produção queratinase e para aplicações biotecnológicas.

Singh (2011) avaliou a produção de queratinase por duas cepas de *Microsporum gypseum*. Os dois isolados do solo secretram proteases no meio de glicose-gelatina. A atividade enzimática atingiu o pico no 15 dia a 28 °C. Asparagina reprimiu o rendimento da protease e açúcares causaram repressão na formação da protease. Além disso as atividades de ambos os isolados foram significativamente afetados pelo período de incubação da cultura e fontes de carbono utilizadas. Ambas as cepas cresceram na isca de pele e causaram grande dimunuição da quantidade de substrato. A produção da queratinase, bem como perda de massa foi melhor na ausência de glicose do que nos frascos contendo o açúcar.

2.6. Purificação das queratinases

As queratinases purificadas até hoje são principalmente proteína serina alcalina com alto nível de atividade em substratos de proteínas insolúveis. Os estudos de caracterização e purificação das queratinases têm caminhado na direção do entendimento dos mecanismos de degradação da queratina, identificação molecular dos genes envolvidos e otimização da produção e uso dessas enzimas (Bernal et al., 2006). Na tabela 6 são mostrados os principais métodos de purificação e características bioquímicas observadas após a purificação da queartinase produzida por diferentes fungos.

Tabela 6 Métodos de purificação, características bioquímicas e substratos degradados pela queratinase purificada por diferentes fungos.

Fungos	**Métodos de purificação**	**Substratos**	**Características bioquímicas**	**Referências**
Cândida albicans	Ultrafiltração Cromatografia	Albumina, caseína, colágeno, hemoglobina, queratina	41,500 Da; pI 4,5.	Ray e Payne 1990
Aspergillus fumigatus	Coluna CM Sephadex Gel de eletrofoese	--------	40 kDa; pI 5,5.	Monod et al. 1993
Doratomyces microsporus	Cromatografia SDS-PAGE	--------	33 kDa; pI 9,0.	Gradisar et al. 2000
Microsporum canis	Cromatografia Diálise SDS-PAGE	Queratina azure; vermelho congo elastina; azocoll	43,5 kDa; pI 7,7.	Brouta et al. 2001
Aspergillus fumigatus	Cromatografia SDS-PAGE	--------	31 KDa.	Noronha et al. 2002
Aspergillus oryzae	Precipitação Cromatogtrafia SDS-PAGE	Albumina, caseína, penas de frango, colágeno, penas de pato e lã de ovelha	60 KDa.	Farag e Hassan 2004
Scopulariopsis brevicaulis	Precipitação Cromatografia SDS-PAGE Filtração em Gel	--------	39 e 36 KDa	Anbu et al. 2005
Trichophyton vanbreuseghemii	Precipitação Cromatografia SDS-PAGE	Queratina azure; substratos sintéticos	37 kDa.	Moallaei et al. 2006
Trichoderma atroviride	Precipitação Cromatografia SDS-PAGE	Penas; caseína; gelatina; SAB; substratos sintéticos	21 kDa, pI 6,8.	Cao et al. 2008

Cont.

Fungos	**Métodos de purificação**	**Substratos**	**Características bioquímicas**	**Referências**
Myrothecium verrucaria	Cromatografia	Penas de aves	22±1,5 kDa	Moreira-Gasparin et al. 2009
Bacillus sp	SDFA (PEG, Fosfato de potássio e NaCl)	--------	5% de PEG 1.500, 23% de fosfato de potássio e 4% de NaCl. RQ 114% e FP 3,2	Sala et al. 2011
Scopulariopsis brevicaulis	Cromatografia SDS-PAGE	Penas de galinha, unhas humanas, cabelo humano	28,5 KDa	Sharaf e Khalil 2011

Ray e Payne (1990) compararam a produção e purificaram a proteinase ácida de espécies de *Candida* e após um estudo anterior de patogenicidade cutânea avaliaram a produção de proteinase ácida em meio suplementado com albumina, restrito de nitrogênio. A proteinase ácida de *C. albicans* foi comparada em meios suplementados com albumina, caseína, colágeno, hemoglobina ou queratina e em meio TC 199. *C. albicans*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*, que são patógenos cutâneos em infecções mucosas, produzem 3.3 a 4.7 vezes mais proteinase ácida que as não patogênicas *C. parapsiliosis* e *C. guilliermondii*. *C. krusei*, espécie não poatógena, produz uma quantidade insignificante de enzima. A produção da proteinase ácida por *C. albicans* foi similar nos meios suplementados com proteínas, e apenas uma única proteinase ácida foi recuperada em cada um dos meios. A rápida purificação dos sobrenadantes das culturas foi obtida por uma fina cavidade e ultrafiltração células misturadas seguido por Gel-Affi azul e cormatografia de coluna Sephacryl. A alta produção, pureza e atividade específica de proteinase ácida foram obtidos dos sobrenadantes dos meios suplementados com queratina, com produção de 2.86 mg de proteinase ácida purificada de 7 litros de cultura. A enzima foi caracterizada com 41,500 Da de glicoproteína, ponto isoelétrico de 4.5, pH de 2.5 para 5.5 e vários substratos específicos, incluindo para queratina, colágeno desnaturado, hemoglobina, caseína e albumina. Com isso os autores concluíram que a produção dessas proteases por *Candida* spp é um potencial fator de virulência que pode facilitar a colonização e invasão da pele por *Candida*. A produção dessas proteases em meios suplementados com queratina foi superior que os outros

meios que foram testados e produziram suficiente e adequada enzima para uso em testes imunológicos de antígenos e anticorpos de proteases ácidas.

Rojanavanichi et al. (1990) purificaram e caracterizaram uma protease extracelular de um estirpe de crescimento rápido *Hendersonula toruloidea* quando foi cultivado em meio líquido contendo albumina de soro bovino como única fonte de nitrogênio. A purificação homogênea da proteinase foi realizada por carboximetilcelulose, CM Sephadex G-50 e cromatografias de coluna Sephacryl S-200. A enzima purificada foi uma serina proteinase chymotrypsinlike, como indicado pela forte inibição da atividade por fluorofosfatado diisopropilo, Fenilmetilsulfonil flúor, L-1-cetona tosylamido phenylethylchloromethyl-2, e quimostatina e a boa cinética constante de um substrato sintético, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA. A enzima apresentou um ponto isoelétrico de 8,4 e massa molecular de 34.000. Constituintes da pele, como estrato córneo e unha, mas não cabelo, eram facilmente digeridos pela presente enzima. Assim, esta proteinase extracelular pode desempenhar um papel na invasão da pele grossamente queratinizada e unhas por este organismo.

Monod et al. (1993) purificaram e caracterizaram a metaloprotease de *Aspergillus fumigatus* cultivado na presença de colágeno como única fonte de carbono e nitrogênio. A enzima presente na cultura sobrenadante teve um fator de purificação de 50 vezes em coluna CM-Sephadex e depois em gel de eletrofoese. A massa molecular foi determinada para 40 kDa em SDS-PAGE e o ponto isoelétrico foi determinado a pH 5.5. Amostras de pacientes que sofrem de aspergiloma reagiram com a metaloprotease em análises Western blotting (imunoblotting), sugerindo que esta metaloprotease promove uma reposta antigênica nesses pacientes.

Mignon et al. (1998) isolaram e purificaram a queratinase do dermatófito *Microsporum canis* de gatos infectados, especialmente os infectados assintomáticos, que são os principais responsáveis pela doença zoonótica. A importante variabilidade dos sinais clínicos em gatos é pouco conhecida. Recentemente, uma protease subtilase queratinolítica de 31,5 kDa foi encontrada como sendo um fator de virulência. Os autores tiveram por objetivo investigar a possível relação entre o quadro clínico dermatofítico de gatos e a produção da queratinase. Sete cepas de *M. canis* isoladas de gatos clinicamente afetados, infectados assintomáticos ou mecânico transportadores foram testados in vitro para a produção da enzima. A detecção imuno-histoquímica da enzima também foi avaliada em biópsias de pele de 4 sintomáticos e 7 gatos infectados assintomáticos. Todas as amostras produzidam “in vitro” uma protease subtilase

queratinolítica de 31,5 kDa. Com os resultados os autores concluíram que a produção da queratinase não é um fator diretamente responsável pelo quadro clínico observado em gatos infectados com *M. canis*.

Gradisar et al. (2000) estudaram a produção de uma queratinase extracelular por *Doratomyces microsporus* em cultivo líquido submerso aeróbico em um meio contendo uma proteína para induzir a síntese da enzima. A queratinase foi purificada por homogeneização usando cromatografia de interação hidrofóbica mostrada por cromatografia em gel. A massa molecular foi estimada para 33 KDa (por análise em SDS-Page) ou 30 KDa (por cromatografia em gel), sugerindo uma estrutura monomérica. O ponto isoelétrico da enzima foi determinado como sendo mais ou menos 9. A hidrólise de alguns substratos sintéticos, específicos para proteínas conhecidas, sugeriu que a queratinase de *D. microsporus* é próxima a proteinase K.

Muhsin e Aubaid (2000) purificaram parcialmente e caracterizaram a queratinase extracelular de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* isolados de pacientes com tinea cruris. A queratinase foi purificada com filtração em gel Sephadix G-100, algumas características bioquímicas da enzima purificada foram examinadas. A massa molecular estimada foi 38000 Da em SDS-PAGE, o pH ótimo foi 5.5 e a temperatura ótima para alta atividade da queratinase foi 50 ºC. A purificação e caracterização da queratinase de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* mostrou que esta enzima pertence ao grupo das serinas.

Brouta et al. (2001) estudaram a protease queratinolítica secretada por um isolado clínico de felino o *Microsorum canis* cultivado em caldo contendo queratina do felino como única fonte de nitrogênio. Esta enzima foi purificada do filtrado de cultura por cromatografia de afinidade em bacitrcin-agarose e por cromatografia hidrofóbica em actyl-agarose. A enzima teve uma massa molecular de 43.5 kDa e ponto isoelétrico de 7.7 e exibindo atividade significativa contra queratina azure, vermelho congo elastina e colágeno desnaturado tipo I (azocoll). A primeira sequência de aminoácidos 13 N-terminal foram 61% homólogos com os da metaloprotease extracelular de *Aspergillus fumigatus* e com a neutra protease I de *A. oryzae*, confirmando que essa queratinase de 43.5 kDa é uma metaloprotease. Esta metaloprotease queratinolítica pode estar relacionada ao fator virulência envolvendo mecanismos patofisiológicos de dermatofitoses de *M. canis*.

Noronha et al. (2002) estudaram a produção de queratinase por *Aspergillus fumigatus,* após 24-72 h de crescimento a 42 ºC. A queratinase foi purificada por um

processo de cromatografia e sua massa molecular de 31 kDa foi determinada por SDS-PAGE. Posteriormente o DNAc da queratinase foi expresso em células de *Pichia pastoris* e os clones recombinantes mostraram ser produtores substanciais de atividades caseinolítica, azo-queratinolítica e queratinolítica. Análises em SDS-PAGE e Western-blotting usando leucócitos contra a queratinase de *A. fumigatus* mostraram a presença de uma proteína na cultura sobrenadante das células recombinantes de *P. pastoris*. Essa proteína teve a massa molecular correspondente a queratinase de *A. fumigatus*. O perfil de produção da enzima mostrou que as células recombinantes de *P. pastoris* aumentaram a quantidade de atividade proteolítica e azo-queratinolítica em um período de crescimento de 72 h. A determinação do peso seco indicou que 10% do pó de queratina foi hidrolisado após 24 h de incubação com 510 U (atividade caseinolítica) da queratinase recombinante. Com esses resultados os autores concluíram que *A. fumigatus* pode ser eficiente para converter queratina de penas de frango em produtos alternativos rico em proteínas para ração animal. Entretanto, por este fungo ser um patógeno oportunista de homens, aves e outros animais, as células recombinantes de *P. pastoris* podem ser uma alternativa para construção de biossistemas para a conversão da queratina de penas de frango.

Farag e Hassan (2004) purificaram, caracterizaram e imobilizaram a queratinase da cultura de degradação de pena de *Aspergillus oryzae*. A precipitação fracional da enzima com etanol, acetona e sulfato de amônia produziu 21 frações. A fração obtida a 75-85% em sulfato de amônia mostrou alta atividade e um fator de purificaçao de aproximadamente 3.3 vezes. Essa fração foi posteriormente purificada por filtração em gel Sephadex G-7 seguido por cromatografia iônica em DEAE-Sephadex A-50 e produziu uma atividade maior de proteína com pico mostrando 11.38 vezes de purificação. SDS-PAGE indicou que após a purificação, a queratinase é uma enzima monomérica com uma massa molecular de 60 kDa. A enzima purificada foi capaz de hidrolisar diferentes substratos mostrando uma alta atividade proteolítica em soro albumina bovina e caseína seguida por queratina, penas de frango, colágeno, penas de pato e lã de ovelha. A enzima purificada foi imobilizada em vários transportadores. A imobilização em esferas de vidro mostrou alta atividade. Os autores concluíram que esta enzima pode ser usada para processos industriais por mostrar uma atividade significativa contra muitos materiais queratinosos. A purificação e caracterização da enzima fornecem uma base para desenvolver futuras produções em larga escala e possíveis usos da preparação enzimática.

Anbu et al. (2005) estudaram a queratinase extracelular produzida por *Scopulariopsis brevicaulis* isolada do solo de fazendas de aves domésticas de Nammakkal, Índia. A queratinase extracelular deste fungo foi purificada por precipitação em sulfato de amônia e processos envolvendo técnicas cromatográficas de DEAE- Celulose e Sephadex G-100. A enzima purificada mostrou ser uma proteína monomérica com massa molecular de 39 e 36 KDa por SDS-Page e filtração em gel, respectivamente. A atividade da queratinase purificada em relação ao pH, temperatura e concentração de sais foi otimizado pelo "design" experimental Box- Behnken. As condições ótimas calculadas foram previstas para conferir 100% de rendimento para a atividade da queratinase com 5 mM $CaCl_2$, pH 8,0 e temperatura de 40 °C. A queratinase purificada foi examinada como um potencial para a degradação da pele.

Moallaei et al. (2006) purificaram parcialmente e caracterizaram a proteinase extracelular do dermatófito geofílico *Trichophyton vanbreuseghemii*. O fungo isolado do solo do Iran foi cultivado em meio líquido modificado de Czapek-Dox, contendo 0,1% de peptona bacteriológica e 1% de glicose como fonte nitrogênio e carbono, respectivamente. A purificação parcial foi realizada por precipitação em $(NH_4)_2SO_4$, seguido por cromatografia de troca iônica. Análises da enzima em SDS-PAGE reveleram uma única cadeia polipeptídica com uma massa molecular de 37 kDa. A enzima parcialmente purificada apresentou atividade queratinolítica evidenciada no teste de queratina azure. A propriedade queratinolítica do *T. vanbreuseghemii* sugeriu que este fungo pode ser uma alternativa para a reciclagem de resíduos de queratina industriais.

Li et al. (2007) caracterizaram e expressaram o sfp2, um gene que codifica uma protease serina queratinolítca de *Streptomyces fradiae* var. k11. O recombinante sfp2 foi expresso na levedura *Pichia pastoris* com um rendimento final de 78 mg/L após 25 h da indução. A enzima recombinante foi purificada por precipitação utilizando sulfato de amônio e cromatografia em gel de filtração à homogeneidade eletroforética, que foi apropriadamente glicosilada e tinha uma massa molecular de 26,0 kDa.

Anbu et al. (2008) estudaram um fungo queratinofílico nativo de penas degradantes, *Trichophyton* sp. HA-2, isolado de pena do solo na Índia e caracterizado quanto a produção de queratinase extracelular em meio de ágar-queratina (penas de frango como substrato), adicionado de sais minerais. A maior produção de queratinase foi observada em pH 8,0 e uma temperatura de 35 ºC por um período de 5 semanas. A secreção queratinolítica foi reforçada quando as culturas foram suplementadas com uma

fonte de carbono e fonte de queratina (penas de galinha). Esta queratinase foi purificada por DEAE-celulose e cromatografia em coluna Sephadex G-100. O peso molecular da queratinase foi 34 kDa por SDS-PAGE.

Cao et al. (2008) estudaram fungos não patogênico degradores de penas isolados por um novo método baseado na simulação de um processo de decomposição no ambiente e caracterizaram a querainase produzida. O isolado F6 com atividade queratinolítica alta foi identificado como *Trichoderma atroviride* com base em características morfológicas e análise da seqüência ITS1-5.8S-ITS2. O componente dominante da queratinase purificada teve uma massa molecular de 21 kDa. A queratinase purificada pertencia a serina protease. Seu ponto isoelétrico, peso molecular, pH ótimo, temperatura ótima, e especificidade de substrato são diferentes das outras proteases de serina de espécies de *Trichoderma*. Os resultados sugerem que a queratinase purificada é predominantemente proteínas extracelulares quando a estirpe F6 foi cultivada em substrato queratinoso. A protease, em combinação com outros componentes, é eficaz na degradação de penas. A estirpe F6 é mais adequada para a degradação de penas que sua queratinase purificada. O fungo não patogênico *T. atroviride* F6 com alta atividade na degradação de penas mostrou ser potencial em processos biotecnológicos para conversão das penas em farinha de pena economicamente útil.

Lopes et al. (2008) purificaram a queratinase de *Coccidioides immitis* um causador de uma micose sistêmica que ataca humanos e uma grande variedade de animais. Neste estudo, eles mostraram que o *C. immitis* na forma micelial é capaz de liberar enzimas proteolíticas extracelulares. A queratinase deste fungo foi concentrada poe dialise utilizando PEG 4000 overnight a 4 °C e sua massa molecular foi determinada usando o SDS-PAGE. Em condiçoes química de crescimento definidas, o micélio secretou sete diferentes polipeptídeos variando de 15 a 65 kDa e uma peptidase extracelular de 25 kDa. Esta serina peptidase extracelular foi capaz de degradar a queratina, além de clivar diferentes substratos de proteína, incluindo gelatina, caseína, hemoglobina e albumina.

Moreira-Gasparin et al. (2009) purificaram uma protease alcalina do fungo filamentos *Myrothecium verrucaria*. A enzima foi purificada por cromatografia. A recuperação foi alta, 62%, com uma atividade específica de 12,851.8 U/mg. A enzima é uma proteína monomérica com uma pequena massa molecular de 22±1,5 kDa. A

enzima apresentou uma eficiência de 80,3% na degradação da farinha de penas de aves, liberando aminoácidos ácidos e peptídeos solúveis.

Lin et al. (2009) purificaram a queratinase recombinante (rK) de *Pseudomonas aeruginosa* expressa em *Pichia pastoris*. A queratinase recombinante (rK) teve um rendimento final de 580 mg/L (1,03 kU/mL) após 72 h de incubação. A rK foi purificada por cromatografia de afinidade de níquel e sua massa molecular foi de 33 kDa. Aos autores concluiram que a rK poderiam hidrolisar uma variedade de substratos e clivar aminoácidos aromáticos hidrofóbicos na posição P1.

El-Gendy (2010) selecionou o fungo endofítico queratinolítico *Penicillium* spp. Morsy1 isolado do coral marinho *Dendronephthya hemprichii*, como a cepa queratinolítica hiperativa em fermentação sólida com substrato de diferentes agriculturas e resíduos de aves de capoeira. A otimização do processo de extração, parâmetros físico-químicos que afetam a produção de queratinase por fermentação em estado sólido, e parâmetros da queratinase purificada foram estudados. A máxima atividade de queratinase (1600 U/g, substrato seco inicial) foi obtida a partir de farelo fermentado com 0,1% de Tween 80. A produção foi otimizada nas seguintes condições palha de arroz como fonte de carbono, pH do meio 6, crescimento a temperatura de 26 ° C, umidade inicial de 80% (v/p), inóculo de 10^5 esporos/mL e uma granulometria média do substrato de 0,6 mm (3.560 U/g, substrato seco inicial após 5 dias de fermentação). Dois tipos de queratinase (Ahm1 e Ahm2) foram purificadas a partir da cultura sobrenadante através da precipitação em sulfato de amônio, DEAE-Sepharose e cromatografia por filtração. O peso molecular das enzimas foram 19 kDa (Ahm1) e 40 kDa (Ahm2). Estes resultados sugerem que resíduos de serina e cisteína não estão envolvidos nos mecanismos catalíticos, e elas são metaloproteases.

Sala et al. (2011) avaliaram o efeito da concentração de polietileno glicol (PEG) 1.500, fosfato de potássio pH 7,0 e cloreto de sódio (NaCl) na extração e purificação de queratinase de *Bacillus* sp. P45 utilizando SAB através de um planejamento fatorial experimental 2^3. A purificação da enzima foi mais promissora quando concentrações de 5% de PEG 1.500, 23% de fosfato de potássio e 4% de NaCl foram utilizadas, atingindo recuperação queratinolítica de 114% e fator de purificação de 3,2. Além disso, a adição de 4% (m/m) de NaCl no SAB provocou um incremento no fator de purificação de 67%, enquanto que a recuperação queratinolítica aumentou em 61%.

Sharaf e Khalil (2011) purificaram a queratinase de *Scopulariopsis brevicaulis* por cromatografia e a eletroforese em gel (SDS-PAGE) foi utilizada para avaliar a

pureza e peso molecular da enzima purificada. A enzima foi homogênea, apresentando uma única banda de proteína, e tinha um peso molecular de 28,5 kDa. O perfil de aminoácidos da queratinase purificada revelou que era composta por 14 aminoácidos diferentes com elevada proporção de ácido glutâmico (20,86%), alanina (14,52%), glicina (14,21%), leucina (8,59%) e serina (7,81%). A enzima continha quantidades moderadas de valina (6,01%), treonina (5,58%) e alanina fenil (5,22%). A enzima purificada de *S. brevicaulis* exerceu uma potente atividade queeratinolítica e foi capaz de hidrolisar diferentes materiais queratinosos com maior atividade em penas de galinha seguido por unhas humanas e cabelo humano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras de fungos

Para verificação da viabilidade, autenticação taxonômica e caracterização quanto à capacidade queratinolítica serão utilizadas 50 amostras de fungos isoladas do solo estocadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2. Reativação das culturas

Os isolados serão repicados em Caldo Glicosado (Lacaz et al., 2002) e mantidos por sete dias a temperatura ambiente (28 ºC ± 2 ºC). Após crescimento, serão transferidos para os meios específicos contidos em tubos de ensaio, onde as culturas permanecerão em temperatura ambiente.

3.3. Autenticação taxonômica

Para autenticação taxonômica das espécies serão observadas as características macroscópicas das colônias (coloração, consistência e diâmetro) e microscópicas (estruturas somáticas, esporos e esporóforos) de acordo com a literatura especializada (Raper e Fenell, 1977; Carmichael et al., 1980; Pitt, 1991; Domsch et al., 1993; Klich, 2002), dentre outros. Os fungos foram observados e fotografados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste usando um modelo Zeiss DMS 940 microscópio eletrônico de varredura (MEV).

3.4. Cultivo submerso

Penas de galinhas serão utilizadas como fonte de queratina. A queratina, considerada pó de queratina, será solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e precipitada com acetona. (Wawrzkiewicz et al., 1991; Friedrich et al., 1999). O meio de cultivo será preparado de acordo com Anbu et al., 2007 com algumas modificações: pó de queratina (15 g l^{-1}), K_2HPO_4 (1,5 g l^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,05 g l^{-1}), $CaCl_2$ (0,025 g l^{-1}), $FeSO_4.7H_2O$ (0,015 g l^{-1}) e $ZnSO_4.7H_2O$ (0,005 g l^{-1}); pH 7.5. Frações de 50 mL da solução de sais minerais serão colocadas em frascos Elenmeyers de 250 mL. A

queratina em pó será pesada e adicionada separadamente em cada frasco para evitar distribuição inadequada. Os frascos serão autoclavados por 15 min a 120ºC a 1 atm. O inoculo será preparado através da suspensão de esporos em 10 mL de solução salina com Tween 80 e 1 ml desta suspensão, contento 10^6-10^7 esporos mL^{-1}, será inoculado a cada frasco. Os frascos serão agitados a 120 rpm a 30ºC por 10 dias.

3.5. Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica

Para a avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica, foram preparadas suspensões em 9 ml de Tween 1% (v/v) contendo $2x10^6$ esporos/ml . Desta suspensão, foram distribuídos 1,0 ml sobre fragmentos de crina, pena, unha e cabelo humano contidos em placas de Petri, previamente autoclavadas a 120ºC, por 20 minutos, as placas foram mantidas a temperatura ambiente (T.A. 28±2ºC) e o crescimento dos fungos acompanhado diariamente por até 40 dias (Cai et al., 2008).

3.6. Potencial queratinolítico

O efeito de diferentes substratos na produção de queratinase foi avaliado durante crescimento dos fungos nos seguintes meios: I- meio de pena de frango; II- meio de crina; III- meio de unha; IV- meio de cabelo humano; V- meio de leite desnatado e VI- meio de peptona. O meio de cultivo foi preparado de acordo com Corrêa et al., 2010 com algumas modificações: substrato de queratina (1 g), $CaCl_2$ (0,001 g), $NaNO_3$ (0,1 g), em 50 ml de Tampão fosfato pH 7,8. Frações de 50 mL da solução de sais minerais foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Estes foram autoclavados por 20 min a 120ºC a 1 atm. O inóculo foi preparado através da suspensão de esporos em 10 mL de solução salina com Tween 80 e 1 ml desta suspensão, contento 10^6 esporos mL^{-1}, foi inoculado a cada frasco. Os frascos foram agitados a 120 rpm a 30ºC por 10 dias.

3.7. Efeito de diferentes parâmetros na produção da queratinase

O isolado que apresentou maior atividade foi selecionado. Os efeitos de pH inicial (5.7~9.0 com aumentos de 0,4 ou 0,5 unidades); concentração de nitrato de sódio (0,1g; 0,150; 1,2 e 0,3 g), concentração de $CaCl_2$ (0,001; 0,00125; 0,002; 0,00225 e 0,003 g), substrato (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g), temperatura (25~45 ºC com aumentos de

5 ºC), concentração do inóculo (2%~10% da densidade de células 10^7 UFC/ml) e agitação (120; 160; 200; 220 e 250 rpm) foram avaliados para a produção de queratinases em cultivo líquido submerso, para todos foi utilizado como substrato a pena de frango. No meio de fermentação, com exceção da variável estudada, todos os outros componentes do meio foram padronizados nas seguintes concentrações e pH: 0,5 g de substrato; 0,1 g de nitrato de sódio; 10^6 esporos/mL de inóculo e 0,001 g de cloreto de cálcio em Tampão fosfato 0,2 M pH 7,8 a 30 °C e 120 rpm por 10 dias (Cai et al., 2008).

3.8. Produção de queratinase

3.8.1. Design estatístico experimental

Para o processo de escolha das melhores condições de produção de queratinase foram estudados parâmetros como: temperatura, pH, agitação e concentração do substrato utilizando um planejamento fatorial completo (2^4) (Tabela 1) com 5, 7, 9 e 10 dias de produção (Anbu et al., 2005; 2007). Foram realizados 16 ensaios para o estudo da produção de queratinase e 4 pontos centrais, os quais possibilitaram a análise do erro experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistica* 8 (Statsoft inc, 2008).

Tabela 7 Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de queratinase com 5, 7, 9 e 10 dias de produção.

	Níveis		
Fatores	**Inferior (-1)**	**Central (0)**	**Superior (+1)**
Temperatura (°C)	28	32	36
Agitação (RPM)	120	160	200
Penas de frango (g)	1,5	2,0	2,5
pH	7,0	7,5	8,0

3.8.2. Design Box, Hunter & Hunter

Neste estudo, o Box, Hunter & Hunter delineamento experimental foi usado para investigar o significado de variáveis para produção da queratinase. Para obter um valor de erro experimental, quatro repetições do ponto central foi realizada. O software

StatSoft (StatSoft STATISTICA 8) foi usado para gerar o Box, Hunter & Hunter delineamento experimental e analise dos dados.

3.9. Métodos analíticos

3. 9.1. Determinação da biomassa e do pH

O meio de fermentação será filtrado em papel de filtro (Whatman Nº 1). A massa micelial será lavada com água destilada esterilizada e seca a 105ºC "over night" até peso constante. O pH do filtrado será determinado.

3. 9.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade queratinolítica será determinada de acordo com Anbu et al., 2007 em que a queratina em pó (20 mg) será adicionada a 3,8 mL de 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,8) e incubada com 0,2 mL do filtrado de cultura, por 2 horas a 37 ºC. Após a incubação as amostras serão refrigeradas a 4 ºC por 10 min, e em seguida centrifugadas a 4 ºC por 10 min a 10.000 g. A absorção do fluído sobrenadante a 280 nm será determinada espectrofotometricamente em comparação com o branco, que será preparado com queratina em pó e tampão. O aumento de 0,100 em absorbância indicará uma unidade de atividade enzimática (1 KU = 0,100 absorbância).

3. 9.3. Dosagem do conteúdo de proteínas

A quantidade de proteína solúvel será determinada de acordo com Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

Todas as análises serão realizadas em duplicata.

3.10. Caracterização do extrato bruto

3.10.1. Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para estudar o pH ótimo para a atividade da queratinase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 4,0-11,0 usando os seguintes tampões (100 mM): acetato (pH 4,0-6,0), fosfato (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-9,0) e carbonato (pH 9,0-11,0) e penas de frango como substrato. Para determinar a estabilidade do pH, o extrato enzimático

bruto foi pré-incubado nos tampões a diferentes valores de pH (4,0-11,0) a 37 ° C por 2 h. Atividade residual foi então analisada. A temperatura ótima para atividade da enzima também foi estudada. O extrato bruto enzimático foi testado em diferentes temperaturas entre 25 °C e 80 °C. A termoestabilidade da queratinase foi avaliada pela incubação da enzima em diferentes temperaturas (entre 25 e 80 °C) por 2 horas, após a análise enzimática foi realizada. Atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Corrêa et al. 2010).

3.10.2. Efeito dos inibidores de protease e íons metais

Surfactantes (SDS, Triton X-100, e DMSO), isopropanol (nas concentrações finais de 0,5% e 1%), EDTA, ácido iodo acético, PMSF a concentrações finais de 1mM e 0,1M e 1 mM Pepstatina A, e alguns íons metais (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) a concentrações finais de 1 mM e 5 mM, foram adicionados ao extrato bruto enzimático e pré-incubadas por 30 min a 37 ºC, antes de analisar a atividade queratinolítica. A atividade da enzima sem esses reagentes serviu como controle, e foi considerado como 100% de atividade (Corrêa et al. 2010).

3.11. Purificação da enzima

3.11.1. Estudos de partição da queratinase em sistema bifásico aquoso PEG/Citrato

Os parâmetros de extração estudados foram: massa molar e concentração do PEG e concentração do citrato de sódio na extração da queratinase do meio de fermentação. Para a extração da enzima, os sistemas foram preparados com PEG de diferentes massas molares (400, 3350 e 8000 g/mol) e sal citrato de sódio segundo Oliveira et al. (2001) e Sarubbo (2000).

3.11.2. Planejamento fatorial para otimização da extração da queratinase

Para análise estatística dos resultados foram utilizadas três variáveis respostas: coeficiente de partição, aumento de pureza e rendimento. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as respostas. Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 8.0.

Tabela 8 Níveis dos fatores utilizados na extração da queratinase por SDFA (PEG/Citrato).

Fatores	**Níveis**		
	Superior (+1)	**Central (0)**	**Inferior (-1)**
Massa molar do PEG (g/mol)	8000	3350	400
Concentração do PEG % (p/p)	24	22	20
Concentração de citrato % (p/p)	20	17,5	15

3.11.3. Fator de purificação, recuperação queratinolítica e coeficiente de partição

O aumento de pureza (AP) é a razão da atividade específica na fase considerada (*Aef*) pela atividade específica do extrato bruto (*Aeeb*) e foi calculado conforme a Equação 1.

$$AP = \frac{Aef}{Aeeb} \qquad (1)$$

O percentual de recuperação queratinolítica (RQ) foi determinado conforme a Equação 2.

$$RQ(\%) = \frac{A_f V_f}{A_{eb} V_{eb}} 100 \qquad (2)$$

onde *Af* é a atividade de queratinase na fase considerada (U/ml), *Aeb* é a atividade enzimática no extrato bruto (U/ml), *Vf* é o volume da fase considerada (ml) e *Veb* é o volume inicial de extrato adicionado (ml).

O coeficiente de partição (*K*) do sistema foi determinada pela Equação 3.

$$K = \frac{A_{ft}}{A_{ff}} \qquad (3)$$

onde *Aft* e *Aff* é a atividade da fase de topo e fase de fundo após o processo de purificação, respectivamente.

4. Caracterização e produção de queratinases por fungos isolados do solo preservados em óleo mineral na Micoteca URM[1]

RESUMO

Materiais queratinoso são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas comuns, por isso é importante estudar os produtores de enzimas de microorganismos para uso na indústria de biotecnologia. O objetivo deste estudo foi caracterizar fungos isolados do solo e armazenados na Micoteca URM para que pudessem ser empregadas na produção de queratinases extracelular. Cinqüenta linhagens fúngicas foram verificados para determinar se eles tinham a capacidade de usar a queratina como substrato. Elas foram cultivadas em cultura submersa em um meio contendo penas de aves e sais. Os fungos foram cultivados por 10 dias a 30 °C num agitador orbital (120 rpm). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados como preparações enzimáticas para a dosagem de atividade queratinolítica. Aspergillus sulphureus URM5029, Trichoderma aureoviride URM5574, Aspergillus avenaceus URM5051 e Aspergillus sclerotiorum URM5586 apresentaram os melhores resultados com 7,35 U/ml, 7,2 U/ml, 6,7 U/ml e 6,05 U/ml, respectivamente, de atividade queratinolítica. O queratinase de A. sulphureus URM5029 apresentou melhor atividade em pH 10,0 e 35 °C. Foi um pouco inibida na presença de íons de metal (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} e Ca^{2+}) e PMSF, enquanto foi fortemente inibida por EDTA, sugerindo ser uma enzima do tipo metaloprotease. A estabilidade da queratinase de Aspergillus sulphureus URM5029 em faixas amplas de pH (6,5-9,0) e temperatura (25-60 ° C) sugere a viabilidade da utilização desta estirpe em processos biotecnológicos comerciais.

Palavras-chave: Penas; Fungos filamnetosos; enzima; *Aspergillus sulphureus*; queratina.

INTRODUÇÃO

Degradação de material queratinoso tem sido principalmente associada com a atividade de fungos dermatófitos, leveduras e bactérias. Muita informação está disponível sobre a capacidade destes organismos para produzir queratinases e sobre as propriedades catalíticas destas enzimas (Friedrich et al. 1999;. Mangiaterra et al. 2000; Elíades et al. 2010). No entanto, existem relativamente poucos relatórios sobre a produção e caracterização da queratinases produzidos por fungos não-dermatófitos

[1] Trabalho submetido para publicação como Sousa-Lucena, MA ; Souza. OC; Pessoa-Jr. A; Porto, ALF e Souza-Motta, CM. 2011. Characterisation and production of keratinase by fungi isolated from soil preserved in mineral oil at the Mycoteca URM. World Journal of Microbiology & Biotechnology.

(Gradisar et al. 2005; Elíades et al. 2010). Alguns fungos não-dermatófitos já foram descritos (Gioppo et al. 2009; Elíades 2010) para fins biotecnológicos, principalmente para a gestão de resíduos queratinosos (Onifade et al 1998;. Gupta e Ramnani 2006; Pillai e Archana 2008). No entanto, queratinases bacterianas, particularmente aquelas produzidas por *Bacillus*, têm recebido mais atenção (Pillai e Archana 2008).

O principal componente das penas de aves é a queratina, uma proteína insolúvel com estrutura rica em β-hélice ligadas através de pontes de cistina. A rigidez estrutural desta proteína é responsável pela acumulação de penas em grandes quantidades como resíduos do processamento de aves comerciais. Por conter uma grande número de proteínas e aminoácidos, penas de aves são potencialmente úteis para a alimentação animal barata, assim muitos esforços tem ocorrido no sentido de reutilizar os biomateriais queratinosos (Odetallah et al. 2003; Gioppo et al. 2009). Convencionalmente, os resíduos de penas são usados de forma limitada como um suplemento de proteína na dieta alimentra dos animais após o processamento hidrotérmico. No entanto, o tratamento hidrotérmico tem limitações devido à sua capacidade digestiva baixa, a perda nutricional de aminoácidos essenciais (metionina, lisina e triptofano) e a formação de aminoacidos não-nutritivos tais como lisinoalanina e lantionina (Gioppo et al. 2009). Degradação enzimática da queratina pode ser uma forma de obter aminoácidos e peptídeos a partir de penas de aves, mas a estrutura da queratina torna a sua hidrólise por proteases comuns, tais como pepsina e papaína difícil. No entanto, há um grupo de enzimas proteolíticas que são capazes de hidrolisar a queratina insolúvei mais eficientemente do que outras proteases (Gioppo et al. 2009).

Queratinases também são importantes nas operações de pré-curtimento da indústria de couro, eles reduzem o uso de sulfeto de sódio no processo de depilação para o processamento de couro eco-amigável (Thanikavelan et al. 2004; Macedo et al. 2005; Pillai e Archana 2008).

A preservação de cepas fúngicas, como material tipo, como estoques de referência para fins de diagnóstico ou de ensino, e como amostras em coleções de culturas nacionais, é um aspecto importante da micologia. Idealmente, estirpes armazenadas devem permanecer viáveis por longos períodos, mas estar dormente para evitar o acúmulo de mutações, resultando em alterações morfológicas e bioquímicas. Vários métodos para o armazenamento de culturas de fungos foram avaliados e muitos foram encontrados para ser adequado para o armazenamento de alta qualidade, pelo menos, certas cepas fúngicas (Borman et al. 2006).

O objetivo do presente estudo foi verificar a viabilidade de fungos isolados de solo armazenadas na Coleção de Cultura da URM Mycoteca (50 cepas) e para a tela-los para a atividade keratinolytic quando cultivadas na presença de penas de aves como a única fonte de carbono e nitrogênio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fungos

Para verificação da viabilidade, autenticação taxonômica e caracterização quanto à capacidade queratinolítica serão utilizadas 50 amostras de fungos isoladas do solo estocadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca-URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

Reativação das culturas

Os isolados serão repicados em Caldo Glicosado (Lacaz et al., 2002) e mantidos por sete dias a temperatura ambiente (28 ºC ± 2 ºC). Após crescimento, serão transferidos para os meios específicos contidos em tubos de ensaio, onde as culturas permanecerão em temperatura ambiente.

Para autenticação taxonômica das espécies serão observadas as características macroscópicas das colônias (coloração, consistência e diâmetro) e microscópicas (estruturas somáticas, esporos e esporóforos) de acordo com a literatura especializada (Raper e Fenell, 1977; Carmichael et al., 1980; Pitt, 1991; Domsch et al., 1993; Klich, 2002), dentre outros. Os fungos foram observados e fotografados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste usando um modelo Zeiss DMS 940 microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Cultivo submerso

Penas de galinhas serão utilizadas como fonte de queratina. A queratina, considerada pó de queratina, será solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) e precipitada com acetona. (Wawrzkiewicz et al., 1991; Friedrich et al., 1999). O meio de cultivo será preparado de acordo com Anbu et al., 2007 com algumas modificações: pó de queratina (15 g l^{-1}), K_2HPO_4 (1,5 g l^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,05 g l^{-1}), $CaCl_2$ (0,025 g l^{-1}), $FeSO_4.7H_2O$ (0,015 g l^{-1}) e $ZnSO_4.7H_2O$ (0,005 g l^{-1}); pH 7.5. Frações de 50 mL da solução de sais minerais serão colocadas em frascos Elenmeyers de 250 mL. A queratina em pó será pesada e adicionada separadamente em cada frasco para evitar distribuição inadequada. Os

frascos serão autoclavados por 15 min a 120ºC a 1 atm. O inoculo será preparado através da suspensão de esporos em 10 mL de solução salina com Tween 80 e 1 ml desta suspensão, contento 10^6-10^7 esporos mL^{-1}, será inoculado a cada frasco. Os frascos serão agitados a 120 rpm a 30ºC por 10 dias.

Dosagem da atividade queratinolítica

A atividade queratinolítica foi determinada pelo método utilizado por Anbu et al. (2007). Queratina em pó (20 mg) foi incubada por 1 hora a 37 °C com tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,8; 3,8 ml) e extrato enzimático bruto (0,2 ml). As amostras foram colocadas em uma geladeira 4 °C por 10 min e então centrifugada por 10 min a 10.000 g a 4 °C. A absorbância do sobrenadante a 280 nm foi medida por espectrofotometria contra um em branco. Um aumento de 0,100 na absorbância foi tomada para indicar uma unidade de atividade enzimática

Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para estudar o pH ótimo para a atividade da queratinase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 4,0-11,0 usando os seguintes tampões (100 mM): acetato (pH 4,0-6,0), fosfato (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-9,0) e carbonato (pH 9,0-11,0) e penas de frango como substrato. Para determinar a estabilidade do pH, o extrato enzimático bruto foi pré-incubado nos tampões a diferentes valores de pH (4,0-11,0) a 37 ° C por 2 h. Atividade residual foi então analisada. A temperatura ótima para atividade da enzima também foi estudada. O extrato bruto enzimático foi testado em diferentes temperaturas entre 25 °C e 80 °C. A termoestabilidade da queratinase foi avaliada pela incubação da enzima em diferentes temperaturas (entre 25 e 80 °C) por 2 horas, após a análise enzimática foi realizada. Atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Corrêa et al. 2010).

Efeito de inibidores na atividade queratinolítica

Surfactantes (SDS, Triton X-100, e DMSO), isopropanol (nas concentrações finais de 0,5% e 1%), EDTA, ácido iodo acético, PMSF a concentrações finais de 1mM e 0,1M e 1 mM Pepstatina A, foram adicionados ao extrato bruto enzimático e pré-incubadas por 30 min a 37 ºC, antes de analisar a atividade queratinolítica. A atividade da enzima sem esses reagentes serviu como controle, e foi considerado como 100% de atividade (Corrêa et al. 2010).

Efeitos de ínos metais na atividade queratinolítica

Íons metais (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) a concentrações finais de 1 mM e 5 mM, foram adicionados ao extrato bruto enzimático e pré-incubadas por 30 min a 37 ºC, antes de analisar a atividade queratinolítica. A atividade da enzima sem esses reagentes serviu como controle, e foi considerado como 100% de atividade (Corrêa et al. 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade das culturas de fungos

As 50 culturas neste estudo pertencem os seguintes gêneros: *Myrothecium* (um), *Neosartorya* (um), *Scolecobasidium* (um), *Acremonium* (dois), *Cladosporium* (dois), *Humicola* (dois), *Scopulariopsis* (dois), *Fusarium* (quatro), *Paecilomyces* (quatro), *Curvularia* (cinco), *Trichoderma* (cinco) e *Aspergillus* (22). Todas as culturas eram viáveis depois de ser armazenados sob óleo mineral na Coleção de Cultura Micoteca URM por um período de 1-13 anos (Tabela 1).

O método de preservação sob óleo mineral mostrou-se adequada para a manutenção de culturas, porque permaneceram viáveis com a estabilidade das características morfológicas e fisiológicas após o armazenamento por até 13 anos. Esses resultados concordam com os de Braz et al. (2009), que avaliaram a viabilidade de 31 isolados de *Acremonium*, descobrindo que 26 permaneceram viáveis quando preservados sob óleo mineral na Micoteca URM e 24 foram autenticados taxonomicamente após 31 anos de preservação. Uma grande variedade de fungos sobrevivem sob este método, mantendo a viabilidade ao longo de 6, 7 e até 20 anos (Figueiredo, 2001). Espécies de *Cladosporium* e *Trichosporon*, preservado por este método e mantidos na Micoteca URM, permaneceram viáveis por até 40 anos (Silva 2009). De acordo com Figueiredo (2001) e Nakasone et al. (2004), as culturas de fungos podem ser preservados sob óleo mineral por 20 a 32 anos. Estes estudos destacam as vantagens deste método na manutenção da viabilidade de algumas espécies durante um período prolongado de preservação, bem como na redução de contaminação por ácaros e um processo simples, econômico que não requer equipamento caro e pode ser usado para coleções grandes e pequenas.

Deshmukh (2003) obtiveram 239 queratinofílicos fungos preservados em frigorífico durante 12 anos (repicadas uma vez a cada 4 meses), em água estéril por 7 e 10 anos, sob óleo mineral por 7 e 10 anos, em gel de sílica por 7 e 10 anos, em solo de

jardim por 7 e 10 anos e uma amostra liofilizada por 12 anos. Todos eram viáveis, mostrando que esses métodos de preservação foram adequados para estes fungos. No entanto, Bezerra et al. (2006) obteve 20 culturas de *Coccidioides immitis* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Cultura do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e apenas cinco eram viáveis, mostrando que este método de preservação não foi adequada para estas espécies.

Foi observado que as espécies de fungos que produzem queratinase também mostram boa capacidade de esporulação e permanecem estáveis após preservação sob óleo mineral; esta observação foi feita durante a análise por microscopia eletrônica das espécies *Aspergillus sulphureus* URM5029 (Fig 1a), *Trichoderma aureoviride* URM5574 (Fig 1b), *Aspergillus avenaceus* URM5051 (Fig 1c) e *Aspergillus sclerotiorum* URM5586 (Fig. 1d).

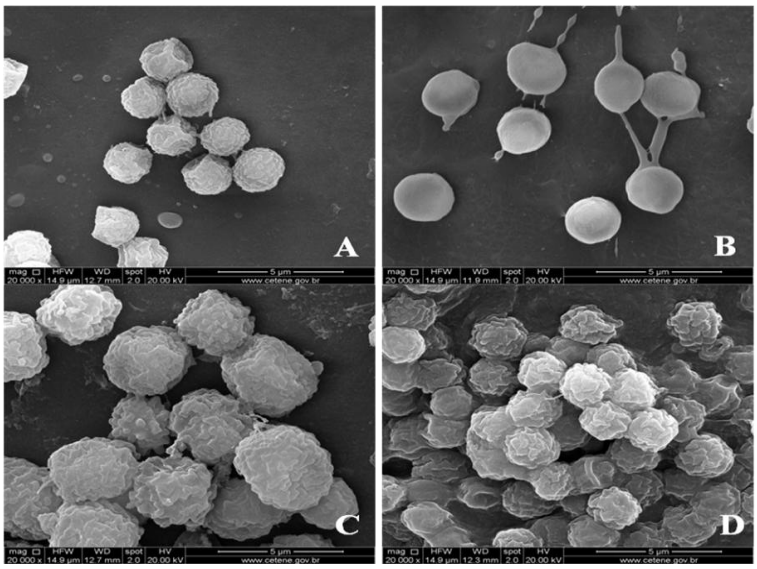

Fig. 1 Micrografia eletrônica do conídio de *Aspergillus sulphureus* URM5029 (**a**), *Trichoderma aureoviride* URM5574 (**b**), *Aspergillus avenaceus* URM5586 (**c**) and *A. scleroiorum* URM5586 (**d**).

Produção de queratinases

Das espécies estudadas, todas mostraram capacidade queratinolítica. As cepas de *Aspergillus sulphureus* URM5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586 apresentaram os melhores resultados

com 7,35 U/ml, 7,20 U/ml, 6,70 U/ml e 6,05 U/ml, respectivamente, de atividade da enzima após 10 dias de fermentação a 120 rpm e 30 ° C (Tabela 1).

Devido a alta atividade queeratinolítica dos extratos de enzimas, o pH aumentou (8,0-10,0) durante o cultivo e alkalinisou o meio. Esta alcalinização é um resultado de reações peptídeo desaminação e produção de amônia (Riffel et al. 2003). No trabalho de Riffel et al., um aumento no pH (7,8-8,5) durante o cultivo e alcalinização do meio foram observados.

Usando penas de aves como substrato, Friedrich et al. (1999) selecionaram fungos para a síntese de enzimas queratinolíticas e obteve como melhor produtor *Aspergillus flavus*, que produziu 0,781 U/ml de atividade da enzima após sete dias de cultivo submerso. O meio de cultura continha numa solução de sais minerais solúveis e tinha penas de aves como a única fonte de carbono e nitrogênio. Anbu et al. (2007) procuraram melhorar a produção de queratinase por uma estirpe de *Scopulariopsis brevicaulis* e obteve o seu mais alto nível de atividade da enzima, 6,2 U/ml, com 35 dias de cultivo. Estes valores são inferiores aos obtidos no presente estudo para a atividade queratinolítica geral. No entanto, outros autores obtiveram valores mais elevados de produção. Sales et al. (2008) estudaram a produção queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM1546. Eles usaram penas de aves como substrato e obteve uma atividade queratinolítica máxima de 48,9 U/ml, com sete dias de cultivo em 120 rpm e com 0,5% (p/v) de penas de aves. Gioppo et al. (2009) estudaram o fungo filamentoso *Myrothecium verrucaria*, um não-dermatófito para crescer e produzir queratinase enquanto em meio líquido submerso (93,0 ± 19 U/ml) ou em meio semi-sólido (98,8 ± 7,9 U/ml); nestas culturas, penas de aves foram o único substrato.

Usando outros substratos, Apprich et al. (2006) estudaram as propriedades queratinolítica de dois dermatófitos (*Microsporum gypseum*, T*richophyton mentagrophytes*) e três não-dermatófitos (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*) usando cascos de eqüinos e pele como a única fonte de carbono e nitrogênio. *M. gypseum* foi a espécie mais queratinolítica, seguida por *T. mentagrophytes* e *S.brevicaulis*. *A. alternata* e *G. candidum* mostraram um mínimo de atividade queratinolítica. Elíades et al. (2010) estudaram 69 cepas de fungos por sua capacidade de produzir atividade queratinolítica alcalinas em culturas submersas suplementada com farelo de soja e triptona (FS), ou suplementada com couro (PV), sob condições de fermentação em estado sólido. Entre essas cepas, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Metarhizium anisopliae*, *Neurospora tetrasperma* e

Westerdikella dispersed foram os melhores produtores, com níveis de atividade enzimática acima de 1,2 U/ml. Comparando a produção de queratinase nestes estudos utilizando outras fontes de queratina com os resultados obtidos para a atividade queratinolítica neste estudo, notamos que há uma melhor produção da enzima usando penas de aves, rico em queratina, como a única fonte de carbono e nitrogênio.

Tabela 1 Viabilidade, autenticação taxonômica e atividade queratinolítica de cultura de fungos preservadas em óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM.

Espécies	Registro * URM	Tempo de reservação (anos)	Viabilidade	Autenticação taxonômica	Atividade queratinolítica U/ml
Acremonium curvullum	4695	8	+	Confirmado	2.05
Acremonium strictum	5031	5	+	Confirmado	3.7
Aspergillus acuelatus	4953	6	+	Confirmado	1.5
Aspergillus acuelatus	5240	5	+	Confirmado	1.55
Aspergillus avenaceus	5051	6	+	Confirmado	6.7
Aspergillus carbonarius	5012	6	+	Confirmado	1.4
Aspergillus carneus	5262	5	+	Confirmado	5.6
Aspergillus carneus	5577	4	+	Confirmado	4.55
Aspergillus clavatus	5841	3	+	Confirmado	5.2
Aspergillus clavatus	5076	6	+	Confirmado	2.2
Aspergillus granulosus	4641	8	+	Confirmado	5.45
Aspergillus janus	4456	9	+	Confirmado	1.15
Aspergillus japonicus	3840	14	+	Confirmado	3.45
Aspergillus japonicus	4599	8	+	Confirmado	2.7
Aspergillus japonicus	5242	5	+	Confirmado	2.6
Aspergillus japonicus	4533	9	+	Confirmado	2.25
Aspergillus japonicus	5751	3	+	Confirmado	2.65
Aspergillus nutans	4309	10	+	Confirmado	1.25
Aspergillus ochraceus	5836	3	+	Confirmado	1.65
Aspergillus phoenicis	4924	6	+	Confirmado	2.05
Aspergillus sclerotiorum	5586	4	+	Confirmado	6.05
Aspergillus stromatoides	4637	8	+	Confirmado	2.15
Aspergillus sulphureus	5029	6	+	Confirmado	7.35
Aspergillus sulphureus	4315	10	+	Confirmado	2.3
Cladosporium sphaerospermum	5067	6	+	Confirmado	1.4
Cladosporium oxysporum	5234	5	+	Confirmado	1.75
Curvularia eragrostidis	4696	8	+	Confirmado	2.5
Curvularia pallescens	5833	3	+	Confirmado	2.3
Curvularia pallescens	5720	3	+	Confirmado	1.3
Curvularia verruculosa	4653	8	+	Confirmado	2.55
Fusarium equiseti	4479	9	+	Confirmado	5.25
Fusarium lateritium	4703	8	+	Confirmado	3.65
Fusarium lateritium	5844	3	+	Confirmado	3.8
Fusarium stilboides	5302	5	+	Confirmado	5.4

Cont.

Espécies	Registro * URM	Tempo de reservação (anos)	Viabilidade	Autenticação taxonômica	Atividade queratinolítica U/ml
Humicola fuscoatra	5797	3	+	Confirmado	2.45
Humicola grisea	4753	8	+	Confirmado	1.9
Myrothecium brachysporum	3936	14	+	Confirmado	1.15
Neosartorya fischeri	5755	3	+	Confirmado	1.3
Paecilomyces farinosus	3896	14	+	Confirmado	1.95
Paecilomyces variable	3835	14	+	Confirmado	1.85
Paecilomyces variotii	5385	4	+	Confirmado	2.15
Paecilomyces variotii	4657	8	+	Confirmado	2.0
Scolecobasidium humicola	4335	10	+	Confirmado	2.45
Scopulariopsis brevicaulis	5795	3	+	Confirmado	1.45
Scopulariopsis sphaerospermum	4603	8	+	Confirmado	3.05
Trichoderma aureoviride	5574	4	+	Confirmado	7.2
Trichoderma harzianum	4950	6	+	Confirmado	2.45
Trichoderma koningii	4649	8	+	Confirmado	1.95
Trichoderma virens	5007	6	+	Confirmado	2.2
Trichoderma viride	4996	6	+	Confirmado	5.1

* Número de acesslo da Micoteca URM (Recife, Pernambuco, Brasil); + (viável); - (inviável)

Efeito do pH e temperatura na atividade da queratinase e estabilidade

Para a caracterização enzimática da queratinase foi usado extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus sulphureus* URM5029 que mostrou a maior atividade queratinolítica.

A maior atividade queratinolítica foi obtida em pH 10,0 (10,95 U/ml) e pH 10,7 (10,55 U/ml). Estabilidade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 foi observada na faixa de pH 6,5-9,0 com valores de atividade acima de 50%, a estabilidade máxima foi encontada em pH 8,0 com 94% de atividade residual. Estes resultados mostram que a queratinase é estável em uma ampla faixa de pH (Fig 2).

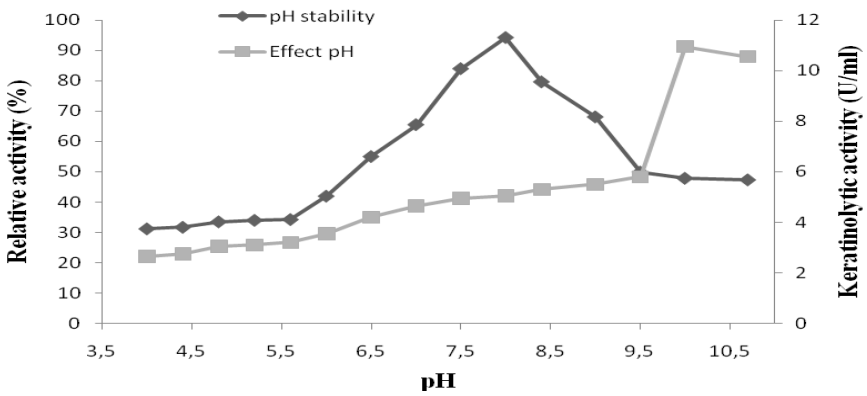

Fig. 2 Efeito e estabilidade ao pH (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029.

O efeito da temperatura sobre a atividade da queratinase demostrou que a atividade máxima foi obtida a 35 °C (12,3 U / ml). A enzima mostrou-se estável em temperaturas de 25 °C a 60 °C, com valores de atividade acima de 50%, a enzima foi mais estável a 35 ºC com 68% de atividade residual. Estes resultados mostram que a queratinase é estável em uma ampla faixa de temperatura (Fig 3).

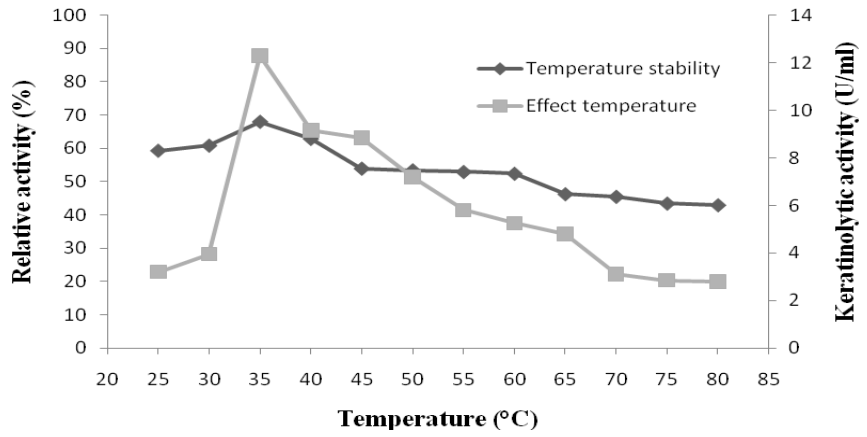

Fig. 3 Efeito e estabilidade a temperatura (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029.

Queratinases de muitas bactérias, actinomicetos e fungos tem pH ótimo de neutro a alcalino (pH 7,5-11,0) (Riffel et al., 2003; Farag e Hanssan, 2004; Thys et al., 2004; Anbu et al., 2005). Outras enzimas queratinolíticas também demonstraram serem ativas em pH alcalino, como as secretadas por *Streptomyces* sp. (Lentourne et al., 1982) e *Strepmomyces albidoflavus* (Bressolier et al., 1999). Entretanto, novas queratinases

possuem alcanofilia extrema com ótimo de pH>12 (Gupta e Rammani, 2006). No entanto, a temperatura ótima da queratinase é entre 30 °C e 80 °C (Gupta e Rammani, 2006), mas, a enzima de *Chrysosporium keratinophilum* (Dozie et al., 1994) e *Fervidobacterium islandicum* (Nam et al., 2002) mostraram excepcional temperatura ótima a 90 °C e 100 °C, respectivamente.

Cao et al. (2008) estudaram a queratinase produzida por *Trichoderma atroviride* que mostrou pH ótimo de 8,0-9,0 e temperatura de 50 °C. Anbu et al. (2008) caracterizaram a queratinase produzida por *Trichopyton* sp. HA-2 isolado de penas soltas sobre o solo. O pH ótimo e temperatura para a atividade da queratinase foi de 7,8 e 40 °C, respectivamente. A enzima mostrou um aumento gradual na atividade com um aumento de pH até o ótimo, seguido por uma queda gradual na atividade, com a temperatura acima de 55 °C a atividade da enzima foi praticamente inativada. Anbu et al. (2008) também observaram que a atividade da queratinase ficou estável na faixa de pH 7-10 por 1 hora a 37 °C, e em temperaturas 20-45 °C. Saber et al. (2010) caracterizou a atividade queratinolítica de culturas de *Alternaria tenuissima* K2 e *Aspergillus nidulans* K7. A atividade da queratinase foi ótima em condições alcalinas entre pH 8,0 e 9,0 para *A. tenuissima* K2 e entre pH 7,5 e 9,0 para *A. nidulans* K7, com ótimo em pH 8,5 para ambas as enzimas. Em uma ampla faixa de temperatura (de 25 °C a 65 °C), a queratinase de *A. nidulans* K7 mostrou um máximo de atividade a 40 °C e atividades queratinolíticas maiores a temperaturas mais altas foi encontrada para queratinase de *A. tenuissima* K2.

Os resultados citados são semelhantes às do presente trabalho onde o pH e temperatura ótima para a atividade queratinolítica foram de 8,0 e 35 °C, respectivamente, bem como a estabilidade da queratinase, que obteve uma ampla faixa de pH (6,5 a 9,0) e temperatura (25 °C a 60 °C) em que a enzima foi estável mantendo mais de 50% da sua atividade queratinolítica inicial.

Efeitos de químicos e ions metais na atividade queratinolítica

Os efeitos de químicos e íons metálicos em diferentes concentrações na atividade da queratinase são apresentados nas Tabelas 2 e 3. A atividade queratinolítica foi pouco inibida por PMSF e a enzima foi fortemente inibida por EDTA (Tabela 2), indicando que pode ser uma queratinase pertencente ao grupo das metaloproteases. Cu^{2+}

(5mM), Mg^{2+} (1mM) e Zn^{2+} (5mm) foram os íons metais que mais inibiram a atividade queratinolítica (Tabela 3).

Tabela 2 Efeito de inibidores na atividade da queratinase secretada por *Aspergillus sulphureus*.

Inhibidores	Atividade relativa %
SDS 1%	33.33
SDS 0.5%	47.27
Triton X-100 1%	38.18
Triton X-100 0.5%	37.27
Isopropanol 1%	60.00
Isopropanol 0.5%	59.39
DMSO 1%	37.57
DMSO 0.5%	42.12
Pepstatin A 1mM	51.81
Ac. iodoacetic 0.1M	52.42
Ac. iodoacetic 1mM	51.51
PMSF 0.1M	70.69
PMSF 1mM	82.42
EDTA 0.1M	26.36
EDTA 1mM	25.75

Tabela 3 Efeito de íons metal na atividade da queratinase secretada por *Aspergillus sulphureus*.

Íons metal	Atividade relativa %
Ca^{2+} 1mM	76.96
Ca^{2+} 5mM	73.03
Co^{2+} 1mM	73.93
Co^{2+} 5mM	79.39
Cu^{2+} 1mM	82.42
Cu^{2+} 5mM	63.63
Mn^{2+} 1mM	70.90
Mn^{2+} 5mM	81.51
Mg^{2+} 1mM	60.90
Mg^{2+} 5mM	70.60
Zn^{2+} 1mM	73.33
Zn^{2+} 5mM	63.33

Mataloproteases queratinolíticas podem ser uma ótima promessa biotecnológica, podendo superar a proteólise limitada na superfície de partículas de queratina insolúveis por causa da interação enzima-substrato restrita, bem como a natureza metalo-enzima que apresenta um método potencial de imobilização de enzimas por causa de uma autólise reduzida (Allpress et al., 2002; El-Gendy, 2010). Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} podem estar associados com a estabilização da estrutura terciária, conformação de metaloproteases, e proteger estas enzimas contra desnaturação térmica e autoproteolises (Secades e Guijarro 2001; El-Gendy 2010).

Cao et al. (2008) estudaram a queratinase produzida por *Trichoderma atroviride*. O pH ótimo e temperatura foi de 8.0-9.0 e 50 °C, respectivamente. Entre os metais usados, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+} aumentaram a atividade queratinolítica; Mg^{2+} não teve efeito; Hg^{2+} e Cu^{2+} exerceram efeito inibitório significativo. Inibição da atividade queratinolítica por 49% e 43% foi observado após incubação com 1mM de PMSF e 0,01M de SDS, respectivamente. Anbu et al. (2008) caracterizaram a queratinase produzida por *Trichopyton* sp. HA-2 isolado de penas de frango soltas no solo. O pH ótimo e temperatura para atividade da queratinase foi de 7.8 e 40 °C, respectivamente. A enzima mostrou um aumento gradual de atividade com o aumento do pH ótimo, seguido por uma queda gradual da atividade; com a temperatura acima de 55 °C a atividade da enzima foi quase inativada. A atividade da queratinase foi estável na faixa de pH entre 7 e 10 por 1 hora a 37 °C, e a temperatura de 20 °C a 45 °C. O inibidor de serina protease, PMSF, inibiu completamente a atividade da queratinase enquanto por EDTA, seguido por p-CMB, inibiu parcialmente. Este resultado indicou que pode ser um tipo de serina protease.

Neste trabalho observamos que os íons metais utilizados e o PMSF influenciaram a atividade queratinolitica fracamente, e o EDTA inibiu 75% da atividade da queratinase, indicando que pode ser uma queratinase do grupo das metaloproteases. Esses resultados diferem dos encontrados nos trabalho citados, onde a atividade queratinolítica foi aumentada na presença da maioria dos íons metálicos utilizados pelos autores, o EDTA inibiu parcialmente a atividade da enzima, e o PMSF inibiu completamente a atividade da queratinase testada, mostrando ser uma serina protease.

CONCLUSÕES

O solo é rico em fungos queratinolíticos capazes de degradar resíduos de penas de aves, essa capacidade faz com que esses fungos sejam interessantes para uso na bioconverção dos resíduos em alimentos com alta quantidade de proteína para ração animal e também para a bioremediação de ambientes contaminados com resíduos de queratina. Preservação em óleo mineral é suficiente para manter as características de viabilidade e taxonômica de culturas por longos períodos de tempo, como mostrado em nosso estudo, além disso, características metabólicas desses fungos são mantidas,. *Aspergillus sulphureus* URM5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586 mostraram as maiores atividades queratinolíticas, indicando as suas aptidões para a produção queratinase. A queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 apresentou maior atividade em pH 10,0 e 35 ºC. Além disso, íons metálicos específicos exerceu um pequeno efeito inibitório, e os inibidores indicaram que a queratinase pode ser uma enzima do tipo metaloprotease. A capacidade de queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 ser estável ao longo do uma larga faixa de pH e de temperatura sugere a viabilidade do uso desta estirpe em processos biotecnológicos comerciais.

5. Caracterização e efeitos da composição do meio e das condições de cultivo na produção de queratinases por fungos em cultivo líquido submerso [2]

RESUMO

As queratinases têm especificidade por um grande grupo de substratos protéicos solúveis e insolúveis. Essas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparada com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases de outras proteases. Este trabalho teve por objetivo caracterizar cepas de fungos quanto a capacidade queratinolítica, efeito de diferentes substratos, da composição do meio e das condições de cultivo na produção de queratinase em cultivo submerso e caracterização da enzima. Para avaliar a capacidade queratinolítica e o efeito de diferentes substratos na produção da queratinase foram utilizadas as seguintes cepas: Aspergillus sulphureus URM 5029, A. avenaceus URM5051, A. sclerotiorum URM5586 e Trichoderma aureoviride URM5574. Com a linhagem que apresentou a melhor produção e o melhor substrato, foi realizado estudos do efeito da composição do meio, condições de cultivo na produção da queratinase e caracterização da enzima. As espécies testadas se destacaram na colonização dos diferentes substratos queratinosos e o melhor substrato para a produção de queratinase foi a pena de frango. A. sulphureus produziu queratinase nas seguintes condições ótimas de produção: 2 g/50 mL de pena de frango, 0,1 g/50 mL de $NaNo_3$, 0,001 g/50 mL de $CaCl_2$, pH 7,8, 35ºC, 160 rpm e 10^6 esporos/mL em cultivo líquido submerso em 10 dias de incubação. A queratinase de A. sulphureus apresentou melhor atividade em pH 10,0 e 35 ºC e é pouco inibida na presença de íons metais (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) e PMSF e fortemente inibida por EDTA, sugerindo ser uma metaloprotease. A capacidade da queratinase de A. sulphureus ser estável em uma ampla faixa de pH (6,5–9,0) e temperatura (25–60 °C) sugere o uso desta cepa em processos biotecnológicos industriais.

INTRODUÇÃO

As queratinases têm especificidade por um grande grupo 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, extrato córneo e azoqueratina (BRESSOLLIER et al., 1999; FRIEDRICH; KERN, 2003). Essas enzimas têm maior capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparada com outras enzimas proteolíticas, isso distingue as queratinases de outras proteases (ONIFADE et al., 1998).

[2] Trabalho a ser submetido para publicação como Sousa-Lucena, MA; Souza. OC; Mergulhão, V; Pessoa-Jr. A; Porto, ALF e Souza-Motta, CM. Caracterização e efeitos da composição do meio e das condições de cultivo na produção de queratinases em cultivo líquido submerso. Mycophatologia.

As queratinases pertencem ao grupo das enzimas proteolíticas capazes de degradar a queratina com grande eficiência (ONIFADE et al., 1998).

As atividades para enzimas queratinolíticas 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 produzida por *Chrysosporium keratinophilum* que hidrolisava somente queratina, e não mostrava nenhuma atividade para a caseína e soroalbumina bovina. Isto indica que a enzima isolada era especifica somente para substratos com queratina (ONIFADE et al., 1998).

Este trabalho teve por objetivo caracterizar quanto a capacidade queratinofílica e queratinolítica, avaliar o efeito de diferentes substratos para produção de queratinases por *Aspergillus sulphureus* URM 5029, *A. avenaceus* URM5051, *A. sclerotiorum* URM5586 e *Trichoderma aureoviride* URM5574, e com a linhagem mais promissora avaliar os efeitos da composição do meio e das condições de cultivo na produção de queratinase em cultivo submerso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de fungos

As amostras de fungos utilizadas, *Aspergillus sulphureus* URM 5029, *A. avenaceus* URM5051, *A. sclerotiorum* URM5586 e *Trichoderma aureoviride* URM5574, foram procedentes da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica

Para a avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica das culturas de fungos, foram preparadas suspensões em 9 ml de Tween 1% (v/v) contendo $2x10^6$ esporos/ml. Desta suspensão, foi distribuído 1,0 ml sobre fragmentos de crina, pena, unha ou cabelo humano, previamente autoclavados a 120ºC por 20 minutos, contidos em placas de Petri. As placas foram mantidas a temperatura ambiente (T.A. 28±2ºC) e o crescimento dos fungos acompanhado diariamente por até 40 dias (Cai et al., 2008).

Potencial queratinolítico

O efeito de diferentes substratos na produção de queratinase foi avaliado durante crescimento dos fungos nos seguintes meios: I- meio de pena de frango; II- meio de crina; III- meio de unha; IV- meio de cabelo humano; V- meio de leite desnatado e VI- meio de peptona. O meio de cultivo foi preparado de acordo com Corrêa et al., 2010 com algumas modificações: substrato de queratina (1 g), $CaCl_2$ (0,001 g), $NaNO_3$ (0,1 g), em 50 ml de Tampão fosfato pH 7,8. Frações de 50 mL da solução de sais minerais foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 250 ml, os quais foram autoclavados por 20 min a 120ºC a 1 atm. O inóculo foi preparado através da suspensão de esporos em 10 mL de solução salina com Tween 80 e 1 ml desta suspensão, contento 10^6 esporos mL^{-1}, foi inoculado a cada frasco. Os frascos foram agitados a 120 rpm a 30ºC por 10 dias.

Determinação da atividade enzimática

A atividade queratinolítica foi determinada de acordo com Anbu et al., 2007 em que a pena (20 mg) foi adicionada a 3,8 mL de 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,8) e incubada com 0,2 mL do filtrado de cultura, por 2 horas a 37 ºC. Após a incubação as amostras foram refrigeradas a 4 ºC por 10 min, e em seguida centrifugadas a 4 ºC por 10 min a 10.000 g. A absorção do fluído sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 280 nm em comparação com o branco, que foi preparado com pena e tampão. O aumento de 0,100 em absorbância indicou uma unidade de atividade enzimática (1 KU = 0,100 absorbância).

Efeito de diferentes parâmetros na produção da queratinase

O isolado que apresentou maior atividade queratinásica foi selecionado. Os efeitos de pH inicial (5.7~9.0 com aumentos de 0,4 ou 0,5 unidades); concentração de nitrato de sódio (0,1 g; 0,150; 1,2 e 0,3 g), concentração de $CaCl_2$ (0,001; 0,00125; 0,002; 0,00225 e 0,003 g), pena de frango (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 g), temperatura (25~45 ºC, com aumentos de 5 ºC), concentração do inóculo (2%~10% da densidade de células 10^7 UFC/ml) e agitação (120; 160; 200; 220 e 250 rpm) foram avaliados para a produção de queratinases em cultivo líquido submerso. No meio de fermentação, com exceção da variável estudada, todos os outros componentes do meio foram padronizados nas seguintes condições: 0,5 g de pena de frango; 0,1 g de nitrato de sódio; concentração do inoculo de 10^6 esporos/mL e 0,001 g de cloreto de cálcio em Tampão fosfato 0,2 M pH 7,8 a 30 °C e 120 rpm por 10 dias (Cai et al., 2008).

Caracterização da queratinase

Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para estudar o pH ótimo para a atividade da queratinase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 4,0-11,0 usando os seguintes tampões (100 mM): acetato (pH 4,0-6,0), fosfato (pH 6,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,5-9,0) e carbonato (pH 9,0-11,0) e penas de frango como substrato. Para determinar a estabilidade do pH, o extrato enzimático bruto foi pré-incubado nos tampões a diferentes valores de pH (4,0-11,0) a 37 ° C por 2 h. Atividade residual foi então analisada. A temperatura ótima para atividade da enzima também foi estudada. O extrato bruto enzimático foi testado em diferentes temperaturas entre 25 °C e 80 °C. A termoestabilidade da queratinase foi avaliada pela incubação da enzima em diferentes temperaturas (entre 25 e 80 °C) por 2 horas, após a análise enzimática foi realizada. Atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Corrêa et al. 2010).

Efeito dos inibidores de protease e íons metais

EDTA, ácido iodo acético, PMSF a concentrações finais de 1mM e 0,1M e 1 mM Pepstatina A, e alguns íons metais (Co^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}) a concentrações finais de 1 mM e 5 mM, foram adicionados ao extrato bruto enzimático e pré-incubadas por 30 min a 37 ºC, antes de analisar a atividade queratinolítica. A atividade da enzima sem esses reagentes serviu como controle, e foi considerado como 100% de atividade (Corrêa et al. 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da capacidade queratinofílica e queratinolítica

Após 40 dias de incubação das espécies *Trichoderma aureoviride* URM5574 (Fig. 1A), *Aspergillus avenaceus* URM5051 (Fig. 1B), *A. sulphureus* URM5029 (Fig. 1C) e *A. sclerotiorum* URM5586 (Fig. 1D), foi observado que todas as espécies apresentaram crescimento na superfície dos substratos, não sendo observada a formação de orgãos de perfuração. Segundo Marchisio, 1986 e Ulfig et al., 1997 espécies de fungos queratinofílicos que crescem sobre os substratos queratinosos, possuem a capacidade de usar materiais naturalmente associados com a queratina, ou resultantes da sua degradação, diferente dos fungos queratinolíticos que são capazes de decompor a queratina presente no ambiente, através da formação de órgãos de perfuração.

Entretanto, Sabino et al., 2008 relatam que pode ocorrer a erosão superficial, onde os fungos destroem gradualmente os cabelos de fora (da cutícula) para dentro (da medula). Neste tipo de erosão, dois tipos diferentes de erosão superficial podem ocorrer: a erosão superficial uniforme e erosão superficial localizada, diferentes da penetração radial, nesta as espécies de fungos produzem hifas especializadas, os órgão de perfuração, que penetram em ângulos retos na superfície do cabelo. Estas hifas atravessam todos os componentes de cabelo, da cutícula a medula.

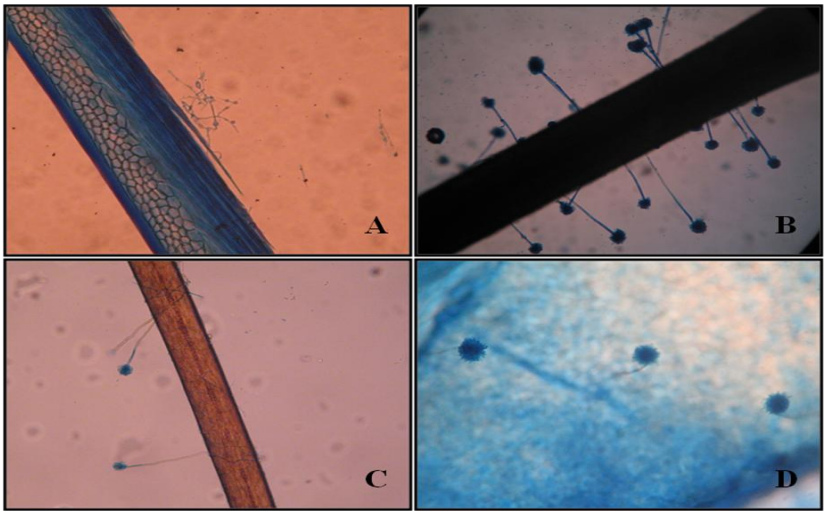

Figura 1: Colonização de diferentes substratos após 10 dias: **A-** Pena (*Trichoderma aureoviride* URM5574); **B-** Crina de cavalo (*Aspergillus avenaceus* URM5051); **C-** Cabelo humano (*A. sulphureus* URM5029) e **D-** Unha (*A. sclerotiorum* URM5586).

Potencial queratinolítico

Todas as espécies testadas produziram a queratinase quando incubadas em meio líquido com diferentes substratos de queratina como pena, crina de cavalo, unha, cabelo humano, leite e peptona. A pena foi o substrato ideal para a produção da queratinase, para as culturas de *Aspergillus sulphureus* URM 5029 (8,05 U/ml), *Trichoderma aureoviride* URM5574 (7,55 U/ml), *Aspergillus avenaceus* URM5051 (7,15 U/ml) e *A. sclerotiorum* URM5586 (6,60 U/ml) (Fig. 2). Esses resultados mostram que as queratinases dessas culturas de fungos são produzidas tanto na presença de substratos queratinosos insolúveis (pena, crina de cavalo, cabelo humano e unha) como solúveis (leite e peptona), destacando-se o uso das penas (compostas de 90% ou mais de β-queratina) como substrato indutor para a maior produção da queratinase.

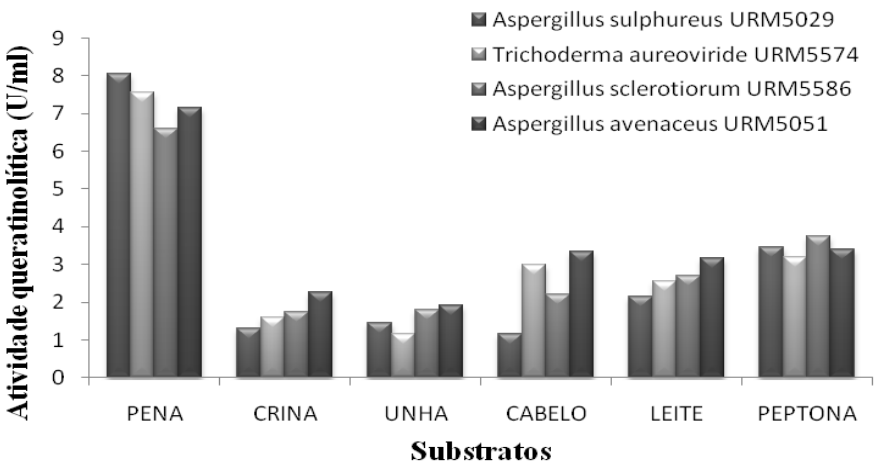

Figura 2: Efeitos de diferentes substratos na produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586.

Estrato córneo, α-queratinas epidérmicas, que possuem um baixo nível de pontes dissulfeto em comparação com o cabelo e α-queratinas de lã, são em geral, mais suscetíveis a hidrólise por queratinases (Brandelli e Riffel 2005; Xie et al. 2010). Outra tendência observada é a maior hidrólise de β-queratinas de penas quando comparado a α-queratinas do cabelo e lã (Brandelli e Riffel 2005; Pillai e Archana 2008; Cao et al 2009.; Moreira-Gasparin et al. 2009).

Neste contexto Brandelli e Riffel (2005), estudou uma queratinase de *Chryseobacterium* sp. kr6 para hidrolisar substratos queratinosos na seguinte ordem: estrato córneo da pele humana > pele suína > penas de galinha > unhas de galinha> lã ~ queratina do cabelo. Kojima et al. (2006) estudaram a queratinase de *B. pseudofirmus* FA30-01 para degradar pena, lã e pêlos, altas atividades foram encontradas com penas e pouca atividade para lã e pêlos, semelhante ao que foi observado para as queratinases de *B. subtilis* P13 (Pillai e Archana 2008) e *B. subtilis* RM-01 (Rai et al. 2009). Ao contrário, queratinases de *Doratomyces microsporus* e *Paecilomyces marquandii* hidrolisaram α-queratinas das unhas, pele e cabelo, mas não β- queratinas de penas de galinha (Friedrich; Kern, 2003; Gradisar et al, 2005).

Os resultados dos trabalhos citados corroboram com os obtidos neste trabalho, mostrando que a maioria das espécies estudadas produzem queratinases tanto na presença de substratos queratinosos, no entanto, destaca-se o uso das penas de frango como substrato indutor para a produção de queratinases.

Efeitos da concentração de substrato, $NaNO_3$ e $CaCl_2$ na produção de queratinases

Após a avaliação do potencial queratinolítico das culturas utilizando diferentes substratos em meio líquido, foi selecionada *Aspergillus sulphureus* URM5029 que apresentou maior atividade queratinolítica, , para o estudo de diferentes parâmetros para a produção de queratinase. Os efeitos da composição do meio (concentração de nitrato de sódio, cloreto de cálcio e do substrato), e os efeitos das condições de cultivo (inóculo fúngico, pH inicial, temperatura e agitação) foram analisados para a produção de queratinase em cultivo líquido submerso, para todos foi utilizado como substrato a pena de frango.

O aumento da concentração de pena de frango gerou um aumento da atividade queratinolítica obtendo atividade máxima com 2,0 g do substrato, apresentando 6,40 U/mL de atividade queratinolítica (Tabela 1). Com o aumento desta concentração para 2,5 g de pena de frango ocorreu um leve decréscimo da atividade para 6,00 U/mL de atividade, o que indica que a partir deste ponto o aumento da concentração de substrato no meio de fermentação aumenta o nível de saturação e assim diminui a produção da queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029.

Tabela 1. Efeito da concentração de penas na produção de queratinases.

Concentração de Penas (g/50 mL)	Atividade queratinolítica (U/mL)
0,5	3,45
1,0	4,30
1,5	4,60
2,0	6,40
2,5	6,00

A melhor concentração de nitrato de sódio, usado como fonte de nitrogênio no meio de cultura, para a produção de queratinase foi 0,1 g com 4,8 U/mL, se mantendo estável com 0,125 g com 4,65 U/mL de atividade queratinolítica (Tabela 2). O aumento da concentração causou um decréscimo da atividade queratinolítica ficando com apenas 1,85 U/mL de atividade com 0,3 g de nitrato de sódio.

Tabela 2. Efeito da concentração de $NaNo_3$ na produção de queratinases.

Concentração de $NaNo_3$ (g/50 mL)	Atividade queratinolítica (U/mL)
0,1	4,80
0,125	4,65
0,2	3,90
0,225	3,40
0,3	1,85

As diferentes concentrações de cloreto de cálcio, usado como fonte de íons Ca^{2+}, não causaram diferenças na produção de queratinases por *Aspergillus sulphureus* URM5029, observando-se apenas uma pequena diminuição da atividade queratinolítica de 4,05 para 3,75 U/mL da menor para maior concentração utilizada, 0,001 e 0,3 g, respectivamente (Tabela 3). Isto indica que este íon não possui influência na produção de queratinases pelo microrganismo testado.

Tabela 3. Efeito da concentração de $CaCl_2$ na produção de queratinases.

Concentração de $CaCl_2$ (g/50 mL)	Atividade queratinolítica (U/mL)
0,001	4,05
0,00125	4,00
0,002	3,90
0,00225	3,80
0,003	3,75

Em relação aos efeitos da composição do meio de cultura, Anbu et al. (2007) estudaram os fatores que influenciam a produção da queratinase por *Scopulariopsis brevicaulis*. A produção da enzima foi melhorada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%), nitrato de sódio (2%), pena (1,5%) e Cl_2Ca (1mM). Sales et al. (2008) estudaram a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM1546, obtendo o máximo de atividade queratinolitica (48,9 U/mL) com 0,5% (p/v) de penas de frango. Gioppo et al. (2009) estudaram *Myrothecium verrucaria* um fungo filamentoso não dermatófito capaz de crescer e produzir queratinase em meio líquido submerso (93,0 ± 19 U/mL) e meio em estado semi-sólido (98,8 ± 7,9 U/mlL), utilizando pó de penas de aves de capoeira (PFP) como único substrato. Os autores obtiveram os mais altos níveis de atividade de queratinase pela suplementação das

culturas com níveis PFP e com bagaço de mandioca, 168,0 ± 28 U/mL e 189,0 ± 26 U/mL em culturas submersas e em estado semi-sólido, respectivamente. Esses resultados corroboram com os obtidos neste trabalho em relação à concentração do substrato e da fonte de íons Ca^{2+}, sendo possível observar que com o aumento da quantidade de penas e a diminuição da quantidade de $CaCl_2$ uma maior produção de queratinases por *Aspergillus sulphureus* URM5029 é obtida.

Efeitos das condições de cultura na produção de queratinases

O pH inicial ótimo para produção de queratinases foi de 7,8 com 7,05 U/mL de atividade e o pH do meio teve um aumento para 8,4 durante o cultivo (Tabela 4). Esse aumento se deve a produção de amônia e compostos alcalinos. Foi possível observar que em pHs mais baixos a atividade queratinolítica é mais baixa em comparação as encontradas com valores mais altos de pH.

Tabela 4. Efeito do pH na produção de queratinases.

pH	Atividade queratinolítica (U/mL)
5,7	2,05
6,3	2,15
6,9	4,40
7,3	5,15
7,8	7,05

O inóculo é um fator muito importante afetando o crescimento e a formação do produto. A concentração de inóculo de $1x10^6$ esporos/mL foi a melhor para produção de queratinases com 5,40 U/mL (Tabela 5). A produção de queratinase decresceu com o aumento da concentração do inóculo.

Tabela 5. Efeito do inóculo na produção de queratinases.

Inóculo (esporos/mL)	Atividade queratinolítica (U/mL)
$1x10^6$	5,40
$2x10^6$	4,70
$4,5x10^6$	4,45
$1x10^7$	4,05
$1,5x10^7$	3,80

A agitação ótima para produção da queratinases foi 160 rpm com 5,15 U/mL de atividade enzimática (Tabela 6). A produção de queratinase decresceu com o aumento da agitação até 250 rpm, onde a atividade queratinolítica foi de 2,40 U/mL.

Tabela 6. Efeito da agitação na produção de queratinases.

Agitação (RPM)	Atividade queratinolítica (U/mL)
120	4,65
160	5,15
200	4,30
220	2,80
250	2,40

Com o aumento da temperatura de incubação foi observado um aumento na produção de queratinases por *Aspergillus sulphureus* URM5029, que obteve uma produção ótima a 35 °C com 7,40 U/mL de atividade queratinolítica (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito da temperatura na produção de queratinases.

Temperatura (°C)	Atividade queratinolítica (U/mL)
25	3,80
30	6,05
35	7,40

Em relação aos efeitos das condições de cultura os autores citados no item anterior obtiveram os seguintes resultados: Anbu et al. (2007) alcançaram o máximo de produção de queratinases por *Scopulariopsis brevicaulis* a pH 7,5, temperatura de 30 °C

e crescimento em um período de 5 semanas. Cai et al. (2008) estudaram um novo isolado de resíduos de pena identificado como *Bacillus subtillis*. As condições ótimas para a produção da queratinase foram pH ótimo 7,5, tamanho de inóculo de 2% (v/v), idade do inóculo de 16 h e cultivo a 23 °C. Sales et al. (2008) obtiveram o máximo de atividade queratinolitica (48,9 U/mL) por *Aspergillus carbonarius* URM1546 com 120 rpm e sete dias de cultivo. Esses resultados também corroboraram com os obtidos neste trabalho em relação ao pH, temperatura e concentração do inóculo, sendo possível observar que o aumento do pH e da temperatura e uma menor quantidade do inóculo utilizado obtemos uma maior produção de queratinases por *Aspergillus sulphureus* URM5029.

Caracterização do extrato bruto

Efeito e estabilidade ao pH e temperatura

Para a caracterização enzimática da queratinase foi usado extrato enzimático bruto obtido a partir de *Aspergillus sulphureus* URM5029 que mostrou a maior atividade queratinolítica.

A maior atividade queratinolítica foi obtida em pH 10,0 (10,95 U/ml) e pH 10,7 (10,55 U/ml). Estabilidade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 foi observada na faixa de pH 6,5-9,0 com valores de atividade acima de 50%, a estabilidade máxima foi encontada em pH 8,0 com 94% de atividade residual. Estes resultados mostram que a queratinase é estável em uma ampla faixa de pH (Fig. 3).

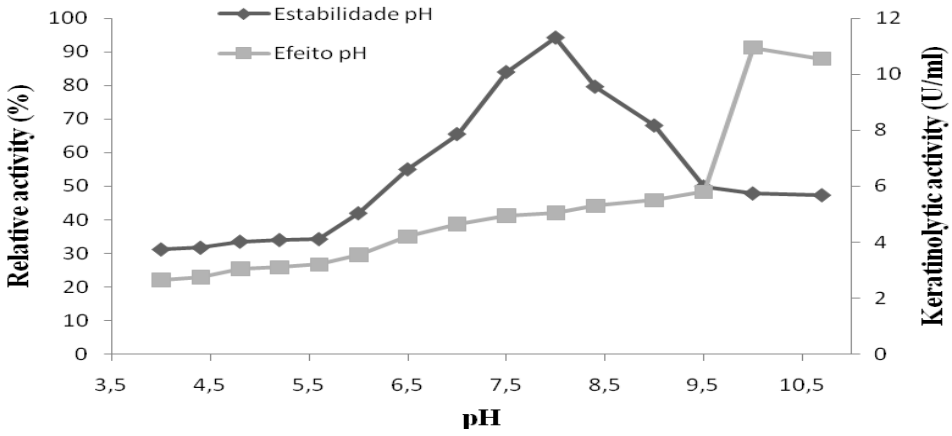

Figura 3: Efeito e estabilidade ao pH (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029.

O efeito da temperatura sobre a atividade da queratinase demostrou que a atividade máxima foi obtida a 35 °C (12,3 U / ml). A enzima mostrou-se estável em temperaturas de 25 °C a 60 °C, com valores de atividade acima de 50%, a enzima foi mais estável a 35 ºC com 68% de atividade residual. Estes resultados mostram que a queratinase é estável em uma ampla faixa de temperatura (Fig. 4).

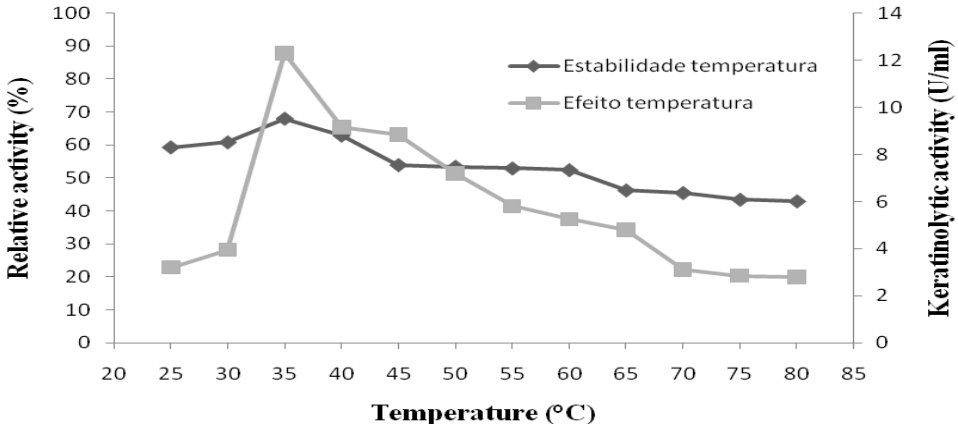

Figure 4: Efeito e estabilidade a temperatura (2 horas de incubação) sobre a atividade da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029.

Queratinases de muitas bactérias, actinomicetos e fungos tem pH ótimo de neutro a alcalino (pH 7,5-11,0) (Riffel et al., 2003; Farag e Hanssan, 2004; Thys et al., 2004; Anbu et al., 2005). Outras enzimas queratinolíticas também demonstraram serem ativas em pH alcalino, como as secretadas por *Streptomyces* sp. (Lentourne et al., 1982) e *Strepmomyces albidoflavus* (Bressolier et al., 1999). Entretanto, novas queratinases possuem alcanofilia extrema com ótimo de pH>12 (Gupta e Rammani, 2006). No entanto, a temperatura ótima da queratinase é entre 30 °C e 80 °C (Gupta e Rammani, 2006), mas, a enzima de *Chrysosporium keratinophilum* (Dozie et al., 1994) e *Fervidobacterium islandicum* (Nam et al., 2002) mostraram excepcional temperatura ótima a 90 °C e 100 °C, respectivamente.

Cao et al. (2008) estudaram a queratinase produzida por *Trichoderma atroviride* que mostrou pH ótimo de 8,0-9,0 e temperatura de 50 °C. Anbu et al. (2008) caracterizaram a queratinase produzida por *Trichopyton* sp. HA-2 isolado de penas soltas sobre o solo. O pH ótimo e temperatura para a atividade da queratinase foi de 7,8 e 40 °C, respectivamente. A enzima mostrou um aumento gradual na atividade com um aumento de pH até o ótimo, seguido por uma queda gradual na atividade, com a

temperatura acima de 55 °C a atividade da enzima foi praticamente inativada. Anbu et al. (2008) também observaram que a atividade da queratinase ficou estável na faixa de pH 7-10 por 1 hora a 37 °C, e em temperaturas 20-45 °C. Saber et al. (2010) caracterizou a atividade queratinolítica de culturas de *Alternaria tenuissima* K2 e *Aspergillus nidulans* K7. A atividade da queratinase foi ótima em condições alcalinas entre pH 8,0 e 9,0 para *A. tenuissima* K2 e entre pH 7,5 e 9,0 para *A. nidulans* K7, com ótimo em pH 8,5 para ambas as enzimas. Em uma ampla faixa de temperatura (de 25 °C a 65 °C), a queratinase de *A. nidulans* K7 mostrou um máximo de atividade a 40 °C e atividades queratinolíticas maiores a temperaturas mais altas foi encontrada para queratinase de *A. tenuissima* K2.

Os resultados citados são semelhantes às do presente trabalho onde o pH e temperatura ótima para a atividade queratinolítica foram de 8,0 e 35 °C, respectivamente, bem como a estabilidade da queratinase, que obteve uma ampla faixa de pH (6,5 a 9,0) e temperatura (25 °C a 60 °C) em que a enzima foi estável mantendo mais de 50% da sua atividade queratinolítica inicial.

Efeito dos inibidores de protease e íons metais

Os efeitos de inibidores de protease e íons metálicos em diferentes concentrações na atividade da queratinase são apresentados nas Tabelas 8 e 9. A atividade queratinolítica foi pouco inibida por PMSF e a enzima foi fortemente inibida por EDTA (Tabela 8), indicando que pode ser uma queratinase pertencente ao grupo das metaloproteases. Cu^{2+} (5mM), Mg^{2+} (1mM) e Zn^{2+} (5mm) foram os íons metais que mais inibiram a atividade queratinolítica (Tabela 9).

Table 8: Efeito dos inibidores na atividade queratinolítica de *A. sulphureus* URM5029.

Inibidores	Atividade relativa %
Pepstatin A 1mM	51,81
Acid iodoacetic 0.1M	52,42
Acid iodoacetic 1mM	51,51
PMSF 0.1M	70,69
PMSF 1mM	82,42
EDTA 0.1M	26,36
EDTA 1mM	25,75

Table 9: Efeito de ínos metálicos na atividade da queratinase secretada por *A. sulphureus* URM5029.

Ions metais	Atividade Relativa %
Ca^{2+} 1mM	76,96
Ca^{2+} 5mM	73,03
Co^{2+} 1mM	73,93
Co^{2+} 5mM	79,39
Cu^{2+} 1mM	82,42
Cu^{2+} 5mM	63,63
Mn^{2+} 1mM	70,90
Mn^{2+} 5mM	81,51
Mg^{2+} 1mM	60,90
Mg^{2+} 5mM	70,60
Zn^{2+} 1mM	73,33
Zn^{2+} 5mM	63,33

Mataloproteases queratinolíticas podem ser uma ótima promessa biotecnológica, podendo superar a proteólise limitada na superfície de partículas de queratina insolúveis por causa da interação enzima-substrato restrita, bem como a natureza metalo-enzima que apresenta um método potencial de imobilização de enzimas por causa de uma autólise reduzida (Allpress et al., 2002; El-Gendy, 2010). Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} podem estar associados com a estabilização da estrutura terciária, conformação de metaloproteases, e proteger estas enzimas contra desnaturação térmica e autoproteolises (El-Gendy 2010).

Cao et al. (2008) estudaram a queratinase produzida por *Trichoderma atroviride*. O pH ótimo e temperatura foi de 8.0-9.0 e 50 °C, respectivamente. Entre os metais usados, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+} aumentaram a atividade queratinolítica; Mg^{2+} não teve efeito; Hg^{2+} e Cu^{2+} exerceram efeito inibitório significativo. Inibição da atividade queratinolítica por 49% e 43% foi observado após incubação com 1mM de PMSF e 0,01M de SDS, respectivamente. Anbu et al. (2008) caracterizaram a queratinase produzida por *Trichopyton* sp. HA-2 isolado de penas de frango soltas no solo. O pH ótimo e temperatura para atividade da queratinase foi de 7.8 e 40 °C, respectivamente. A enzima mostrou um aumento gradual de atividade com o aumento do pH ótimo, seguido por uma queda gradual da atividade; com a temperatura acima de 55 °C a atividade da enzima foi quase inativada. A atividade da queratinase foi estável na faixa de pH entre 7 e 10 por 1 hora a 37 °C, e a temperatura de 20 °C a 45 °C. O inibidor de serina protease, PMSF, inibiu completamente a atividade da queratinase enquanto por EDTA, seguido por p-CMB, inibiu parcialmente. Este resultado indicou que pode ser um tipo de serina protease.

Neste trabalho observamos que os íons metais utilizados e o PMSF influenciaram a atividade queratinolitica fracamente, e o EDTA inibiu 75% da atividade da queratinase, indicando que pode ser uma queratinase do grupo das metaloproteases. Esses resultados diferem dos encontrados nos trabalho citados, onde a atividade queratinolítica foi aumentada na presença da maioria dos íons metálicos utilizados pelos autores, o EDTA inibiu parcialmente a atividade da enzima, e o PMSF inibiu completamente a atividade da queratinase testada, mostrando ser uma serina protease.

CONCLUSÕES

As espécies testadas se destacaram na colonização dos diferentes substratos queratinosos e também mostraram potencial queratinolítico na produção de queratinase utilizando diferentes substratos de queratina solúveis e insolúveis, destacando-se o uso de penas como principal substrato indutor para a produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM 5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586. *Aspergillus sulphureus* está sendo indicado como uma nova espécie capaz de produzir queratinase nas seguintes condições ótimas de produção: 2 g/50 mL de pena de frango, 0,1 g/50 mL de $NaNo_3$, 0,001 g/50 mL de $CaCl_2$, pH 7,8, 35ºC, 160 rpm e 10^6 esporos/mL em cultivo líquido submerso em 10 dias de incubação. A queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 apresentou melhor atividade em pH 10,0 e 35 ºC e é pouco inibida na presença de íons metais e PMSF e fortemente inibida por EDTA, sugerindo ser um tipo de metaloprotease. A capacidade de queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 ser estável em uma ampla faixa de pH e temperatura sugere o uso desta cepa em processos biotecnológicos industriais.

7. Purificação e condições ótimas para produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 usando pena de frango como substrato [3]

RESUMO

Os componentes do meio e a otimização dos parâmetros ambientais e de fermentação, minimizam a quantidade de componentes não utilizados na fermentação. Para o desenvolvimento de um processo enzimático eficiente deve-se estabelecer uma estratégia de purificação. O sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser uma alternativa adequada destinada ao primeiro passo de purificação, visto que remove vários contaminantes em um processo simples e econômico. O objetivo do presente estudo foi purificar e determinar as melhores condições para produção máxima da queratinase usando um planejamento fatorial completo 2^4. Para a extração da enzima, os sistemas serão preparados inicialmente com PEG de diferentes massas molares e sal citrato de sódio. O fungo Aspergillus sulphureus URM5029 foi testado como produtor de queratinase, em cultura submersa com o uso de diferentes concentrações de penas de frango como substrato em diferentes pH, temperatura e agitação. Os resultados do planejamento fatorial completo 2^4 demonstraram que as melhores condições de produção foram: pH 8,0, 36 °C, 120 rpm, 2,5% (p/v) de penas de frango em 10 dias de produção com a máxima produção de queratinase de 10,06 U/ ml. As melhores condições para purificação da queratinase de Aspergillus sulphureus URM5029 foi: massa molecular do PEG, 8000; concentração do PEG, 20% e concentração de citrato 15%, apresentando aumento de pureza e recuperação queratinolítica de 25,04 e 184,9%, respectivamente.

Palavras chave: Otimização, sistema de duas fases aquosas, *Aspergillus* sp., queratinase.

INTRODUCÃO

Proteases formam uma importante classe de enzimas comercialmente importantes e suas aplicaçoes nas industrias de detergentes, couro, alimentos e farmacêutica constituem aproximadamente 40% do total de enzimas do mercado (Pillai et al., 2011). Resíduos de origem animal como unhas, cabelos, penas, cascos e outros materiais queratinosos difícil de degradar e matadouros de gados e aves, compreendem principalmente queratinas, que podem ser eficientemente manejadas e convertidas em produtos por uma classe especial de proteases, as queratinases (Onifade, 1998).

Enzimas queratinolíticas são geralmente produzidas em fermentação submersas por vários fungos e bacterias (3;4;20). Essa produção é grandemente influenciada pela

[3] Trabalho a ser submetido para publicação como Sousa-Lucena, MA; Poto, T; Mary, C; Pessoa-Jr. A; Porto, ALF e Souza-Motta, CM. Purificação e condições ótimas para produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 usando pena de frango como substrato. World Journal of Microbiology & Biotechnology.

composição do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e por outros fatores como a densidade do inoculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação, cada organismo ou estrato possui suas condições especiais para a máxima produção da enzima (Puri et al., 2002; Bernal et al., 2006; Anbu et al., 2007).

Na prática comercial, os esforços de pesquisa têm sido direcionados principalmente para a manutenção de um equilíbrio entre os componentes do meio e otimizar os parâmetros ambientais e de fermentação, minimizando assim a quantidade de componentes não utilizados na fermentação (Adinarayana et al., 2002; Bernal et al., 2006). Os métodos convencionais de otimização freqüentemente não consideram a interação de vários parâmetros, em comparação com um design fatorial (Box et al., 1978; Bernal et al., 2006). Otimização é um dos critérios mais importantes quando se trata de desenvolver qualquer processo microbiano novo. Análise fatorial e de superfície de resposta são ferramentas importantes para determinar as condições do processo ideal, principalmente por sua capacidade de considerar o efeito de possíveis interações entre os fatores estudados (Kalil et al., 2000; Anbu et al., 2007).

Para o desenvolvimento de um processo enzimático eficiente deve-se estabelecer uma estratégia de purificação. De um modo geral, a purificação de queratinases toma como base as técnicas utilizadas nas proteases alcalinas (Gupta et al., 2002), porém, o alto custo representado por estas técnicas se torna uma barreira para obtenção destes bioprodutos. Assim, o sistema aquoso bifásico (SAB) pode ser uma alternativa adequada destinada ao primeiro passo de purificação, visto que remove vários contaminantes em um processo simples e econômico (Mayerhoff et al., 2004). O SAB explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros ou de um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas (Minami, 1997).

O objetivo do presente estudo foi purificar e determinar as melhores condições para produção máxima da queratinase no mais adequado pH, temperature, agitação e concentração do substrato (penas de frango) usando um planejamento fatorial completo 2^4.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

A amostra de fungo utilizada, *Aspergillus sulphureus* URM 5029 foi procedente da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Produção de queratinase

Para o processo de escolha das melhores condições de produção de queratinase foram estudados parâmetros como: temperatura, pH, agitação e concentração do substrato utilizando um planejamento fatorial completo (2^4) (Tabela 1) com 5, 7, 9 e 10 dias de produção (Anbu et al., 2005; 2007). Foram realizados 16 ensaios para o estudo da produção de queratinase e 4 pontos centrais, os quais possibilitaram a análise do erro experimental. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistica* 8 (Statsoft inc, 2008).

Tabela 1 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a produção de queratinase com 5, 7, 9 e 10 dias de produção.

	Níveis		
Fatores	**Inferior (-1)**	**Central (0)**	**Superior (+1)**
Temperatura (°C)	28	32	36
Agitação (RPM)	120	160	200
Penas de frango (g)	1,5	2,0	2,5
pH	7,0	7,5	8,0

Design Box, Hunter & Hunter

Neste estudo, o Box, Hunter & Hunter delineamento experimental foi usado para investigar o significado de variáveis para produção da queratinase. Para obter um valor de erro experimental, quatro repetições do ponto central foi realizada. O software StatSoft (StatSoft STATISTICA 7) foi usado para gerar o Box, Hunter & Hunter delineamento experimental e análise dos dados.

Determinação da atividade enzimática

A atividade queratinolítica foi determinada de acordo com Anbu et al., 2007 em que a pena (20 mg) foi adicionada a 3,8 mL de 100 mM Tampão Tris-HCl (pH 7,8) e

incubada com 0,2 mL do filtrado de cultura, por 2 horas a 37 ºC. Após a incubação as amostras foram refrigeradas a 4 ºC por 10 min, e em seguida centrifugadas a 4 ºC por 10 min a 10.000 g. A absorção do fluído sobrenadante a 280 nm foi determinada espectrofotometricamente em comparação com o branco, que foi preparado com pena e tampão. O aumento de 0,100 em absorbância indicou uma unidade de atividade enzimática (1 KU = 0,100 absorbância).

Purificação da enzima

Estudos de partição da queratinase em sistema bifásico aquoso PEG/Citrato

Os parâmetros de extração estudados foram: massa molar e concentração do PEG e concentração do citrato de sódio na extração da queratinase do meio de fermentação. Para a extração da enzima, os sistemas foram preparados com PEG de diferentes massas molares (400, 3350 e 8000 g/mol) e sal citrato de sódio segundo Oliveira et al. (2001) e Sarubbo (2000).

Planejamento fatorial para otimização da extração da queratinase

Para análise estatística dos resultados foram utilizadas três variáveis respostas: coeficiente de partição, aumento de pureza e rendimento. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as respostas. Após a realização dos experimentos foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 8.0.

Tabela 2 - Níveis dos fatores utilizados na extração da queratinase por SDFA (PEG/Citrato).

Fatores	**Níveis**		
	Superior (+1)	**Central (0)**	**Inferior (-1)**
Massa molar do PEG (g/mol)	8000	3350	400
Concentração do PEG % (p/p)	24	22	20
Concentração de citrato % (p/p)	20	17,5	15

Fator de purificação, recuperação queratinolítica e coeficiente de partição

O aumento de pureza (AP) é a razão da atividade específica na fase considerada (*Aef*) pela atividade específica do extrato bruto (*Aeeb*) e foi calculado conforme a Equação 1.

$$AP = \frac{Aef}{Aeeb} \qquad (1)$$

O percentual de recuperação queratinolítica (RQ) foi determinado conforme a Equação 2.

$$RQ(\%) = \frac{A_f V_f}{A_{eb} V_{eb}} 100 \qquad (2)$$

onde *Af* é a atividade de queratinase na fase considerada (U/ml), *Aeb* é a atividade enzimática no extrato bruto (U/ml), *Vf* é o volume da fase considerada (ml) e *Veb* é o volume inicial de extrato adicionado (ml).

O coeficiente de partição (*K*) do sistema foi determinada pela Equação 3.

$$K = \frac{A_{ft}}{A_{ff}} \qquad (3)$$

onde *Aft* e *Aff* é a atividade da fase de topo e fase de fundo após o processo de purificação, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSÃO

Produção de queratinase

Com a quantificação da atividade queratinolítica dos filtrados de cultura foram realizadas análises estatísticas, em que os efeitos das variáveis sobre a variável resposta (atividade queratinolítica) foram analisados. A principal vantagem da análise estatística é mostrar a visualização de múltiplas interações entre variáveis experimentais, fornecendo maior confirmação nos níveis de expressão da proteína fornecida em áreas não diretamente abrangidas pelo experimento (Swalley et al. 2006).

Aspergillus sulphureus URM5029 foi selecionado dentre outros fungos produtores de queratinase para o estudo das melhores condições de produção da enzima, inicialmente este fungo apresentou 7,35 U/ml de atividade em 10 dias de fermentação. Após a realização dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 atividades mais altas foram encontradas com 9 dias (9,2 U/ml) e 10 dias (10,6 U/ml) de fermentação,

mostrando um aumento de 1,25 e 1,44 vezes da produção de queratinase, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 Matriz de planejamento estatístico dos níveis de variáveis experimentais, para produção de queratinase após fermentação em 5, 7, 9 e 10 dias por *Aspergillus sulphureus* URM5029, utilizando penas de frango como substrato.

Ensaios	Conc. Sbt. (%)	pH	VA (rpm)	T (ºC)	AQ (U/mL) 5 dias	AQ (U/mL) 7 dias	AQ (U/mL) 9 dias	AQ (U/mL) 10 dias
1	1,5	7,0	120	28	1,0	2,55	3,4	4,1
2	2,5	7,0	120	28	0,95	2,75	3,35	4,25
3	1,5	8,0	120	28	1,05	2,9	3,7	3,75
5	2,5	8,0	120	28	0,85	2,45	3,85	4,45
5	1,5	7,0	200	28	1,1	2,95	3,1	3,95
6	2,5	7,0	200	28	1,0	2,35	3,35	3,4
7	1,5	8,0	200	28	1,25	2,7	3,05	4,0
8	2,5	8,0	200	28	1,45	3,1	3,45	4,25
9	1,5	7,0	120	36	1,4	3,7	5,75	5,3
10	2,5	7,0	120	36	1,9	3,85	5,9	6,45
11	1,5	8,0	120	36	1,4	4,0	6,3	6,75
12	2,5	8,0	120	36	1,75	4,3	9,2	10,6
13	1,5	7,0	200	36	1,3	2,6	4,4	5,15
14	2,5	7,0	200	36	1,15	2,6	4,25	5,2
15	1,5	8,0	200	36	1,15	2,5	4,8	5,1
16	2,5	8,0	200	36	1,25	2,55	4,8	5,55
17 (C)	2,0	7,5	160	32	1,75	4,25	5,9	6,25
18 (C)	2,0	7,5	160	32	1,7	4,15	5,75	6,1
19 (C)	2,0	7,5	160	32	2,2	4,2	5,75	6,25
20 (C)	2,0	7,5	160	32	2,0	4,0	5,8	6,2

T = Temperatura; **A =** Agitação; **Subst. =** Substrato; **AQ =** Atividade Queratinolítica; **(C)** = Controle.

A análise do gráfico de Pareto (Figura I) mostra a significância das quatro variáveis testadas no planejamento, bem como as interações entre elas, onde podemos observar que todas as variáveis e suas interações contribuiram significativamente para a produção da queratinase porque os valores estimados de efeitos estão acima do nível de significância p = 0,05. Os efeitos significativos das interações entre as variáveis testadas mostram que elas não agiram sozinhas na atividade queratinolítica, os seus efeitos depende de outras variáveis (Figura I).

O gráfico mostra que os parâmetros que mais influenciaram a produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 foram a temperatura e agitação, indicado um efeito positivo da temperatura e negativo da agitação, ou seja, quanto maior a temperatura e menor velocidade de agitação maior será a produção de queratinase por este fungo. Além disso, também foi possível observar que o pH e a

consentração de substrato possuem efeito positivo, o aumento dos níveis dessas variáveis, provavelmente, levaria a um aumento da produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029.

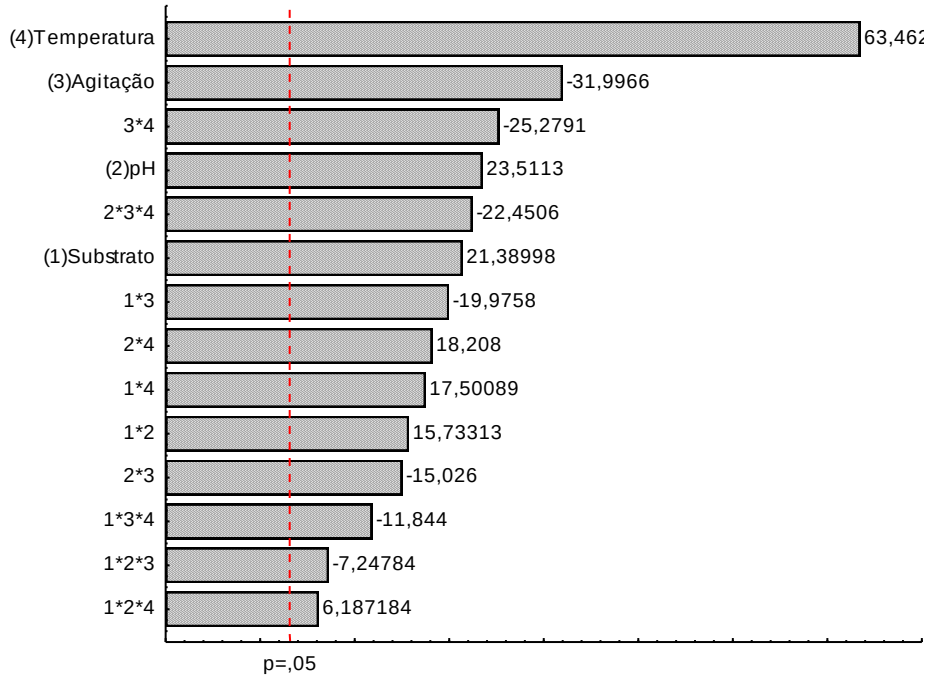

Figura I Gráfico de Pareto sobre os efeitos das diferentes variáveis, com 10 dias de fermentação, testadas no experimento para a produção de queratinase por *Aspergillus sulphureus*. O ponto em que os efeitos são estatisticamente significativos (p = 0,05) é indicado pela linha vertical tracejada.

De acordo com os resuldados obtidos, onde todas as variáveis testadas influenciaram na produção da queratinase, um outro planejamento poderia ser realizado a fim de otimizar a produção. No entanto, tanto *Aspergillus sulphureus* quanto outras espécies de fungos em pH e temperatura superiores aos valores ótimos de produção obtidos 8,0 e 36 °C, respectivamente, apresentam uma diminuição da produção da queratinase. Valores maiores de agitação não são recomendados para células fúngicas, estas em altas rotações sofrem lise celular, o que torna os fungos inativos Liang et al. (2011).

Quanto a concentração de substrato, foi testado, com as melhores condições de temperatura, pH e agitação encontardos, valores maiores (entre 2,5g e 7,g de penas de frango) e foi observado que valores superiores a 2,5g não aumentam a produção da

queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 em 10 dias de fermentação, permanecendo estável (dados não mostrados).

Desta forma as melhores condições obtidas para a produção máxima da queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 foram: pH 8,0, 36 °C, 120 rpm, 2,5% (p/v) de penas de frango.

Uma variedade de queratinases de origem microbiana com diferentes propriedades e características tem sido descrito e caracterizado (Gupta e Rammani, 2006). Queratinases de *Aspergillus fumigatus* (Santos et al., 1996), *Streptomyces albidoflavus* (Bressollier et al., 1999), *Microsporum canis* (Brouta et al., 2001), espécies de *Chrysosporium* (Al-Sane et al., 2002), *Trichophyton mentagrohytes* (Ghahfarokhi e al., 2003), *Doratomyces microsporus* (Vignardet et al., 1999; Gradisar et al., 2000; Vignardet et al., 2001), *Kocuria rosea* (Bernal et al., 2006) , *Sccopulariopsis brevicaulis* (Anbu et al., 2007) entre outros, tem sido estudado.

Neste Contexto, Vignardet et al. (2001) estudaram a influência da temperatura, pH, concentração da queratinase, concentração de substrato e tempo de incubação para a liberação de proteínas solúveis pela queratinase produzida por *Doratomyces microsporus* em um "design" experimental de segunda ordem. Os resultados ótimos da queratinase para liberar proteínas solúveis foram: pH 8,2; concentração de queratinase, 0,14% (peso da queratinase liofilizado/volume final); concentração do substrato, 5% (peso da unha pó/volume final) para unhas e 38,8 °C; pH 9,0; concentração do substrato, 5% (peso do casco pó/volume final) e 5 h e 55 min. de incubação para cascos. Anbu et al. (2007) analisaram os fatores que influenciam a produção de queratinase por *Scopulariopsis brevicaulis*, isolado de granja. A produção máxima de enzima foi obtida em pH 7,5, temperatura 30 °C e crescimento em um período de cinco semanas. A produção da enzima foi reforçada quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1% p/v), nitrato de sódio (2% p/v), pena (1,5% p/v) e $CaCl_2$ (1mM), com produção máxima de queratinase de 6,2 KU/ml. El-Gendy (2010) selecionou o fungo endofítico queratinolítico *Penicillium* spp. Morsy1 para estudos do processo de otimização da produção de queratinase. A produção foi otimizada nas seguintes condições palha de arroz como fonte de carbono, pH do meio 6, crescimento a temperatura de 26 ° C, umidade inicial de 80% (v/p), inóculo de 10^5 esporos/mL e uma granulometria média do substrato de 0,6 mm (3.560 U/g, substrato seco inicial após 5 dias de fermentação). Liang et al. (2011) investigaram os efeitos da composição do meio e condições de cultura sobre a produção de queratinase por *Myceliophthora*

thermophila. Entre as composições de meio testadas, o amido solúvel, uréia, tiossulfato de sódio e $CaCl_2$ foram as mais eficientes fontes de carbono, nitrogênio, enxofre e íon mineral, respectivamente A uréia e o valor de pH foram os fatores significativos ($p<0,05$) para a produção queratinase nas condições experimentais usando o design fatorial Plackett-Burman. Houve um aumento de 6,4 vezes (5100 U/l) na atividade queratinolótica que o valor inicial (800 U/l).

Neste estudo, os fatores pH e temperatura tabém foram importantes na produção da queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029, além de mostrar a eficiência do uso de penas de frango como única fonte de carbono e nitrogênio para a produção de queratinsase.

Purificação da queratinase

Os melhores resultados de purificação da queratinase após análise estatística dos efeitos da concentração de PEG, massa do PEG e concentração do citrato foram obtidos na fase topo, ou seja, fase onde se encontra o polietileno glicol (PEG), o ensaio 2 apresentou as melhores condições para purificação da queratinase, o qual apresentou aumento de pureza e recuperação queratinolítica de 25,04 e 184,9%, respectivamente. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Matriz do planejamento fatorial completo 2^3, coeficiente de partição (K), recuperação queratinolítica (RQ) e aumento de pureza (AP) na fase de topo.

Ensaios	MPEG	CPEG (%)	Ccit (%)	K	RQ (%)	AP
1	400	20	15,0	0,00	0,00	0,00
2	8000	20	15,0	5,18	184,90	25,04
3	400	24	15,0	2,19	182,26	13,37
4	8000	24	15,0	13,65	154,52	20,48
5	400	20	20,0	2,84	125,70	10,36
6	8000	20	20,0	3,34	145,94	18,35
7	400	24	20,0	3,82	149,43	12,03
8	8000	24	20,0	3,15	120,84	11,19
9 (C)	3350	22	17,5	2,46	141,13	24,16
10 (C)	3350	22	17,5	2,70	137,97	23,88
11 (C)	3350	22	17,5	2,55	148,67	24,11
12 (C)	3350	22	17,5	2,75	127,45	23,62

MPEG = Massa do PEG; **CPEG =** Concentração do PEG; **Ccit =** Concentração citrato; **K =** Coeficiente de partição; **RQ** = Recuperação queratinolítica; **AP** = Aumento de pureza; **(C)** = Controle.

O aumento de pureza (AP), recuperação queratinolítica (RQ) e o coeficiente de partição (K), apresentados na Tabela 4, foram utilizados para realizar a análise dos efeitos da concentração dos componentes do sistema aquoso bifásico. Quanto ao aumento de pureza (AP), conforme apresentado na Figura 1a, verifica-se que todas as variáveis estudadas influenciaram significativamente. Havendo um incremento no aumento de pureza ao aumentarmos as concentrações das variáveis MPEG e CPEG, enquanto que a variável Ccit mostra um maior aumento de pureza em concentrações mais baixas do citrato. Na Figura 1b, que apresenta os efeitos das variáveis na recuperação queratinolítica (RQ) pode-se observar que MPEG e CPEG apresentaram efeito positivo, ao aumentarmos a massa molecular e concentração do PEG há uma maior recuperação da queratinase. O efeito da concentração de citrato, embora não significativo estatisticamente, mostrou efeito positivo. Nos dois casos, aumento de pureza (AP) e recuperação queratinolítica (RQ), todas as interações entre as variáveis testadas tiveram efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança.

Em relação ao coeficiente de partição (K) (Figura 1c) é possível verificar que as variáveis testadas e suas interações tiveram efeito estatisticamente significativo sobre o coeficiente de partição da enzima. A massa molecular e concentração do PEG tiveram efeito significativo positivo, e a concentração de Ccit teve efeito negativo, desta forma com o aumento da mossa molecular e concentração do PEG e a diminuição da concentração de citrato há uma maior migração da enzima para a fase superior ou fase PEG do sistema.

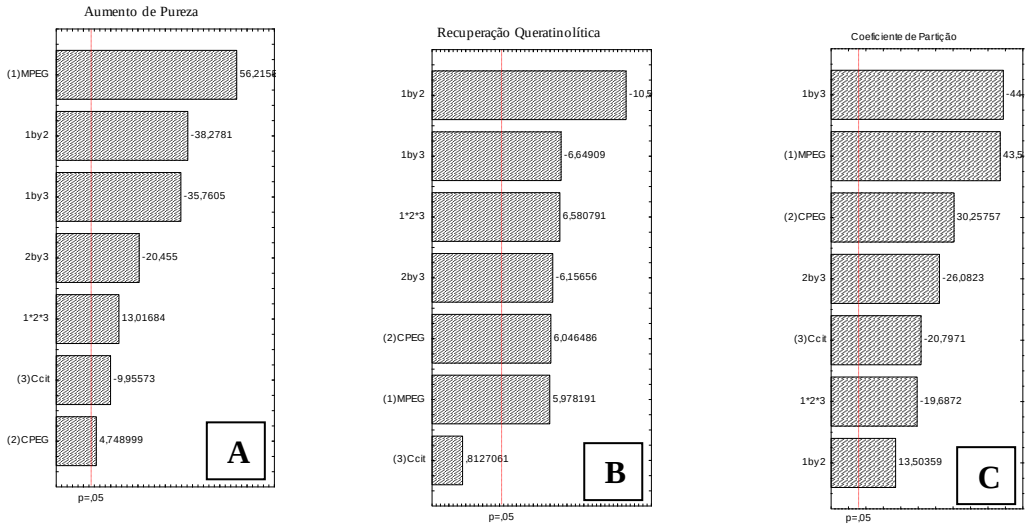

Figura 2 Gráfico de Pareto sobre os efeitos das diferentes variáveis no **(a)** aumento de pureza; **(b)** recuperação queratinolítica e **(c)** coeficiente de partição. O ponto em que os efeitos são estatisticamente significativos (p = 0,05) é indicado pela linha vertical tracejada.

Valores de recuperação queratinolítica superiores a 100%, obtidos em todos os ensaios, têm sido frequentemente reportados para enzimas extraídas em sistema aquoso bifásico (Mayerhoff et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006; Sala et al., 2011). Pancera et al. (2002) reportam que o PEG pode influenciar na atividade enzimática, causando alterações no sitio ativo da enzima, aumentando ou diminuindo, sua atividade relativa. Mayerhoff et al. (2004) atribuem este comportamento a função de eliminação de inibidores, onde a eliminação destes na fase de PEG durante a extração, bem como a composição do sistema, favorecem a atividade enzimática.

Podemos observar que dentre os ensaios estudados, o 2 e os pontos centrais ou controles 9, 10, 11 e 12 apresentaram os maiores índices de pureza e recuperação da queratinase, por isso foi realizado quatro repetições do ensaio 2 para confirmação das melhores condições de purificação da queratinase, os quais encontramos valores de aumento de pureza (AP) e recuperação queratinolítica (RQ) variando entre 25 – 30 e 184 – 196%, respectivamente, confirmando que as melhores condições para purificação da queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 foram: massa molecular do PEG, 8000; concentração do PEG, 20% e concentração de citrato 15%.

CONCLUSÕES

Aspergillus sulphureus URM5029, mostrou-se eficiente no uso de penas de frango como substrato nas seguintes condições: pH 8,0, 36 °C, 120 rpm, 2,5% (p/v) de penas de frango em 10 dias para a produção de queratinase extracelular. Este fungo apresentou inicialmente 7,35 U/ml de atividade em 10 dias de fermentação, após a realização dos ensaios do planejamento fatorial completo 2^4 atividades mais altas foram encontradas com 9 dias (9,2 U/ml) e 10 dias (10,6 U/ml) de fermentação, mostrando um aumento de 1,25 e 1,44 vezes da produção de queratinase, respectivamente. As melhores condições para purificação da queratinase são: massa molecular do PEG, 8000; concentração do PEG, 20% e concentração de citrato 15%, apresentando aumento de pureza e recuperação queratinolítica de 25,04 e 184,9%, respectivamente.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O solo é rico em fungos queratinolíticos capazes de degradar resíduos de penas de aves, essa capacidade faz com que esses fungos sejam interessantes para uso na bioconverção dos resíduos em alimentos com alta quantidade de proteína para ração animal e também para a bioremediação de ambientes contaminados com resíduos de queratina. Preservação em óleo mineral é suficiente para manter as características de viabilidade e taxonômica de culturas por longos períodos de tempo, como mostrado em nosso estudo, além disso, características metabólicas desses fungos são mantidas. *Aspergillus sulphureus* URM5029, *Trichoderma aureoviride* URM5574, *Aspergillus avenaceus* URM5051 e *A. sclerotiorum* URM5586 mostraram as maiores atividades queratinolíticas, indicando as suas aptidões para a produção de queratinase.

As espécies *Aspergillus sulphureus*, *Trichoderma aureoviride*, *Aspergillus avenaceus* e *A. sclerotiorum* se destacaram na colonização dos diferentes substratos queratinosos e também mostraram potencial queratinolítico na produção de queratinase utilizando diferentes substratos de queratina solúveis e insolúveis, destacando-se o uso de penas de frango como principal substrato indutor para a produção de queratinase. *Aspergillus sulphureus* está sendo indicado como uma nova espécie capaz de produzir queratinase nas seguintes condições: 2 g/50 mL de pena de frango, 0,1 g/50 mL de $NaNo_3$, 0,001 g/50 mL de $CaCl_2$, pH 7,8, 35ºC, 160 rpm e 10^6 esporos/mL em cultivo líquido submerso em 10 dias de incubação. A queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 apresentou melhor atividade em pH 10,0 e 35 ºC e é pouco inibida na presença de íons metais e PMSF e fortemente inibida por EDTA, sugerindo ser um tipo de metaloprotease. A capacidade de queratinase de *Aspergillus sulphureus* URM5029 ser estável em uma ampla faixa de pH e temperatura sugere o uso desta cepa em processos biotecnológicos industriais.

Para otimizar a produção da queratinase por *Aspergillus sulphureus* URM5029 foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4, as condições ótimas para produção da queratinase são: pH 8,0, 36 °C, 120 rpm, 2,5% de penas de frango em 10 dias de incubação. Este fungo apresentou inicialmente 7,35 U/ml de atividade, obtendo um aumento de 1,44 vezes (10,6 U/ml) nas condiçoes citadas acima. As melhores condições para purificação da queratinase são: PEG 8000; 20% PEG e 15% citrato, apresentando aumento de pureza e recuperação queratinolítica de 25,04 e 184,9%, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adinarayana K.; Ellaiah P. (2002) Response surface optimization of critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. J. Pharm. Parma. Sci, 5: 272 - 278.

Ali-Shtayeh M.S.; Khaleel T.K.M.; Jamous R.M.F. (2002) Ecology of dermatophytes and other keratinophilic fungi in swimming pools and polluted and unpolluted streams. Mycopathologia, 156 (3): 51-59.

Ali-Shtayeh M.S.; Jamous R.M.F. (2000) Keratinophilic fungi and related dermatophytes in pollutes soil and water habitats. Revista Iberoamericana de Micologia, p. 51-59.

Ali-Shtayeh M.S. (1989) Keratinophilic fungi of school in the Nablu area, West Bank of Jordan. Mycopathologia, 106:103-108.

Ali-Shtayeh M.S.; Salameh A-A.M.; Abu-Ghdeib S.I.; Jamous R.M. (2000) Hair and scalp mycobiota in school children in Nablus área. Mycopathologia, 150: 127–135.

Allpress J.D.; Mountain G.; Gowlan P.C. (2002) Production, purification and characterization of an extracellular keratinize from Lysobacter NCIMB 9497. Lett Appl Microbiol, 34: 337–342.

Al-Musalan A.A. (1990) Distribuition of keratinophilic fungi in animal folds in Kuwait. Mycopathologia, 112:65-70.

Al-Sane N.A.; Al-Musallam A.A.; Onifade A.A. (2002) The isolation of keratin degrading microorganisms from Kuwaiti soil: production and characterization of their keratinases. Kuwaiti J. Sci. Eng, 29(2): 125-137.

Anbu P.; Gopinath S.C.B.; Hilda A.; Lakshmi P.T.; Annadurai G. (2005) Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. Enz Microbial Technol, 36: 639-647.

Anbu P.; Gopinath S.C.B.; Hilda A.; Lakshmipriya T.; Annadurai G. (2007) Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopuariopsis brevicaulis*. Bioresour Technol, 18: 1298-1303.

Anbu P.; Hilda A.; Sur H.; Hur B.; Jayanthi S. (2008) Extracellular keratinase from Trichophyton sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. Inte Biodeterior Biodegrad, 62: 287–292.

Anbu P.; Hilda A.; Gopinath S.C.B. (2004) Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. Mycophatologia, 158: 303-309.

Anwar A.; Saleemuddin M. (1998) Alkline proteases a review. Bioresource Technological, 64: 175-183.

Apprich V.; Spergser J.; Rosengarten R.; Stanek C. (2006) In vitro degradation of equine keratin by dermatophytes and other keratinophilic fungi. Vet Microbiol, 114: 352–358.

Baxter M.; Mann R.R. (1969) Electron microscopie studies of the ivasion of human hair in vitro by three keratinophilic fungi, 7: 33-37.

Bernal C.; Cairo J.; Coello N. (2006) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. Enzyme and Microbial Technology, 38: 49-54.

Bernal C.; Diaz I.; Coelho N. (2006) Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. Can. J. Microbiol, 52: 445-450.

Bezerra C.C.F.; Lima R.F.; Lazera M.S.; Wanker B.; Borba C.M. (2006) Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituo Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, 39: 241-244.

Blyskal B. (2009) Fungi utilizing keratinous substrates. International Biodeterioration e Biodegradation, 63: 631– 653.

Bockle B.; Galunski B.; Muller R. (1995) Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. Applied and Environmental Microbiology, 61: 3705-3710.

Borman A.M.; Szekely A.; Campbell C.K.; Johnson E.M. (2006) Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia, 161: 361–368.

Box G.E.P.; Hunter W.; Hunter J.S. (1978) Statistics for experimenters. Chapters 12 and 15. J. Wiley and Sons, New York, 591-688.

Brandelli A.; Riffel A. (2005) Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. Electron J. Biotechnol, 8: 35-42.

Brandelli A.; Daroit D.J.; Riffel A. (2010) Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Appl Microbiol Biotechnol, 85: 1735–1750.

Braz S.C.M.; Souza-Motta C.M.; Massa D.M.L.; Neves R.P.; Magalhães O.M.C. (2009) Viabilidade, confirmação taxonômica e caracterização enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM. Rev Soc Bras Med Trop, 42(1): 63-66.

Bressollier P.; Letourneau F.; Urdaci M.; Verneuil B. (1999) Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albiflavus*. Appl. Enviro. Micro, 65: 2570-2576.

Brouta F.; Descamps F.; Fett T.; Losson B.; Gerday C.; Mignon B. (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med Mycol, 39: 269–275.

Brutt E.H.; Ichida J.M. (1999) Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*. US Patent 5.877.0000.

Cai C.G.; Lou B.G.; Zheng X.D. (2008) Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. J Zhejiang Univ Sci B, 9(1): 60-67.

Cai S.B.; Huang Z.H.; Zhang X.Q.; Cao Z.J.; Zhou M;H.; Hong F. (2011) Identification of a Keratinase-Producing Bacterial Strain and Enzymatic Study for Its Improvement on Shrink Resistance and Tensile Strength of Wooland Polyester-Blended Fabric. Appl Biochem Biotechnol, 163: 112–126.

Cao L.; Tan H.; Liu Y.; Xue X.; Zhou S. (2008) Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. Lett Appl Microbiol, 46: 389–394.

Carmichael J.W.; Kendrick W.B.; Conners I.L.; Singler L. (1980) Genera of Hyphomycetes**.** University of Alberta Press, Canada, 369 p.

Cavalcanti M.T.H.; Porto T.S.; Neto B.B.; Lima-Filho J.L.; Porto A.L.F.; Pessoa Jr. A. (2006) Aqueous two-phase systems extraction of α-toxin from *Clostridium perfringens* type A. Journal of Chromatogaphy B, 833 (2): 135-140.

Chen C.Y; Rojanatavorn K.; Clark A.C.; Shih J.C.H. (2005) Characterization and enzymatic degradation of Sup35NM, a yeast prion-like protein. Protein Science, 14: 2228–2235.

Chenggang C.; Xiaolu X.; Xiaodong Z. (2011) Keratin degradation and dehairing application of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. 978-1-4244-5089-3/11.

Choi J.M.; Nelsom P.V. (1996) Developing a slow-release nitrogen fertilizier from organic sources. II. Using poultry feathers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 121: 634-638.

Corrêa A.P.F.; Daroit D.J.; Brandelli A. (2010) Characterization of a keratinase produced by Bacillus sp. P7 isolated from an Amazonian environment. Inte Biodeterior Biodegrad, 64:1–6.

De Toni C.H.; Richter M.F.; Chagas J.R.; Henriques J.A.P.; Termignoni C. (2002) Purification and characterization of na alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. Can. J. Microbiol, 48: 342-348.

Deshmukh S.K. (2003) The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. Mycoses, 46: 203–207.

Deshmukh S.K. (2002) Incidence of dermatophytes and other keratinophilic fungi in the glacier bank soils of the Kashmir valley, India. Mycologist, 16: 165-167.

Deshmukh S.K. (2002) Incidence of keratinophilic fungi from selected soils of Kerala state (India). Mycopathologia, 106: 177-181.

Deshmukh S.K. (2004) Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from the vicinity of salt pan soils of Mumbai, India. Mycopathologia, 157: 265–267.

Deshmukh S.K. (1999) Keratinophilic fungi isolated from soils of Mumbai, India. Mycopathologia, 146(3): 115-116.

Deshmukh S.K. (2004) Keratinophilic fungi on feathers of pigeon in Maharashtra, India. Mycoses, 47: 213-215.

Deshmukh S.K.; Agrawal S.C. (2003) Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soils of Jammu, India. Mycoses, 46: 226–228.

Deshmukh S.K.; Agrawal S.C.; Jain P.C. (2000) Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soils of Mysore (India). Mycoses, 43: 55–57.

Deshmukh S.K.; Mandeel Q.A.; Verekar S. A. (2008) Keratinophilic fungi from selected soils of Bahrain. Mycopathologia, 165:143–147.

Deshmukh S.K.; Verekar S. A. (2006) Keratinophilic fungi from the vicinity of meteorite crater soils of Lonar (India). Mycopathologia, 162: 303–306.

Deshmukh S.K.; Verekar S.A. (2010) Incidence of keratinophilic fungi from the soils of Vedanthangal Water Bird Sanctuary (India). Mycoses, pag. 1-4.

Domsch H.H.; Gams W.; Anderson T.H. (1993) Compendium of soil fungi. San Francisco: Editora IHW- Verlag, v. 1, 859p.

Dozie I.N.S.; Okeke C.N.; Unaeze N.C. (1994) A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. World J Microbiol Biotechnol, 10: 563-567.

Efuntoye M.O.; Fashanu, S.O. (2001) Occurrence of keratinophilic fungi and dermatophytes on domestics birds in Nigeria. Mycopathologia, 103: 87-89.

El-Gendy M.M.A. (2010) Keratinase Production by Endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 Under Solid-State Fermentation Using Rice Straw. Appl Biochem Biotechnol, 162: 780-794.

Elíades L.; Cabell M.; Voget C.; Galarza B.; Saparrat M. (2010) Screening for alkaline keratinolytic activity in fungi isolated from soils of the biosphere reserve ‘‘Parque Costero del Sur’’ (Argentina). World J Microbiol Biotechnol, 26: 2105-2111.

El-Naghy M.A.; El-Ktatny M.S.; Fadl-Allah E.M.; Nazeer W. W. (1998) Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*. Mycopathologia, 143: 77–84.

English M.P. (1969) The Saprophytic Growth of Nom-keratinophilic Fungi and Keratinized Substrata. Trans. Brit. Mycol. Soc, 48(2): 219-235.

Ergin Ç.; Kaleli I.; Çevik E.; Övet H. (2008) Investigation of keratinophilic fungi in Laodikeia's recreation warehouse. Mikrobiyoloji Bulteni, 42: 463-467.

Farag A.M.; Hassan M.A. (2004), Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. Enz. Micro. Techn, 34: 85- 93.

Figueiredo M.B. (2001) Métodos de preservação de fungos patogênicos. Biológico, 63: 73-82.

Filipello Marchisio V. (2000) Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. Revista Iberoamericana de Micologia, 17: 86-92.

Filipello Marchisio V.; Curetti D.; Cassinelli C.; Bordese C. (1994) Keratinolitic and keratinophilic fungi in the soils of Papua New Guinea. Mycopathologia, 118: 113-119.

Friedrich J.; Gradisar H.; Mandin D.; Chaumont J.P. (1999) Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. Lett. Appl. Microbiol, 28:127-130.

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

Gassesse A.; Kaul R.H.; Gashe B.A.; Mattiasson B. (2003) Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme Microbiology Technology, 32: 519-524.

Ghahfarokhi M.S.; Razafsha M.; Allameh A.; Abyaneh M.R. (2003) Inhibitory effects of aqueus onion and garlic extracts on grown and keratinase activity in *Trichophyton mentagrophytes*.

Ghosh G.R.; Bhatt S. (2000) Keratinophilic Fungi from Chilka Lake-side Soil Orissa (India). Indian Journal of Microbiology, 40: 247-254.

Gioppo N.M.R.; Moreira-Gasparin F.G.; Costa A.M.; Alexandrino A.M.; Souza C.G.M.; Peralta R.M. (2009) Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. J Ind Microbiol Biotechnol, 36:705–711.

Gradisar H.; Friedrich J.; Krizaj I.; Jerala R. (2005) Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparasion of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some know proteases. Appl. Enviro. Micro, 71: 3420-3426.

Gradisar H.; Kern S.; Friedrich J. (2000) Keratinase of *Doratomyces microsporus*. Appl. Micro. Biotech, 53: 196-200.

Gugnani H.C. (2000) Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. Revista Iberoamericana de Micologia, 17: 109-114.

Gupta R.; Beg Q.K.; Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 15-32.

Gupta R.; Rammani P. (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appl. Microbiol. & Biote, 70: 21-33.

Guzman-Chavez R.E.; Segundo-Zaragoza C.; Cervantes-Olivares R.A.; Tapia-Perez G. (2000) Presence of keratinophilic fungi with special reference to dermatophytes on the haircoat of dogs and cats in México and Nezahualcoyotl cities. Revista Latinoamericana de Microbiologia, 42: 41-44.

Hadas A.; Kautsky L. (1994) Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. Fertilizer Research, 38: 165-170.

Hedayati M.T.; Mirzahani M. (2009) Survey of keratinophilic fungi in sewage sludge from wastewater treatment plants of Mazandaran, Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health Journal, 15: 451-454.

Hosamani N.; Vidyasagar G.M. (2006) Isolation of Keratinophilic fungi from cultivated and non-cultivated soils of Bidar, India. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 8: 83-86.

Hoshino E.; Maruta K.; Wada Y.; Mori K. (1995) Hdrolysis of human horny cells by alkaline protease : morphological observation of the process. JAOCS, 72: 785-791.

Ignatova Z.; Gousterova A.; Spassov G.; Nedkov P. (1998) Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Canadian Journal of Microbiology, 45 : 217-222.

Irum F.; Suhail M.; Abro H. (2007) Keratinophilic fungi from the soil of district, Jamshoro, Sindh, Pakistan. Pakistan Journal of Botany, 39 (4): 1377-1382.

Kalil S.J.; Maugeri F.; Rodrigues M.I. (2000) Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. Pro. Biocherm, 35: 539-550.

Katiyar S.; Kushwaha R.K.S. (2000) Human hair colonizing fungi in water sediments of India. Mycopathologia, 152: 81–84.

Katiyar S.; Kushwaha R.K.S. (2002) Ivasion and biodegradation of hair by house dust fungi. International biodeterioration and biodegradation, 50(2): 89-93.

Kaul S.; Sumbali G. (1999) Keratinophilic fungi from poultry farm soils of Jammu, India. Mycologist, 14(2): 89-91.

Kaul S.; Sumbali G. (1994) Prevalence of soil-borne keratin degrading fungi in dairy farm soils of Jammu, (J & K). Geobios, 21:54-59.

Kaul S.; Sumbali G. (2000) Keratinophilic fungi from feathers of Indian poultry birds. Mycologist, 14: 148-150.

Kaul S.; Sumbali G. (1997) Keratinolysis by poultry farm soil fungi. Mycopathologia, 139: 137–140.

Khanam S.J.P.; Agrawal S.C.; Jain P.C. (2004) Keratin degrading and enzyme production ability of fungi from soil. Indian Journal of Microbiology, 44: 261-264.

Khanam S.J.P.; Jain P.C. (2002) Isolation of keratin degrading fungi from soil of Damoh (India). Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 251-254.

Kim J.S; Kluskens L.D.; Vos W.M.; Hiber R.; Van Der Oost J.(2004) Crystal structure of fervidolysin from *Fervidobacterium pennivorans*, a keratinolytic enzyme related to subtilisin. J. Mol. Biol, 335: 787-797.

Kim T.; Lei X.G. (2005) Expression and characterization of a thermostable serine protease (TfpA) from *Thermomonospora fusca* YX in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 68: 355–359.

Kise H.; Hayakawa A.; Noritomi H. (1990) Protease-catalyzed synthetic reactions and immobilization-activation of the enzymes in hidrophilic organic solvents. Journal Biotechnological, 14: 239-254.

Kitayama M. (1992) New low-temperature alkaline protease. Patent JP4271781.

Kiziewicz B.; Czeczuga B. (2002) Occurrence of keratinophilic fungus Lagenidium humanum Karling in the surface waters of Podlasie. Roczniki Akademii Medycznej w Bialymstoku (1995), 47: 194-202.

Klich M.A. (2002) Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau vöör Schimmelcultures, 116 p.

Korniłłowicz-Kowalska T.; Bohacz J. (2010) Dynamics of growth and succession of bacterial and fungal communities during composting of feather waste. Bioresource Technology, 101: 1268–1276.

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

Kunert J. (1992) Effect of reducing agents on proteolytics and keratinolytic activityof enzymes of *Microsporum gypseum*. Mycoses, 35: 343-348.

Lacaz C.S.; Porto E.; Martins J.E.C.; Heins-Vaccari E.M.; Melo N.T. (2002) Tratado de Micologia Médica, 9ª ed., São Paulo, 1104p.

Lachoria R.; Jain P.C.; Agrawal S.C. (2004) Isolation of keratinophilic fungi and related dermatophytes from the soil of Sagar (M.P.), India. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 6: 267-271.

Langeveld J.P.M.; Wang J.J.; Wield D.F.M.V.; Shih G.C.; Bossers A.; Shih J.C. (2003) Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infect cattle and sheep. 188: 1782-1789.

Latshaw J.D.; Musharaf N.; Retrum R. (1994) Processing of feather to maximize its nutririona value for poultry. Anim. Feed. Sci.technol, 47: 179-188.

Letourneau F.; Soussotte V.; Bressolier P.; Branland P.; Verneuil B. (1998) Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K.$_{1-02}$: a new isolated strain. Lett Appl Microbiol, 26: 77-80.

Li J.; Shi P.J.; Han X.I.; Meng K.; Yang P.L.; Wang Y.R.; Luo H.Y.; Wu N.F.; Yao B.; Fan Y.L. (2007) Functional expression of the keratinolytic serine protease gene sfp2 from *Streptomyces fradiae* var. k11 in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, 54: 79–86.

Liang J.D.; Han Y.F.; Zhang J.W.; Du W.; Liang Z.Q.; Li Z.Z. (2011) Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. Journal of Applied Microbiology, 110: 871–880.

Lin H.H.; Li-Jung Y.; Shann-Tzong J. (2009) Functional Expression and Characterization of Keratinase from Pseudomonas aeruginosa in Pichia pastoris. J. Agric. Food Chem., 57: 5321–5325.

Lin X.; Inglis G.D.; Yanke L.J.; Cheng K.G. (1999) Selection and characterization of feather degrading bacteria from conola meal compost. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 23: 149-153.

Lin X.; Lee C.G.; Casale E.S.; Shih J.C.H. (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3271-3275.

Lin X.; Shih J.C.H.; Swaisgood H.E. (1996) Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4273-4275.

Lopes B.G.B.; Santos A.L.S.; Bezerra C.C.F.; Wanke B.; Lazéra M.S.; Nishikawa M.M.; Mazotto A.M.; Kussumi V.M.; Haido R.M.T.; Vermelho A.B. (2008) A 25-kDa Serine Peptidase with Keratinolytic Activity Secreted by *Coccidioides immitis*. Mycopathologia, 166: 35–40.

Macedo A.J.; Silva W.O.B.D.; Gava R.; Driemeier D.; Henriques J.A.P.; Termignoni C. (2005) Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. Appl Environ Microbiol, 71: 594–596.

Maghazy S.M. (2001) Incidence of dermatophytes and cyclohexamide resistant fungi on healthy children hairs and nails in nurseries. Mycopathologia, 154: 171–175.

Maghraby T.A.; Gherbawy Y.A.M.H.; Hussein M.A. (2008) Keratinophilic fungi inhabiting floor dusts of student houses at the South Valley University in Egypt. Aerobiologia, 24:99–106.

Malviya H.K.; Rajak R.C.; Hasija S.K. (1992) Synthesis and regulation of extracellular keratinase in three fungi isolated from the grounds of a gelatin factory, Jabalpur, India. Mycopathologia, 120: 1-5.

Mandeel Q.; Nardoni S.; Mancianti F. (2009) Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. Blackwell Verlag GmbH, pag. 1-7.

Mangiaterra M.; Giusano G.; Deluca G.; Alonso J. (2000) Geohongos queratinofílicos en áreas de recreación de jardines de infantes em Rosario (Argentina). Bol Micol, 15: 101–106.

Marchisio V.F.; Curetti D.; Bordese C. (1991) Keratinolytic and keratinophylic fungi in the soils of Papua New Guinea. Mycopathologia, 115: 113-119.

Marchisio V.F.; Fusconi A.; Rigo S. (1994) Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. Mycopathologia, 127: 103-115.

Marcondes N.R.; Taira C.L.; Vandresen D.C.; Svidzinsk, T.I.E.; Kadowaki M.K.; Peralta, R.M. (2008) New Feather-Degrading Filamentous Fungi. Microbiol Ecology, 56:13-17.

Mayerhoff Z.D.V.L.; Roberto I.C.; Franco T.T. (2004), Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. Biochemical Engineering Journal, 18 (3): 217–223.

Mercantini R.; Marsella R.; Cervellati M.C. (1989) Keratonophilic fungi isolated from Antarctic soil. Mycopathologia, 106:47-52.

Mignon B.R.; Nikkels A.F.; Piérard G.E.; Losson B.J. (1998) The in vitro and in vivo Production of a 31.5-kD Keratinolytic Subtilase from *Microsporum canis* and the Clinical Status in Naturally Infected Cats. Dermatology, 196:438–441.

Minami N. M. Extração líquido-líquido aplicada a separação e purificação da amiloglicosidase. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Mitsuiki S.; Ichikawa M.; Oka T.; Sakai M.; Moriyama Y.; Sameshima Y.; Goto M.; Furukawa K. (2004) Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. Enzyme and Microbial Technology, 34: 482-489.

Moallaei H.; Faridech Z.; Gérald L.; Bertrand B. (2006) Partial purification and characterization of a 37 kDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. Mycopathologia, 161: 369-375.

Moallaei H.; Zaini F.; Pihet M.; Mahmoudi M.; Hashemi J. (2006) Isolation of keratinophilic fungi from soil samples of forests and farm yards. Iranian Journal of Public Health, 35: 62-69.

Monod M.; Paris S.; Sanglard D.; Jaton-Ogay K.; Bille J.; Latgé J.P. (1993) Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigates*. Infection and immunity, 61: 4099-4104.

Moreira F.G.; Souza C.G.M.; Costa M.A.F.; Reis S.; Peralta R.M. (2007) Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus *Mirothecium verrucaria*. Mycopathologia, 163: 153-160.

Moreira-Gasparin F.G.; Souza C.G.M.; Costa A.M.; Alexandrino A.M.; Bracht C.K.; Boer C.G.; Peralta R.M. (2009) Purification and characterization of an efficient

poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. Biodegradation, 20: 727–736.

Muhsin T.M.; Aubaid A.H. (2000) Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. Mycopathologia, 150: 121–125.

Muhsin T.M.; Hadi R.B. (2001) Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. Mycopathologia, 104:185-189.

Muhsin T.M.; Salih T.H. (2000) Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. Mycopathologia, 150: 49–52.

Musahl C.; Aguzzi A. (2000) Prions. In: Lederberg J. Encyclopedia of microbiology, 2nd. Edn. Academic, San Diego, pp. 809-823.

Nakasone K.K.; Peterson S.W.; Jong S.C. (2004) Maintenance and preservation of cultures.

Nam G.W.; Lee D.W.; Lee H.S.; Lee N.J.; Kim B.C.; Choe E.A. (2002) Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe. Arch Microbiol, 178: 538-547.

Negi M.R.; Tsuboi R.; Matsui T.; Ogawa H. (1994) Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. J. Invest. Dermatol, 83: 32-36.

Noronha E.F.; Lima B.D.; Sá C.M.; Felix C.R. (2002) Heterologous production of *Aspergillus fumigates* keratinase in *Pichia pastoris*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18: 563-568.

Odetallah N.H.; Wang J.J.; Garlich J.D.; Shih J.C.H. (2003) Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. Poult Sci, 82: 664–670.

Oliveira G.G.G.; Silva D.P.; Roberto I.C.; Vitolo M.; Pessoa Jr. A. (2001) Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistema de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 37(2): 176-187.

Onifade A.A.; Al-Sane N.A.; Al-Musallam A.A.; Al-Zarban S. (1998) 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. Bioress. Techno, 66: 1-11.

Pancera S.M.; Silva L.H.M.; Loh W.; Itri R.; Pessoa Jr. A. e Petri D.F.S. (2002) The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. Colloids and Surfaces B, 26 (4): 291-300.

Papadopoulos M.C. (1989) Effects of processing on high protein feedstuffs: a review. Boil. Wastes, 29: 123-138.

Papadopoulos M.C.; El-Boushy A.R.; Roodbeen A.E.; Ketelaars E.H. (1986) Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. Anim. Feed Sci. Technol, 14: 279-290.

Papine R.; Mancianti F.; Grassotti G.; Cardini G. (1998) Survey of keratinophylic fungi isolated from city park soils of Pisa, Italy. Mycopathologia, 143:17-23.

Parihar P.; Kushwaha R.K.S. (2001) A survey of keratinophilic fungi as a tool for hen feather utilization. Mycoscience, 41: 645-649.

Pillai P.; Archana G. (2008) Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. Appl Microbiol Biotechnol, 78:643–650.

Pillai P.; Mandge S.; Archana G. (2011) Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. Process Biochemistry, 46: 1110–1117.

Pitt J.I. (1991) A laboratory Guide to Common Penicillium Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing, North Wales, 187 p.

Prakash P.; Jayalakshmi S.K.; Sreeramulu K. (2010) Production of Keratinase by Free and Immobilized Cells of *Bacillus halodurans* Strain PPKS-2: Partial Characterization and Its Application in Feather Degradation and Dehairing of the Goat Skin. Appl Biochem Biotechnol, 160:1909–1920.

Puri S.; Beg Q.K; Guata R. (2002) Optimization of an alkaline protease production from *Bacillus* sp using response surface methodology. Curr. Microbiol, 44: 286-290.

Rai S.K.; Mukherjee A.K. (2011) Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline-keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. Biochemical Engineering Journal, 54: 47–56.

Rai S.K.; Roy J.K.; Mukherje A.K. (2010) Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. nov. AS-S24-II. Appl Microbiol Biotechnol, 85: 1437–1450.

Rao M.B.; Tanksale A.M.; Chatge M.S.; Deshpande V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev, 62: 597-635.

Raper K.B.; Fennel DI (1977) The genus Aspergillus. Robert & Krieger, Florida, 686 p.

Rashid A.; Hodgins M.B.; Richardson M.D. (1996) Na in vitro model of dermatophyte invasion of the human hair follicle. J. Med. Vet. Mycol, 34: 37-42.

Ray T.L.; Payne C.D. (1990) Comparative production and rapid prurification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infection and Immunity, 58: 508-514.

Riffel A.; Lucas F.; Heeb P.; Brandelli A. (2003a) Characterization of new keratinolytic bacterium that completely native feather keratin. Arch. Microbiol, 179: 258-265.

Riffel A.; Ortolon A.; Brandelli A. (2003b) De-hairing activity of extracellular protease produced by keratinolytic bacteria. J. Technol. Biotechnol, 78: 855-859.

Rissen S.; Antranikian G. (2001) Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel termophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. Extremophiles, 5: 399-408.

Rojanavanichi V.; Yoshiike T.; Tsuboi R.; Takamori K.; Ogawa H. (1990) Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from Hendersonlula torulloidea. Infection and Immunity, 58: 2856-28610.

Romnani P.; Gupta R. (2004), Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using methods involving response surface methodology. Biotech. Appl. Bioche, 40: 191-196.

Saber W.I.A.; El-Metwally M.M.; El-Hersh M.S. (2010) Keratinize production and biodegradation of some keratinous wastes by *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus nidulans*. Res J Microbiol, 5(1): 21-35.

Sabino R.; Verissímo C.; Brandão J.; Alves C.; Alves P.; Parada H.; Rosado L. (2008) Keratinophilic Fungi: a microscopic approach by in vitro hair perforation Analysis. Microsc Microanal, 14 (3): 115-118.

Said S.; Pietro R.CL.R. (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, 413 p.

Sala L.; Cerveira G.P.; Brandelli A.; Moraes C.C.; Kalil S.J. (2011) Partição de Queratinase por Sistema Aquoso Bifásico. Simpósio Nacional de Bioprocessos-SINAFERM, Caixias do Sul/RS.

Sales M.A.R.; Cavalcanti M.T.H.; Lima Filho J.L.; Souza-Motta C.M.; Porto A.L.F. (2008) Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. Pes Agrop Bras, 43: 1-4.

Sales M.A.R.; Campos R.A.L.; Sousa M.A.; Souza-Motta C.M.; Cavalcanti M.T.H.; Lima Filho J.L.; Porto A.L.F. (2007) Screening *Aspergillus* spp. for degradation in vitro of poultry feather. Simpósio Nacional de Bioprocessos-SINAFERM, Curitiba.

Sangali S.; Brandelli A. (2000) Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. Appl. Biochem. Biotechnol, 87: 17-24.

Santos R.M.D.B.; Firmino A.A.P.; De Sa C.M.; Felix C.R. (1996) Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Freseninus. Curre. Micro, 33: 364-370.

Sarubbo L.A. (2000) Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com colunas de discos perfurados rotativos. Campinas. Tese de doutorado- Engenharia Química- Universidade de Campinas.

Saxena P.; Kumar A.; Shrivastava J.N. (2004) Diversity of Keratinophilic Mycoflora in the Soil of Agra (India). Folia Microbiol, 49: 430-434.

Saxena P.; Kumar A.; Shrivastava J.N. (2005) Keratinophilic fungi: A microbial way to manage poultry waste feathers. Indian Journal of Microbiology, 45: 151-154.

Schrooyen P.M.M.; Dijkstra P.J.; Oberthur R.C.; Bantjes A.; Feijen J. (2001) Partially carboxythylated feather keratin. 2. Thermal and mechanical properties of films. Journal of agricultural and Food Chemystri, 49: 221-230.

Scott J.A.; Untereiner W.A. (2004) Determination of keratin degradation by fungi using keratina azure. Medical Mucology, 42: 239-246.

Shadzi S.; Chadeganipour M.; Alimoradi M. (2002) Isolation of keratinophilic fungi from elementary schools and public parks in Isfahan, Iran. Mycoses, 45: 496-499.

Sharaf E.F.; Khalil N.M. (2011) Keratinolytic activity of purified alkaline keratinize produced by *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) and its amino acids profile. Saudi Journal of Biological Sciences, 18: 117–121.

Shrivastava J.N.; Satsangi G.P.; Kumar A. (2008) Incidence of keratinophilic fungi in waterlogged condition of paddy soil. Journal of Environmental Biology, 29: 125-126.

Silva V.J.S. (2009) Detecção enzimática de culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM. Monografia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

Singh C.J. (2011) Extracellular protease expression in *Microsporum gypseum* complex, its regulation and keratinolytic potential. Mycoses, 54: 183–188.

Singh C.J. (1997) Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simmi* and its role in keratin degradation. Mycopathologia, 137: 13-16.

Singh C.J. (1999) Exocellular protease of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. Mycopathologia, 143: 147-150.

Singh C.J. (2002) Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential bioremediation of keratinic wastes. Mycopathologia, 156: 151-156.

Singh C.J.; Singh B.G. (1995) Characterization of extracellular proteolytic enzyme of *Chrysosporium tropicum* CF34 and its role in keratin degradation. Industrial Journal Microbiological, 35: 311-315.

Singh I.; Kushwaha R.K.S.; Parihar P. (2009) Keratinophilic fungi in soil of potted plants of indoor environments in Kanpur, India, and their proteolytic ability. Mycoscience, 50:303-307.

Singh I.; Mishra A.; Kushwaha R.K.S. (2009) Dermatophytes, related keratinophilic and opportunistic fungi in indoor dust of houses and hospitals. Indian Journal of Medical Microbiology, 27(3): 242-246.

Sohnle P.G.; Wagner D.K. (2000) Fungal infections, cutaneous. In: Lederberg J. (ed) Encyclopedia of microbiology, 2nd.edn. Academic, San Diego, pp. 451-459.

Stark C.R.; Spencer B.E.; Shih J.C.H.; Chewning C.G.; Wang J.J. (2009) Evaluation of keratinase stability in pelleted broiler diets. J. Appl. Poult. Res, 18: 30–33.

Swalley S.E. Fulghum J.R. Chambers S.P. (2006) Screening factors affecting a response in soluble protein expression: formalized approach using design of experiments. A. Bioch, 351: 122– 127.

Takami H.; Nakamura F.; Aono R.; Hirokoshi K. (1992) Degradation of human hair by a thermostable alkaline proteinase from *Bacillus* sp. no. AH 101. Biosci. Biotechnol. Biochem, 56: 1667-1669.

Takami H.; Nogi Y.; Horikoshi K. (1999) Reidentification of the keratinase-producing facultatively alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. Extremophiles, 3: 293-296.

Thanikavelan P.; Rao J.R.; Nair B.U.; Ramasami T. (2004) Progress andrecent trends in biotechnological methods for leather processing. Trends Biotechnol, 22: 181–186.

Thys R.C.S.; Lucas F.S.; Riffel A.; Heeb P.; Brandelli A. (2004) Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. Lett Appl Microbiol, 39: 181-186.

Tiwary E.; Gupta R. (2010) Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides. Bioresource Technology, 101: 6103–6110.

Ulfig K. (2003) Studies of keratinolytic and keratonophilic fungi in sewage sludge by means of a multi-temperature hair baiting method. Polish Journal of Environmental Studies, 12: 461-466.

Ulfig K.; Guarro J.; Cano J.; Gené J.; Vidal P.; Fegueras M.J.; Lukasik W. (1997) The occurrence of keratinolytic fungi in sediments of the river Tordera (Spain). FEEMS Microbiol Ecol, 22:111-117.

Vermelho A.B.; Mazotto A.M.; Melo A.C.N.; Vieira F.H.C.; Duarte T.R. ; Macrae A.; Nishikawa M .M.; Silva, E.P. (2010) Bom Identification of a *Candida parapsilosis* Strain Producing Extracellular Serine Peptidase with Keratinolytic Activity. Mycopathologia, 169: 57–65.

Veselá M.; Friedrich J. (2009) Amino Acid and Soluble Protein Cocktail from Waste Keratin Hydrolysed by a Fungal Keratinase of *Paecilomyces marquandii*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 84-90.

Vidyasagar G.M.; Hosmani N.; Shivkumar D. (2005) Keratinophilic fungi isolated from hospital dust and soils of public places at Gulbarga, India. Mycophatologia, 159: 13-21.

Vignardet C.; Guillaume Y.C.; Mechel L.; Friedrich J.; Millet J. (2001) Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. Inter. J. Pharma, 224: 115-122.

Vignardet C.; Guillaume Y.C; Friedrich J.; Millet, J. (1999), A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrates. Inter. J. of Pharma, 191: 95-102.

Wang J.J.; Swaisgood H.E.; Shih J.C.H. (2003) Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. Enzyme and Microbial Technology, 32: 812-819.

Wang X.; Parsons C.M. (1997) Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals. Poultry Science, 76: 491-496.

Wawrzkiewicz K.; Wilsk T.; Lobarewski J. (1991) Sceening the keratinolytic activity of dermatophytes in vitro. Mycopathologia, 114: 1-8.

Weitzman I.; Summerbell R.C. (1995) The dermatophytes. Clin. Microbiol., Rev. 8: 240-259.

Ya-Peng C.; Fu-hong X.; Jing Y.; Jing-Hua L.; Shi-Jun Q. (2007) Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. Journal of Environmental Sciences, 19:1125–1128.

Yu R.J.; Harmon S.F.; Grappel S.F.; Blank F. (1971) Twocele-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. Investigation Dermatologyca, v. 56, p. 27-32, 1971.

Yue X.Y.; Zhang B.; Jiang D.D.; Liu Y.J.; Niu T.G. (2011) Separation and purification of a keratinase as pesticide against root-knot nematodes. World J Microbiol Biotechnol, DOI 10.1007/s11274-011-0680-z.

Zaghloul T.I.; Embaby A.M.; Elmahdy A.R. (2011) Biodegradation of chicken feathers waste directed by *Bacillus subtilis* recombinant cells: Scaling up in a laboratory scale fermentor. Bioresource Technology, 102: 2387–2393.

Zaki S.M.; Mikami Y.; El-Din A.A.K.;Youssef Y.A. (2005) Keratinophilic fungi recovered from muddy soil in Cairo vicinities, Egypt. Mycopathologia, 160: 245–251.