



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

Produção e purificação de queratinases empregando micropartículas de magnetita-queratina

Layla Carvalho Mahnke

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento

RECIFE

2015



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

Produção e purificação de queratinases empregando micropartículas de magnetita-queratina

Layla Carvalho Mahnke

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Aline Elesbão do Nascimento

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mahnke, Layla Carvalho

Produção e purificação de queratinases empregando micropartículas de magnetita-queratina / Layla Carvalho Mahnke. – Recife: O Autor, 2015.

32 f.: il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, Aline Elesbão do Nascimento

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Enzimas 2. Enzimas de fungos I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Nascimento, Aline Elesbão do (coorient.) III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-313

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES EMPREGANDO MICROPARTÍCULAS DE MAGNETITA-QUERATINA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito final para a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica.

Data de Aprovação: 30/03/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior – (Orientador/UFPE)

Prof. Dra. Marília Ribeiro Sales Cadena – (UFRPE)

Dra. Mariana Paola Cabrera – (UFPE)

*Dedico a Sri Sathya Sai Baba
por toda luz e sabedoria e as
pessoas que fazem minha
vida ter um sentido todo
especial. Om sai ram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar durante a minha jornada e me fortalecer.

A minha família e ao meu noivo, por acreditar em mim sempre.

Ao Professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela paciência, orientação e por contribuir para o meu aperfeiçoamento profissional.

À Professora Dra. Aline Elesbão do Nascimento, por estar presente em minha jornada profissional desde a graduação, e por engrandecer este trabalho.

À Professora Galba Maria Campos Takaki, por abrir mais uma vez as portas de seu laboratório.

À Secretária da Pós-Graduação Adenilda, pela amizade e por nos guiar em toda a parte burocrática da pós-graduação.

A minha banca examinadora: Marília Cadena e Mariana Cabrera pelas contribuições para o melhoramento desta dissertação.

Aos meus amigos do laboratório: Keissy Vanderley de Santana, Luiza Rayanna Amorim de Lima, Gabriela Ayres Fragoso Nascimento, Lylyan Fragoso Pimentel, Anna Lívia Linnard Matos, e José Henrique Edimilson Souza Freitas, que me apoiaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Laboratórios LIKA - Imunopatologia Keizo Asami e NPCIAMB - Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia pela estrutura que tornou o desenvolvimento deste trabalho possível.

À CAPES pelo investimento na pesquisa e apoio financeiro.

À Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Queratinases (EC: 3.4.99) são amplamente utilizadas na indústria durante o processamento do couro, na produção de detergentes, assim como aplicadas na medicina e cosmética para remoção de calosidades. Elas são produzidas por diversos microrganismos, entre eles, o gênero *Cunninghamella* se mostrou promissor entre os fungos filamentosos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo produzir, quantificar, caracterizar e purificar as queratinases obtidas pelos fungos *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 isolados do solo da Caatinga. Os microrganismos foram mantidos em meio sólido mineral específico contendo queratina extraída de penas de ave como única fonte de Carbono e Nitrogênio por 15 dias e usado posteriormente na fermentação submersa para a determinação quantitativa da produção enzimática. O cultivo foi realizado durante 15 dias, a 28°C em agitador orbital a 150 rpm. A cada três dias foram retiradas alíquotas para avaliar a concentração proteica, atividade queratinolítica e variação do pH durante a produção. Os isolados apresentaram uma elevada atividade específica de 84,1 U/mg para *C. echinulata* UCP 1299 no 9º dia de cultivo e de 96,2 U/mg para *C. phaeospora* UCP 1303 no 6º dia de cultivo, onde ambos extratos brutos foram utilizados para a caracterização parcial da enzima. As queratinases da *C. echinulata* UCP 1299 e *C. phaeospora* UCP 1303 apresentaram valores com maior atividade no pH e temperatura de 8,0 e 28°C – 45°C; 9,0 e 35°C – 55°C, respectivamente. As queratinases, com massa molecular de aproximadamente 35 KDa foram purificadas por cromatografia de afinidade empregando partículas do composto magnetita-queratina obtendo um fator de purificação de 37,4% e 44,1% para *C. echinulata* UCP 1299 e *C. phaeospora* UCP 1303 respectivamente. Deste modo, ambos os microrganismos podem ser utilizados para produzir queratinase que pode ser purificada por afinidade utilizando a queratina magnetizada.

Palavras-chave: Queratinase; *Cunninghamella*; Purificação; Magnetita-queratina.

ABSTRACT

Keratinases (EC: 3.4.99) is widely used in the industry for leather processing, detergent production, so as applied in medicine and cosmetics for removing calluses. Various microorganisms, including the genus *Cunninghamella*, have shown to produce these enzymes. Thus, this study aimed to produce, quantify, characterize and purify keratinases obtained by fungi *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 and *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 isolated from soil of Caatinga (Pernambuco, Brazil). The microorganisms were maintain on solid medium, containing keratin bird feathers as the sole source of carbon and nitrogen, for 15 days and subsequently used in submerged fermentation for the enzyme production. Cultures it grown for 15 days at 28°C in an orbital shaker at 150 rpm. Every three days aliquots it collected to assess the protein concentration, keratinase activity and pH variation during production. The isolates showed a high specific activity of 84.1 U / mg for *C. echinulata* UCP in 1299 on the 9th day of cultivation and 96.2 U / mg for *C. phaeospora* UCP 1303 on the 6th day of cultivation, where both crude extracts were used for partial characterization of the enzyme. Keratinases from *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeospora* UCP 1303 showed best activity in pH and temperature values of 8.0 and 28°C-45°C; 9.0 and 35°C-55°C, respectively. The keratinases, with a molecular mass of approximately 35 kDa were purify by affinity chromatography using particles of a composite magnetite-keratin obtaining a purification factor of 37.4% and 44.1% for *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeospora* UCP 1303 respectively. Thus, both microorganisms can be used to produce keratinase can be affinity purified using magnetized keratin.

Keywords: Keratinase; *Cunninghamella*; Purification; Magnetite-keratin.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<u>Figura 1: Principais importadores de carne de frango previsto para 2013 (USDA, 2013)</u>	<u>16</u>
<u>Figura 2: Consumo versus produção de carne de frango no Brasil(UBABEF)</u>	<u>17</u>
<u>Figura 3: Descarte irregular de penas (Portal prefeitura de Maceió, 2014)</u>	<u>18</u>
<u>Figura 4: Ilustração estrutural da queratina(Portal de estudos em química, 2014)</u>	<u>20</u>
<u>Figura 5: Aspecto macroscópico de <i>Cunninghamella</i> sp. A – Microrganismo em placa; B - Microrganismo aumentado em lupa (MAHNKE, 2015)</u>	<u>28</u>
<u>Figura 6: Vegetação típica do bioma Caatinga(Comunidade Banco do Planeta, 2014)</u>	<u>28</u>

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<u>Figure 1. Change of pH during the production of keratinase by <i>C. echinulata</i> UCP 1299 and <i>C. phaeospora</i> UCP 1303</u>	<u>45</u>
<u>Figure 2. Displays of the specific activity of the isolates tested</u>	<u>46</u>
<u>Figure 3. Effect of pH on the keratinase activity from <i>C. echinulata</i> UCP 1299 and <i>C. phaeospora</i> UCP</u>	<u>1303</u>
<u>47</u>	
<u>Figure 4. Effect of the temperature in keratinase activity of <i>C. echinulata</i> UCP 1299 and <i>C. phaeospora</i> UCP 1303</u>	<u>47</u>
<u>Figure 5. Thermostability of keratinase. A - <i>C. echinulata</i> UCP 1299; B - <i>C. phaeospora</i> UCP 1303</u>	<u>48</u>
<u>Figure 6. SDS-Page electrophoresis of the protein fractions collected from <i>C. echinulata</i> and <i>C. phaeospora</i> keratinase purification. (1) <i>C. echinulata</i> UCP 1299 purified sample; (2) <i>C. echinulata</i> UCP 1299 acetone precipitated sample; (3) <i>C. phaeospora</i> UCP 1303 purified sample; (4) <i>C. phaeospora</i> UCP 1303 acetone precipitated sample</u>	<u>49</u>

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Fungos produtores de queratinase (Adaptado de KUMAR; KUSHWAHA, 2014)26

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Purification patterns of keratinase obtained from *C. echinulata* UCP 129949

Table 2. Purification patterns of keratinase obtained from *C. phaeospora* UCP 1303 49

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	VIII
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO	VIII
LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	IX
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO	IX
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS	14
CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 INDÚSTRIAS AVÍCOLAS	16
3.1.1 INDÚSTRIA AVÍCOLA NO BRASIL	17
3.2 PENAS DE FRANGO: CARACTERÍSTICAS E APROVEITAMENTO	18
3.3 QUERATINA	19
3.3.1 PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA QUERATINA	20
3.4 QUERATINASE	21
3.4.1 CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS DE AÇÃO	21
3.4.2 PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES	22

3.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA QUERATINASE	23
3.5.1 APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E MÉDICA	24
3.5.2 APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DO DETERGENTE	24
3.5.3 APLICAÇÃO NO PROCESSAMENTO E REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS	24
3.6 FUNGOS PRODUTORES DE QUERATINASE	25
3.6.1 GÊNERO <i>CUNNINGHAMELLA</i>	27
3.8 BIOMA CAATINGA	28
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
<u>CAPÍTULO II: PRODUCTION AND PURIFICATION OF KERATINASE FROM <i>Cunninghamella echinulata</i> and <i>Cunninghamella phaeospora</i>.</u>	41
<u>ABSTRACT</u>	42
<u>INTRODUCTION</u>	42
<u>MATERIALS AND METHODS</u>	43
<u>RESULTS</u>	45
<u>DISCUSSION</u>	50
<u>CONCLUSION</u>	51
<u>ACKNOWLEDGEMENTS</u>	51
<u>REFERENCES</u>	51
5 CONCLUSÃO	54
<u>ANEXOS OBRIGATÓRIOS</u>	55

1 INTRODUÇÃO

No Brasil a carne de frango é considerada um produto com crescente aumento nas exportações do complexo de proteína animal, se tornando atualmente o terceiro maior produtor mundial de frangos, precedido pelos Estados Unidos e pela China (CORTEZI, 2009; AGRAWAL e DALAL, 2015).

O crescente consumo mundial da carne de frango e o aumento na produção da mesma, consequentemente resultou em uma maior demanda de resíduos gerados pela indústria avícola (CORTEZI, 2009; MOUSAVI et al., 2013), tais como as penas que se caracterizam por serem o material queratinoso mais abundante na natureza. Entretanto, são estudadas possíveis aplicações biotecnológicas para a reaproveitamento destes resíduos que no ambiente se acumulam em forma de lixo após o processamento das aves, sofrendo lenta degradação, originando compostos sulfurosos de odor desagradável, acarretando em um problema ambiental (ONIFADE et al., 1998; MORE et al., 2013; HAGGRAN, 2014).

As penas se caracterizam por possuir 87% de sua composição a proteína queratina (BUREAU et al., 1999; RIFFEL et al., 2003). A queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns, por apresentar pontes dissulfeto e de hidrogênio em sua estrutura, e interações hidrofóbicas (RIFFEL et al., 2007; CROWTHER e A'BEAR, 2012; EL-AYOUTY et al., 2012). Esta proteína é degradada por enzimas específicas, denominadas queratinases, que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina (SAID e PIETRO, 2004).

As queratinases podem ser usadas no processamento biotecnológico de penas atuando na bioconversão de poluidores para ração rica em nutrientes por possuírem aminoácidos essenciais como glicina e leucina (SAID e PIETRO, 2004; JAQUADI et al., 2013), assim como também têm aplicação na medicina e indústria farmacêutica, podendo ser empregada na eliminação da queratina nos casos de acne ou psoríase e na eliminação de calos humanos (HAN et al., 2012).

A maioria das queratinases possuem características comuns, apesar de suas diferentes origens. Os fungos queratinolíticos são capazes de utilizar a queratina como

substrato para a produção de enzimas proteolíticas (ONIFADE et al., 1998; RIFFEL, 2006; ANITHA e PALANIVELU, 2013).

Os fungos possuem a capacidade de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica se deve a produção de uma grande quantidade de enzimas capazes de degradar uma série de compostos e o fato de possuírem hifas que penetram o substrato com facilidade (RIFFEL, 2006; NAYAKA e MORE, 2013). Entre os fungos produtores de enzimas, a classe que mais se destaca na aplicação industrial são os Zygomycetes devido a ampla capacidade de produzir metabólitos.

Como pode ser observada, há uma crescente preocupação com o aumento da produtividade de carne de frango devido ao crescimento populacional, consequentemente levando ao aumento dos resíduos gerados pela indústria avícola impactando o meio ambiente. Desta forma, crescem as pesquisas em busca do surgimento de novas tecnologias na utilização desses resíduos em matéria prima, como o estudo de microrganismos degradadores de queratina, agregando a esses resíduos grande valor econômico e beneficiando o meio ambiente.

Assim, este trabalho teve como foco a produção de queratinases por fungos isolados do solo da Caatinga, PE, Brasil; a quantificação e purificação das mesmas por afinidade utilizando micropartículas magnetita-queratina, otimizando a atividade catalítica para posteriormente uma possível aplicação.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir, quantificar, caracterizar e purificar as queratinases obtidas pelos fungos *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Cunninghamella phaeosphora* UCP 1303 isolados do solo da Caatinga, Pernambuco, Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir queratinase por *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 e *Cunninghamella phaeosphora* UCP 1303 a partir do cultivo submerso;
- Detectar atividade queratinolítica em meio líquido;
- Identificar a melhor atividade enzimática correlacionada ao tempo de cultivo dos microrganismos;
- Verificar a modificação do pH durante o cultivo submerso;
- Caracterizar as queratinases obtidas dos fungos do gênero *Cunninghamella* frente a influência do pH e temperatura na atividade enzimática e a termoestabilidade;
- Purificar as queratinases por afinidade utilizando suporte de micropartículas magnetita-queratina;
- Determinar o peso molecular das queratinases purificadas;
- Comparar as queratinases produzidas por *C. echinulata* UCP 1299 e *C. phaeosphora* UCP 1303 frente a atividade queratinolítica e a caracterização da enzima.

CAPÍTULO I:
Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INDÚSTRIAS AVÍCOLAS

Dentre o setor agropecuário, a avicultura se destaca por possuir o maior e mais avançado acervo tecnológico transformando-se nas últimas quatro décadas em um complexo econômico. Há um crescente aumento na exigência quanto a capacitação profissional e ao cumprimento da legislação ambiental na cadeia produtiva do frango (KUMAR e KUSHWAHA, 2014). O incentivo ao consumo de carne de frango é vantajoso pela característica deste tipo de alimento, pois, é resultante de uma produção intensiva (FERNANDES; PANIAGO; LIMA, 1989).

O consumo mundial de carne de frango aumentou gradualmente, no período de 2000 a 2011, respectivamente: 49.360 a 59.74 mil toneladas. Os países considerados os maiores consumidores são os Estados Unidos seguidos pelo Japão e China. Consequentemente, o aumento no consumo resultou em um aumento gradativo de importações como relata a Figura 1.



Figura 1: Principais importadores de carne de frango previsto para 2013 (USDA, 2013)

3.1.1 INDÚSTRIA AVÍCOLA NO BRASIL

O frango entrou definitivamente para o cardápio do brasileiro e já faz parte da dieta alimentar no país. A carne de frango é um dos produtos mais destacados nas exportações do complexo de proteína animal do Brasil. Para atender de forma mais efetiva o consumidor exigente, há o contínuo aperfeiçoamento da indústria avícola (SINGH, 2014; HAN et al., 2012).

Em dez anos, a produção de carne de frango no Brasil mais que dobrou: saltou de 5,9 milhões de toneladas em 2000 para 12,1 milhões de toneladas em 2010. A avicultura brasileira progrediu nos últimos 25 anos e hoje é o terceiro maior produtor mundial de frangos (CORTEZI, 2009; SIVAKUR et al., 2013). Os maiores importadores de carne de frango são: Rússia, Japão, União Europeia, Arábia Saudita, África do Sul, Emirados Árabes e Hong Kong.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que cada pessoa consuma no mínimo de 13,5 quilos de carne branca por ano, o brasileiro consome 40,8 quilos, segundo estimativas do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).

O aumento na produção de carne de frango é diretamente proporcional as exportações, permitindo o sustento do crescente consumo individual (CORTEZI, 2009) como relatado na Figura 2 abaixo.

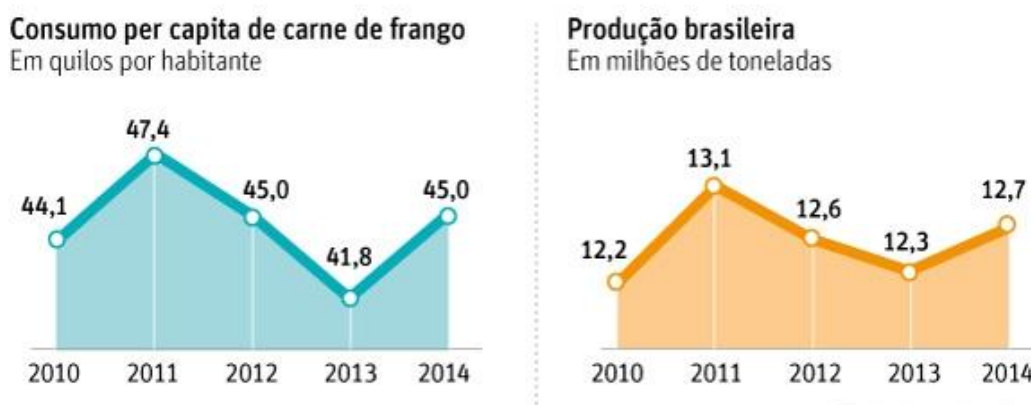


Figura 2: Consumo versus produção de carne de frango no Brasil (UBABEF)

Em relação à produção nos estados do Brasil, o estado do Paraná é o maior produtor de frango, seguido de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. Porém,

estes quatro estados, que são os produtores tradicionais do Brasil, têm participação decrescente, devido à expansão da avicultura pelo Centro-Oeste e outras regiões do Brasil. (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, 2014).

Logo, o aumento do consumo e da exportação da carne de frango é diretamente proporcional ao aumento da produção da mesma e conseqüentemente, da geração de resíduo pela indústria avícola. Ela é responsável por produzir uma grande quantidade de penas com potencial para causar impacto ambiental, pois se acumulam em forma de lixo após o processamento das aves para consumo humano (ONIFADE et al., 1998). Uma alternativa para diminuir o impacto ambiental é o desenvolvimento de processos biotecnológicos para a utilização deste resíduo. Deve-se ressaltar que a utilização de restos de penas constitui uma solução ecológica, evitando seu acúmulo no meio ambiente e o desenvolvimento de vários tipos de patógenos (SINGH, 1999).

3.2 PENAS DE FRANGO: CARACTERÍSTICAS E APROVEITAMENTO

Penas, o material queratinoso mais abundante na natureza são importantes para o isolamento térmico, locomoção (voo) e conformação estrutural para os pássaros. As penas constituem cerca de 10% do peso total de frangos, alcançando valores superiores como subproduto da indústria de aves. Esse material excessivo é na maioria das vezes descartado, sendo um material de difícil degradação que pode se tornar um problema ambiental como demonstrado na Figura 3 abaixo (BALAKUMAR et al., 2013).



Figura 3: Descarte irregular de penas (Portal da prefeitura de Maceió, 2014)

ZERDANI et al. (2004) caracterizaram a composição química dos resíduos de penas e observaram que o conteúdo de proteínas é alto comparado com outros resíduos animais (valor médio de 81%). Com base nessa composição química, eles concluíram que as penas residuais constituem um meio para o cultivo de microrganismos decompositores (RIFFEL et al., 2003; MOUSAVI et al., 2013).

As penas armazenam uma grande quantidade de aminoácidos essenciais como serina, cisteína e prolina, transformando-a assim em matéria prima do processo biotecnológico para o melhoramento da ração animal, fertilizantes nitrogenados, biofilmes ecológicos (LIN et al. 1997; CORTEZI, 2009), assim como o seu processamento químico oferece vantagens ao enriquecimento proteico das penas pela própria biomassa microbiana (ONIFADE et al., 1998; SAIBABU et al., 2013).

Na produção de enzimas industriais, cerca de 30 - 40% do custo é voltado ao substrato do microrganismo produtor. Por isso, uma efetiva redução no custo seria o uso das penas como substrato para o crescimento microbiano, uma matéria prima facilmente disponível e de baixo custo, oferecendo uma possível tecnologia para a obtenção de enzimas proteolíticas (GESSESSE et al., 2003; RAJPUT e GUPTA, 2013), resultando em uma alternativa viável ao descarte desses resíduos resolvendo a problemática do meio ambiente (BERNAL et al., 2003; MANJU, 2013).

3.3 QUERATINA

A queratina é a principal constituinte de unhas, chifres, cabelo, lã e pele de mamíferos, bico e penas de aves. É uma macromolécula com funções estruturais e protetoras. Suas cadeias polipeptídicas estão unidas fortemente umas às outras formando as cadeias α -hélice como observado na Figura 4. As principais características que mantêm a estrutura filamentosa da queratina estável é o elevado grau de ligações covalentes, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (RIFFEL, 2006; CORTEZI, 2009; SANTANA, 2011; CROWTHER e A'BEAR, 2012). Esta proteína é de difícil degradação por enzimas proteolíticas comuns e é insolúvel em água (SIVAKUR et al., 2013).

Segundo Santana (2011) a queratina é insolúvel em água, mas também pode apresentar um elevado grau de insolubilidade em determinados solventes orgânicos, além de ser resistente a ácidos e álcalis diluídos. A quebra desta proteína por ácidos libera aminoácidos como histidina, lisina, arginina, cistina e tirosina (EVERSON, 1968).

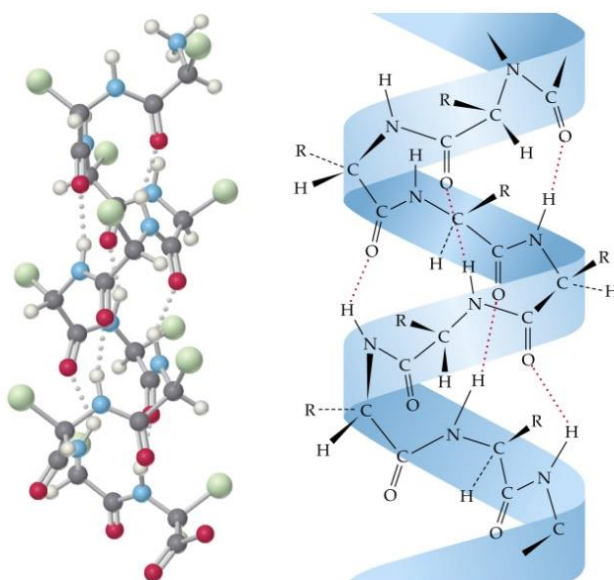


Figura 4: Ilustração estrutural da queratina (Portal de estudos em química, 2014)

Apesar da queratina apresentar uma estabilidade incomum, naturalmente as penas não se acumulam na natureza devido a presença de decompositores no meio ambiente (ONIFADE et al., 1998; SANTANA, 2011).

3.3.1 PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA QUERATINA

A hidrólise da queratina é um evento basicamente proteolítico. Apesar de grande diversidade de características entre as queratinases, a sua ação de hidrólise da queratina tem sido evidenciada. Entretanto, não está elucidado o processo e o entendimento do mecanismo de ação das queratinases (ONIFADE et al., 1998; RIFFEL, 2006; SAIBAU et al., 2013).

Entre os processos de degradação da queratina, os fungos produtores de micélio ou fungos filamentosos possuem um método exclusivo de degradação mecânica, que é resultante da pressão ou penetração do micélio no substrato queratinoso. Acredita-se que o processo mecânico ocorre antes da hidrólise enzimática, uma vez que observou-se a degradação da queratina antes mesmo de detectar atividade enzimática (ONIFADE et al., 1998; RIFFEL, 2006; SANCHEZ et al., 2012).

3.4 QUERATINASE

Protease é uma classe de enzimas com ampla aplicação biotecnológica, entre elas, as queratinases são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas da queratina (SANTANA, 2011). Na atualidade, as pesquisas envolvendo queratinase tem chamado a atenção devido a sua potencial aplicação industrial, setor convencional das proteases (GUPTA; RAMMANI, 2006; BRANDELLI et al., 2010; TIWARY; GUPTA, 2010).

3.4.1 CARACTERIZAÇÃO E MECANISMOS DE AÇÃO

As queratinases constituem um grupo de proteases cujo mecanismo de ação catalítica não está elucidada (CHITTE et al., 1999), entretanto, evidências apontam para a existência de processos de degradação mecânica, sulfitólise e proteólise. Nos fungos, a degradação se inicia com o crescimento do micélio (degradação mecânica), expondo outros locais à ação das enzimas. Em seguida, ocorre liberação de sulfito devido à quebra das pontes dissulfeto e finalmente proteólise (ONIFADE et al., 1998).

Em geral a produção das queratinases é induzida, sendo necessário um indutor exógeno, como a presença de queratina. Uma grande quantidade de atividade queratinolítica de origem microbiana e especificidades enzimáticas por substratos são descritas na literatura evidenciando as diferenças entre as espécies microbiológicas e a metodologia aplicada (YU et al., 1968; CHENG et al., 1995; CHITTE et al., 1999;

SANGALI e BRANDELLI, 2000; ALLPRESS et al., 2002; BERNAL et al., 2003; RAMYA et al., 2014).

As queratinases possuem uma vasta especificidade de substratos proteicos solúveis e insolúveis como a caseína, gelatina, soroalbumina bovina, penas, lã, cabelo, unha, seda, colágeno, elastina, e azoqueratina (ONIFADE, 1998; BRESSOLLIER et al., 1999; FRIEDRICH et al., 2003; SANTANA, 2011; JEEVANA et al., 2013). O que distingue as queratinases de outras proteases é a capacidade de agir em substratos compactos, como a queratina, quando comparadas com outras enzimas proteolíticas.

A temperatura ótima das queratinases para máxima atividade está entre 30 e 80°C podendo haver variações entre as queratinases produzidas por diferentes microrganismos. O pH em geral permanece na faixa alcalina (pH 7,5-12). A atividade da queratinase pode ser quantificada através de métodos que afirmam que uma unidade de enzima é equivalente a quantidade da mesma necessária para a liberação de aminoácidos ou fragmento peptídico que ocorre durante a formação da ligação covalente enzima-peptídeo (FARAG e HASSANN, 2004; SANTANA, 2011; SIVAKUMAR, 2013).

3.4.2 PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES

As queratinases de origem microbiana como fungos, bactérias e espécies de *Streptomyces* vem sendo purificada de diferentes formas (CHENG et al., 1995; BOCKLE et al., 1995; BRESSOLLIER et al., 1999; BERNAL et al., 2003). Diversas técnicas capazes de purificar proteínas são aplicadas em estudos de produção enzimática, entre elas a purificação por afinidade utilizando partículas magnéticas.

Partículas magnéticas possuem inúmeras aplicações em áreas da manipulação genética, imunoensaio, imobilização de enzimas, separação do DNA e purificação de proteínas (HWEE, P. K. et al., 1998; DING, X. B. et al., 1999; TANYOLAC, D. e OZDURAL, A. R., 2000). A separação por bio-afinidade é geralmente empregado como uma etapa cromatográfica para a remoção de detritos e fracionamento inicial (DUNNILL, P. e LILLY, M. D., 1974).

A tecnologia baseia-se na aderência de um produto sobre a superfície de partículas magnéticas pré-fabricado e o uso dos conjugados resultantes para a separação e concentração de biomoléculas por meio da força magnética (HANCOCK, J. P., KEMSHEAD, T. J., 1993; SAFARIK et al., 1995; UGELSTAD et al, 1992).

A purificação de enzimas em suportes convencionais é geralmente limitada a substratos solúveis. As enzimas purificadas com o emprego de partículas magnética tem a vantagem sobre todos os outros suportes por serem facilmente separáveis de outros materiais insolúveis usando dispositivos magnéticos (LEERIPUTTEN, E. V.e HORISBERGER, M., 1974).

3.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA QUERATINASE

O mercado mundial de produção enzimática é avaliado em 1,5 bilhão de dólares, onde o segundo grupo de enzimas de maior comercialização são as proteases. O Brasil participa com apenas 2,7% da comercialização de enzimas que corresponde a 40 milhões de dólares (RAO et al., 1998; SANTANA, 2011).

As proteases se caracterizam pela sua vasta aplicação e por serem produzidas tanto por animais como por plantas e microrganismos (SANTANA, 2011), levando a transformar a biodiversidade em uma fonte inestimável, favorecendo a pesquisa por novos isolados com excelente produção de metabólitos para fins industriais (HODGSON, 1994; SANTANA, 2011).

As queratinases de origem microbiana começaram a ser usadas em larga escala na bioconversão de resíduos, na indústria de alimentos, têxteis, farmacêutica e indústria de cosméticos (FRIEDRICH et al., 2003; FARAG e HASSAN, 2004; SANTANA, 2011; JAQUADI et al., 2013) atuando em processos biotecnológicos como na degradação de resíduos queratinoso, melhoramento econômico e nutricional de rações para animais, produção de detergentes, como também na medicina e farmacêutica (HOSHINO et al., 1995; LIN et al., 1996; ONIFADE et al., 1998; FRIEDRICH et al., 2003; RIFFEL et al., 2003; SANTANA, 2011; HAN et al., 2012).

3.5.1 APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E MÉDICA

Estudos estão sendo desenvolvidos para uma provável aplicação industrial de queratinases produzida pelo microrganismo *Kryptococcus sedentarius* para a remoção de calosidades em seres humanos (SANTANA, 2011). As enzimas produzidas por esta bactéria revelam atividade queratinolítica em duas serino-proteases, que agem de forma independente uma da outra. O desenvolvimento do estudo prevê que estas enzimas seriam eficazes no tratamento do calo humano (BLANK et al., 1972; KIM et al., 1999; RIFFEL, 2006; SANTANA, 2011).

3.5.2 APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DO DETERGENTE

Nas últimas décadas, as enzimas têm dominado o mercado de formulação e produção de detergente, sendo aproximadamente 89% destas constituídas de proteases. A queratinase atua removendo partículas de queratina que podem resultar no entupimento de ralos e filtros (SANTANA, 2011).

A habilidade da queratinase em se ligar a substratos sólidos e hidrolisa-los é de grande importância para a produção de detergentes enzimáticos, uma vez que eles são usados para remover substratos proteicos aderidos a superfícies sólidas (SANTANA, 2011). Também há aplicação desta enzima em detergentes para a limpeza de esgotos em que normalmente são obstruídos com material de origem queratinoso (TAKAMI et al., 1992; FARANG e HASAN, 2004; SANTANA, 2011).

3.5.3 APLICAÇÃO NO PROCESSAMENTO E REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos gerados pelas indústrias avícolas provenientes do abate das galinhas para o consumo humano, possuem um grande impacto ambiental. A bioconversão desses resíduos é uma alternativa viável favorecendo a indústria e o meio

ambiente, visando o baixo custo de obtenção (GESSESSE et al., 2003; SANTANA, 2011).

As penas já são utilizadas em alguns países como matéria prima para a complementação da ração animal. Elas passam por um tratamento hidrotérmico e são transformadas em farinha para posteriormente, adicionada a ração. Entretanto, este processo elimina alguns aminoácidos como lisina, metionina e triptofano, resultando em um produto de pouco valor nutricional e elevados custos (SANTANA, 2011; EL-AYOUTY et al., 2012; RAJU e DIVAKAR, 2013). O emprego da queratinase neste processo evita a eliminação desnecessária destes aminoácidos tornando-se uma alternativa de interesse para a indústria (LATSHAW et al., 1994; WANG et al., 2003; SANTANA, 2011; HAGGRAN, 2014).

A farinha de pena também pode ser utilizada na agricultura orgânica substituindo o guano, que é usado como fertilizante e possui um elevado custo de produção. Já a farinha de pena funciona como um suprimento de nitrogênio para as plantas e promove a atividade microbiana (GUPTA e RAMNANI, 2006; SANTANA, 2011). Como fertilizantes orgânicos, a farinha de pena se destaca devido ao seu baixo custo, a facilidade da produção, abundante matéria prima e alto teor nutricional.

3.6 FUNGOS PRODUTORES DE QUERATINASE

O uso das penas como substrato e única fonte de carbono e nitrogênio do microrganismo evidencia a síntese de queratinase capaz de degradar a proteína. Este fenômeno está associado à necessidade do microrganismo em hidrolisar substratos proteicos para aproveitamento como fonte de nutrientes. Entre os microrganismos com atividade queratinolítica encontra-se fungos (BOCKLE et al., 1995, SANTOS et al., 1996) e bactérias (WILLIAMS et al., 1990, COELLO, 2003).

Nos últimos anos houve um crescente aumento de pesquisas com o objetivo de isolar microrganismos queratinolíticos e estudá-los em diferentes condições na tentativa de otimizar a produção de queratinases mais resistentes, específicas e termoestáveis com

a finalidade de serem aplicadas na indústria, visto que esta enzima pode ser utilizada em diversos setores industriais (RIESSEN; ANTRANIKIAN, 2001; CORTEZI, 2009; CROWTHER; A'BEAR, 2012; HAGGRAN, 2014; KUMAR; KUSHWAHA, 2014). Consequentemente, as queratinases obtidas de microrganismos têm sido purificadas e caracterizadas em grande escala como observado na Tabela 1 adaptado do estudo de Kumar e Kushwaha (2014). As propriedades físico-químicas da queratinase variam de acordo com a espécie do microrganismo produtor, substrato utilizado e condições físicas durante a produção, entre outros. Foi relatada na literatura uma faixa dos melhores pHs (5,5 a 10) e temperaturas (30°C a 100°C) com maior atividade enzimática (MUKHOPADHYAH e CHANDRA, 1990; QIN et al., 1992; BERNAL et al., 1995).

Tabela 1: Fungos produtores de queratinase (Adaptado de KUMAR; KUSHWAHA, 2014)

Espécie	Massa (KDa)	pH	Temperatura (°C)	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	6,5-9,0	45	(SANTOS et al., 1996)
<i>Micorспорum canis</i>	43,5	8	50	(BROUTA et al., 2001)
<i>Aspergillus oryzae</i>	60	8	50	(FARAG; HASSAN, 2004)
<i>Aspergillus flavipes</i>	60	7	45	(EL-AYOUBRY et al., 2012)
<i>Chrysosporium tropicum</i>	57	8,8	-	(KUMAR e KUSHWAHA, 2014)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	33	4,5-10	30-55	(MORE et al., 2013)
<i>Microsporium gypseum</i>	60.5	8,9	-	(KUMAR e KUSHWAHA, 2014)
<i>Myceliophthora fergusii</i>	35	7,9	-	(KUMAR e KUSHWAHA, 2014)
<i>Penicillium griseofulvum</i>	44	8	-	(KUMAR e KUSHWAHA, 2014)
<i>Scopulariopsis brevicalis</i>	39	8	40	(ANBU et al. 2006)
<i>Trichophyton var. erinacei</i>	38	5,5	50	(MUHSIN; AUBAUD, 2000)
<i>Verticillium sp.</i>	32	7,2	-	(KUMAR e KUSHWAHA, 2014)

Nos meios de cultura, as penas podem ser adicionadas tanto inteiras como moídas e funcionam como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento do microrganismo (RIFFEL et al., 2003, SANGALI; BRANDELLI, 2000; RIFFEL; BRANDELLI, 2002; THYS et al., 2004; RAMNANI; GUPTA, 2004; JAQUADI et al., 2013).

A mesma espécie de microrganismo entretanto, isolados diferentes podem apresentar variações na produção e na atividade queratinolítica, como também em diversas atividades bioquímicas (SANTANA, 2011; JITENDRA e KUSHWAHA, 2014; AGRAWAL e DALAL, 2015.).

3.6.1 GÊNERO *Cunninghamella*

A capacidade observada nos fungos em adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono é um fator essencial para sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica se deve a produção de uma grande quantidade de enzimas, capazes de hidrolisar uma variedade de compostos. Os fungos estão sendo cada vez mais utilizados em processos de biotecnológicos por serem capazes de viver nos mais diversos habitats influenciando fatores bióticos e abióticos (ALEXOPOULOS et al., 1996; CROWTHER e A'BEAR, 2012).

Em situações de estresse ambiental, é importante conhecer o comportamento adaptativo dos fungos visando a capacidade dos mesmos em produzir metabólitos secundários de valor biotecnológico com aplicações industriais promissoras (SRINIVASAN e VIRARAGHAVAN, 2010; SINGH, 2014).

A classe dos Zygomycetes é caracterizada por fungos que produzem esporos de resistência. São cosmopolitas, exibindo grandes habilidades de sobrevivência e desenvolvimento em ambientes distintos (ATLAS e BARTHA, 1992; ALEXOPOULOS et al., 1996).

O gênero *Cunninghamella* pertencente à Classe Zygomycetes, possuindo quitina e quitosana em sua parede celular (BARTINICKI e GARCIA, 1967; RAJPUT e GUPTA, 2013). Na Figura 5 a seguir pode-se observar o aspecto macroscópico de *Cunninghamella* sp.

Uma das espécies utilizada neste trabalho, *Cunninghamella echinulata* foi relatada na literatura como um eficiente produtor de queratinase por More et al. (2013). Entretanto, sabemos que os microrganismos de mesma espécie podem se diferir quando são de isolamentos diferentes, apresentando modificações em características adaptativas e metabólicas. Após pesquisas em diferentes bancos, não foram encontradas evidências na literatura sobre o outro microrganismo utilizado neste trabalho, a espécie *Cunninghamella phaeosphora*, desde características morfológicas a potenciais biotecnológicos.

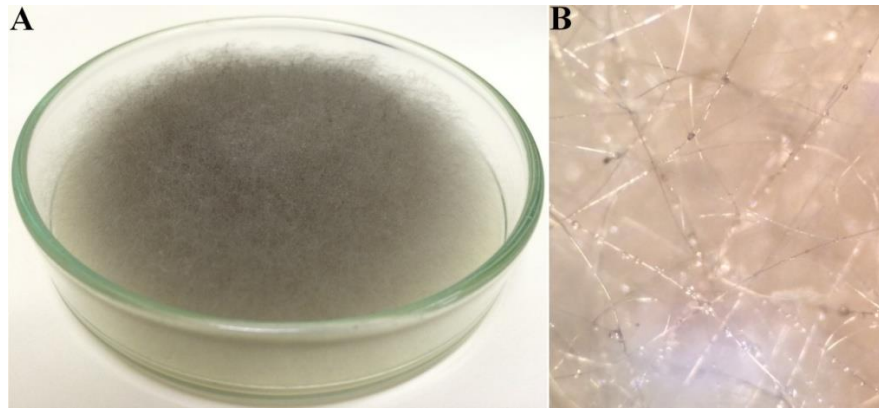


Figura 5: Aspecto macroscópico de *Cunninghamella sp.* A – Microrganismo cultivado em placa de Petri; B – Filamento do microrganismo em lupa (MAHNKE, 2015)

3.8 BIOMA CAATINGA

Caatingado tupi: *caa*(mata) + *tinga* (branca) nome escolhido devido a paisagem esbranquiçada apresentada pela vegetação durante o período seco como observado na Figura 6 (SANTOS, 2011).



Figura 6: Vegetação típica do bioma Caatinga (Comunidade Banco do Planeta, 2014)

A Caatinga é um bioma semiárido exclusivamente brasileiro, ou seja, grande parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrada em outro lugar. Ocupa cerca de 800.000 Km², incluindo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, correspondendo a 6,83%

do território nacional. Caracteriza-se por possuir uma floresta seca, e apresentar uma vegetação xerófila com uma ampla variação de fisionomia e diversidade de espécies (BRASIL, 2007; SANTOS, 2011).

A Caatinga é caracterizado por possuir um clima de altas temperaturas, com precipitação irregular e escassa. A combinação desses fatores resulta em baixa disponibilidade hídrica para plantas durante um período de 7 a 9 meses, conhecido como período seco (SAMPAIO, 1995).

O ecossistema árido e semiárido pode apresentar uma diversidade fúngica superior comparada à de ambientes úmidos devido ao baixo potencial hídrico do solo, impedindo o desenvolvimento de bactérias, tornando a microbiota destes locais composta basicamente por fungos (MELLONI et al., 2000 e 2003; BARBOSA et al., 2003 e 2007; CRUZ e GUSMÃO, 2009; CROWTHER e A'BEAR, 2012). Os fungos apresentam importância ecológica e econômica, atuando como decompositores e produtores de metabólitos incluindo enzimas de uso biotecnológico.

A capacidade adaptativa dos fungos citada anteriormente, baseia-se na produção de enzimas que lhe permitem sobreviver em diversos locais utilizando diferentes substratos como fonte de energia e carbono. Os fungos nessa região são ainda pouco conhecidos (MAIA & GIBERTONI, 2002; BALAKUMAR et al., 2013) e merecem atenção especial pelo potencial que representam, uma vez que a sua sobrevivência em ambientes com escassez nutritiva requer uma maior atividade de síntese de diferentes metabólitos para a obtenção de nutrientes, justificando estudos em busca de isolados capazes de produzir compostos de interesse biotecnológico e industrial.

4REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, B.; DALAL, M. Screening and Characterisation of Keratinase Enzyme Obtained From Keratin Degrading Microorganism Isolated From Sanjan Poultry Waste Dumping Soil. European Academic Research, v. 11, 2015.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology, New York, John Wiley & Sons publishers, 1996.

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

ALLPRESS, J.D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P.C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIBM 9497. Letters in Applied Microbiology, v. 34, p. 337-342, 2002.

ANBU, M. R. et al. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicallis* and statistical optimization of enzyme activity. Enzyme Microb Technol, v. 36, p. 639-647, 2006.

ANDERSEN, M. R.; JENS N. Current status of systems biology in *Aspergillus*. Fungal Genetics and Biology v. 46.(1), p.180-190, 2009.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Molecular identification of two new isolates of keratinolytic fungi using internal transcribed spacer regions. J. Appl. Sci. Environ. Sanit., v. 8, p. 67-75, 2013.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R., Microbial Ecology. Fundamentals and Applications, 3rd ed., the Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc., CA, USA. p. 563, 1992.

BARBOSA, F.R.; GUSMÃO, L.F.P.; CASTAÑEDA-RUIZ, R.F.; MARQUES, M.F.O.; MAIA, L.C. Conidial fungi from the semi-arid Caatinga biome of Brazil. New species *Deightoniella rugosa* & *Diplocladiella cornitumida* with new records for the neotropics. Mycotaxon v. 102, p. 39-49, 2007.

BARBOSA, M. R. V.; CASTRO, R.; ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N. Estratégias para a conservação da biodiversidade de prioridades para a pesquisa científica no bioma Caatinga, 2003.

BALAKUMAR, S.; NARAYANAN, M.; ARUNKUMAR, M.; SIVAKUMAR, R.; HEMAMBUJAVALLI, V. Optimization of Keratinase Production by Keratinolytic Organisms under submerged Fermentation. International Journal of PharmTech Research, v. 5, n. 3, p. 1294-1300, 2013.

BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuriarosea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 19, p. 255-261, 2003.

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

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

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Appl. Microbiol. Biotechnol, v. 85, p. 1735–1750, 2010.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição da biodiversidade brasileira: Atualização – Portaria MMA Nº 09, de 23 de janeiro de 2007. MMA, 328 p., 2007.

BRESSOLLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, n.6, p. 2570-2576, 1999.

BUREAU, D.P.; HARRIS, A.M.; CHO, C.Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v.180, p.345-358, 1999.

BUSSON, B.; ENGSTRON, P.; DOUCET, J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 6, p. 1021-103, 1999.

CHENG, S.W.; HU, H.M.; SHEN, S.W.; TAKAGI, H.; TSAI, Y.C. Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformes* PWD-1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, n.12, p. 2239-2243, 1995.

CHITTE, R. R. et al. Keratinolytic activity from the broth of a feather degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxon, v. 28, p. 131-136, 1999.

COELLO, N.; BERNAL, C.; BERTSCH, A.; ESTRADA, O.; MOCOO, Y.; HASEGAWA, M. Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interesse industrial. *Revista de la facultad de Ingeniería de la UCV*, v. 18, n. 3, p. 119-126, 2003.

CORTEZI, M. Isolamento de Microrganismos Produtores de Queratinase: Estudo da Biodegradação da Queratina Oriunda de Penas de Abatedouro de Frangos. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009.

CROWTHER, T. W. A; BEAR, A. D. Impacts of grazing soil fauna on decomposer fungi are species-specific and density-dependent. *Funga L. E. Cology*. v. 5, p. 277-281, 2012.

CRUZ, A. C. R.; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folheto. *Acta Botânica Brasílica*. v. 23, p. 55-70, 2009.

DING, X. B.; SUN, Z. H.; WAN, G. X.; JIANG, Y. Y. Preparation of Fe₃O₄/PSt magnetic particles in the presence of magnetic fluid in ethanol water mixture. *Chinese Journal of Polymer Science*, v. 17, p. 129–134, 1999.

DUNNILL, P.; LILLY, M. D. Purification of Enzymes Using Magnetic Bio-Afinity Materials. *Biotechnology and bioengineering*, v. 16, 1974.

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

EVERSON, P. A. G. Histochemistry the oretical and applied. v. 2, n. 3, 1968.

FARAG, A.; HASSAN, M. A. Review purification, characterization and immobilization of keratinase from *Aspergillusoryzae*. Enzymeand Microbial Technology, v. 34, p. 85-93, 2004.

FERNANDES, S. G.; PANIAGO, E.; LIMA, J. E. Análise de alternativas de políticas relacionadas com a demanda e a oferta de carnes no Brasil. Revista de economia e sociologia rural, v. 27, n. 4, p. 437-461, 1989.

FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J.P. Screeningfungi for synthesisofkeratinoliticenszymes. Letters in Applied Microbiology, v.28, p.127-130, 2003.

GESSESSE, A.; HATTI-KAUL, R.; GASHE, B.A.; MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme and Microbial Technology. v. 32, p. 519-524, 2003.

GUO, Y.; ZHENG, P.; SUN, J. *Aspergillusniger* as a potential cellular factory: prior knowledgeand key technology. Sheng Wu Gong Cheng XueBao. v. 26, n. 10, p. 1410-1418, 2010.

GUPTA, R; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied and Microbiology Biotechnology, v. 70, p. 21-33, 2007.

GUPTA, V.K.; SUHAS, L. Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. Journal of Environmental Management, 2009.

HAGGRAN, A. A. Enhanced Keratinase Production and Feathers Degradation by a Mutant Strain of *Bacillus subtilis*. Journal of applied sciences research, v. 10, p. 46-52, 2014.

HAN, M.; LUO, W.; GU, Q.; YU, X. Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11. African Journal of Microbiology Research, v. 6, p. 2211–2222, 2012.

HANCOCK, J. P.; KEMSHEAD, J. T. A rapid and highly selective approach to cell separations using an immunomagnetic colloid. J. Immun. Methods, v. 164, p. 51–60, 1993.

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

HWEE, P. K.; DAVID, K.; STEOHEN, D.; NIGEL, A. T.; EVGENY, N. Y. The synthesis of submicron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins. BiotechnolBioeng, v. 60, p. 419–424, 1998.

IGNATOVA, Z. et al. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycetes strain *Thermoactinomycescandilus*. Can J Microbiol, v. 45, p. 217-222, 1999.

JAOUADI, N. Z.; REKIK, H.; BADIS, A.; TRABELSI, S.; BELHOUL, M. Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillusbrevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. PLoS ONE, v. 8, 2013.

JEEVANA, P.; LAKSHMI, C. H.; KUMARI, M. C., LAKSHMI, V. V. Efficient Degradation of Feather by Keratinase Producing *Bacillus* sp. International Journal of Microbiology. v. 2013, p. 7, 2013.

KIM, J.M.; LIM, W.J.; SUH, H.J. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. Process Biochemistry, v. 37, p. 287-291, 2001.

KUMAR, J.; KUSHWAHA, R. K. S. Screening of fungi efficient in feather degradation and keratinase production. Archives of Applied Science Research, v. 6, p. 73-78, 201.

LATSHAW, J. D.; MUSHARA, N.; RETRUM, R. Processing of feather to maximize nutritional value poultry. Animal Feed Sci. and Technology, v. 47, p. 179-188, 1994.

LEERIPUTTEN, E. V.; HORISBERGER, M. Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 16, p. 385-396, 1974.

LIN, X.; WONG, S.L.; SHIH, J. Expressions of the *Bacillus licheniformes* keratinase gene in *Bacillus subtilis*. *Journal Industrial Microbiology*, v.19, n. 2, p. 134-138, 1997.

MAIA, L. L.; GIBERTONI, T. B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: Sampaio EVSB, Giulietti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL (eds) *Vegetação e flora da Caatinga*, APNE/CNIP, Recife, p. 163-176, 2002.

MANJU, R. Isolation, Identification, Characterization of *Bacillus subtilis* producing the Keratinase Enzyme under Optimization, Purification and immobilization method. *International Journal of Advanced Research*, v. 1, p. 456-465, 2013.

MAZOTTO, A. M.; CEDROLA, S. M.; LINS, A. S.; ROSADO, K. T.; SILVA, J. Q.; CHAVES, L.; RABINOVICH, R. B.; ZINGALI, A. B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 50: p. 89-96, 2010.

MELLONI, R.; ABRAHÃO, R.S.; MOREIRA, F.M.M.; FURTINI NETO, A.E. Impacto de resíduo siderúrgico na microbiota do solo e no crescimento de eucalipto. *Revista Árvore*, v.24, n. 3, p. 309-315, 2000.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicosarbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n. 2, p. 267-276, 2003.

MORE, S. S. et al. Purification and properties of a novel fungal alkaline keratinase from *Cunninghamella echinulata*. *Turkish Journal of Biochemistry*, v.38, p. 68-74, 2013.

MOUSAVI, S.; SALOUTI, M.; SHAPOURY, R.; HEIDARI, Z. Optimization of Keratinase Production for Feather Degradation by *Bacillus subtilis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, v. 6, p. 7160, 2013.

MUKHOPADHYAH, R. P; CHANDRA, A. L. Keratinase of a *streptomyces*. *Ind J ExpBiol*, v. 28, p. 575-577, 1990.

MUHSIN, T. M. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. *Microbiologia*, v.154, p. 185-189, 2000.

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

NAYAKA, S.; VIDYASAGAR, G. M. Purification and characterization of keratinase from native featherdegrading *Streptomyces albus*. *International Journal of Development Research*, v. 3, p. 034-039, 2013.

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

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

QIN, L.M.; DEKIO, S.; JIDOI, J. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinni*. *The Journal of Dermatology*, v. 277, p. 236-244, 1992.

RAJPUT, R.; GUPTA, R. Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresour Technol*. 2013.

RAJU, E. V. N.; DIVAKAR, G. Production of keratinase by using *pseudomonas aeruginosa* isolated from poultry waste. *Int. J. pharm. Chem. Bio. sci.* v. 3, p. 79-86, 2013.

RAMNANI, P.; GUPTA, R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.40, p.191-196, 2004.

RAMYA, K.; DEEPAK, V. M. M.; TANKACHI, A. Isolation, optimization of production conditions, characterisation and partial purification of keratinase enzyme from *Bacillus sp.* International Journal of Current Research, v. 6, p. 4413-4419, 2014.

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

RIESSEN, S.; ANTRANIKIAN, G. Isolation of thermoanaerobacter *keratinophilus sp.* Nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. Extremophiles, v. 5, p. 399-408, 2001.

RIFFEL, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium sp.* Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica. Tese de doutorado, escola superior de agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RIFFEL, A.; LUCAS, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. Archives of Microbiology, v.179, p.258-265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium sp.* kr6. Journal of Biotechnology, v.128, p.693703, 2007.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M.; FORSYTHE, S. J. The application of magnetic separations in applied microbiology. J. Appl. Bacteriology v. 78, p. 575–585, 1995.

SAIBABU, V.; NIYONGABO, Y.; NIYONZIMA, R.; SUNIL, S. M. Isolation, Partial purification and Characterization of Keratinase from *Bacillus megaterium*. International Research Journal of Biological Sciences, v. 2, 2013.

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

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian caatinga. In.: Bullock, S. H. Mooney; Medina, E. Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, 1995.

SANCHEZ J. F.; SOMOZA A. D.; KELLER N. P.; WANG C. C. Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. Nat Prod Rep. v. 29, n.3, p. 351-371, 2012.

SANGALI, S; BRANDELLI, A. Feather keratin hydrolysis by *Vibrio* sp. Strain kr2. J. applMicrobiol, v. 89, p. 735-743, 2000.

SANTANA, W. A. Detecção e caracterização parcial de queratinases obtidas de dermatófitos estocados na coleção de culturas Micoteca URM. Recife, Pernambuco, 2011.

SANTOS, J. C.; LEAL, I. R.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; FERNANDES, G.; W. & TABARELLI, M. Caatinga: thescientificnegligenceexperiencedby a dry tropical Forest. Tropical Conservation Science, v.4, p.276-286, 2011.

SANTOS, R.M.D. B.; FIRMINO, A.A. P.;DE SÁ, C. M.; FELIX, C.R. Keranolitic activity of *Aspergillusfumigatus*. Current Microbiology, v. 33, p.364-370, 1996.

SHANLEY, A.; Enzymes usher in a new era.Chemical engineering, v. 105, p. 63, 1998.

SINGH, I. Extracellular keratinase of some dermatophytes, their teleomorphs and related keratinolytic fungi. European Journal of Experimental Biology, v. 4, p. 57-60, 2014.

SINGH, C. J. Exocellular proteases of *Malbrancheagypsea* and their role in keratin deterioration. Mycopathologia, India, v. 143, p. 147-150, 1999.

Site: Comunidade Banco do Planeta: Disponível em:<http://www.comunidadebancodoplaneta.com.br/> acessado em 10 de novembro de 2014.

Site: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina: Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/> acessado em 07 de dezembro de 2014.

Site: Portal de Estudos em Química: Disponível em: <http://www.profpq.com.br/> acessado em 08 de dezembro de 2014.

Site: Prefeitura de Maceió: Disponível em: <http://www.maceio.al.gov.br/> acessado em 19 de dezembro de 2014.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Treatment of wastewaters by biosorbents: A Review, *Journal of Environmental Management*, p. 1-15, 2010.

SIVAKUR, T. T.; SHANKAR, V.; THANGAPANDIAN, V.; REMASUBRAMANIAN, V. Optimization of Cultural Condition for Keratinase Production Using *Bacillus cereus* TS1. *Insight Microbiology*, v. 3, p. 1-8, 2013.

TAKAMI, H. et al. Reidentification of the keratiniza-producing facultativelyalkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*. *Extremophilies*, v. 3, p. 293-296, 1992.

TANYOLAC, D; OZDURAL, A. R. Preparation of low-cast magnetic nitrocellulose microbeads. *Reactive e Functional Polymers*, v. 45, p. 235–242, 2000.

THYS, R. C. S.; LUCAS, F. S; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species. *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 181-186, 2004.

TIWARY, E.; GUPTA, R. 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*, v. 101, p. 6103–6110, 2010.

TORK, S.; ALY, M. M.; NAWAR, L. Biochemical and Molecular Characterization of aNew Local Keratinase Producing *Pseudomonas* sp, MS21. *Asian J Biotechnol*, 2010.

UGELSTAD, J.; BERGE, A.; ELLINGSEN, T.; SCHMID, R.; NILSEN, T. N.; MORK, P. C.; STENSTAD, P.; HORNES, E.; OLSVIK, O. Preparation and application of new monosized polymer particles. *Prog. Polymer Sci*, v. 17, p. 87–161. 1987.

WANG, J.J.; SHIH, J. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 22, n. 6, p. 608-616, 1999.

WAWRZKIEWICZ, K.; LOBARZEWSKI, J.; WOLSKI, T. Intracellular keratinase of *Trichophytogallinae*. *Med Mycol*, v. 25(4), p. 261–268, 1987.

WILLIAMS, C.M.; RIECHESTER, C. S.; MACKENSI, J. M.; SHIH, J.C.H. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1509 –1515, 1990.

YU, R. J.; HARMON, S.R.; BLANK, F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophytonmentagrophytes*. *Journal of bacteriology*, v. 96, n. 4, p. 1435-1436, 1968.

ZERDANI, I.; FAOD, M.; MALKI, A. Feather wastes digestion by a new isolated strains *Bacillus sp.* *African Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 67-70, 2004.

CAPÍTULO II:

Production and purification of keratinase from *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella phaeosphora*.

Manuscrito a ser submetido para Applied Microbiology and Biotechnology

Production and purification of keratinase from *Cunninghamella echinulata* and *Cunninghamella phaeosphora*.

Layla Carvalho Mahnke, Maria Helena Menezes Estevam Alves, Luiza Rayanna Amorim de Lima, Gabriela Ayres Fragoso Nascimento, Aline Elesbão do Nascimento, Luiz Bezerra de Carvalho Junior

L. C. Mahnke

Department of Biological Sciences – Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

M. H. M. Estevam Alves, L. R. A. Lima, G. A. F. Nascimento, L. B. Carvalho (*)

Laboratory of Immunopathology KeizoAsami – Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

E-mail: lbcj@gmail.com

A. E. Nascimento

Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology - Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil

Abstract

Keratinases (EC: 3.4.99) is widely applied in industry and medicine. This study aimed to produce, purify, and characterize keratinases obtained from *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 and *Cunninghamella phaeosphora* UCP 1303 isolated from soil of Caatinga (Pernambuco, Brazil). The microorganisms it maintained in solid medium, containing bird feathers keratin for 15 days and subsequently used in submerged fermentation for the enzyme production. Cultures it grown for 15 days at 28° C (orbital shaker at 150 rpm). Crude extracts collected at the best keratinase production day (9th and 6th for *C. echinulata* and *C. phaeosphora*, respectively) it used for affinity purification using particles of magnetite-keratin composite. Keratinases from *C. echinulata* and *C. phaeosphora* presented best activities at pH and temperature of 8.0; 28°C-45°C; 9.0 and 35°C-55°C, respectively. Both enzymes presented molecular mass of approximately 35 kDa. Thus, these microorganisms can produce keratinase that can purified by affinity binding on magnetite-keratin composite.

Keywords: Keratinase; *Cunninghamella*; Purification; Magnetite-keratin

Introduction

The poultry industry is the activity that has the largest and most advanced technological assets from the agricultural sector. The great progress in genetics, nutrition, management and sanity checked on the last four decades transformed the undertaking into a real economic complex (Nayaka and Vidyasagar, 2013). However, the poultry industry is responsible for producing a large amount of feathers with the potential to affect the environment because they accumulate in the form of garbage after the processing of poultry for human consumption. An alternative to reducing the environmental impact is the development of biotechnological processes for the use of this residue (Balakumar, 2013; Anitha and Palanivelu, 2013). It should note that the use of feather remains is an ecological solution, preventing its accumulation in the environment and the development of various types of pathogens. Thus, the biodegradation of feathers is a method for improving protein utilization as food (Han et al., 2012; Sivakur et al., 2013).

The keratinase belong to the group of proteases, the proteolytic enzymes that catalyze the hydrolysis of peptic bonds in proteins. Most keratinase is induce, requiring the presence of keratin as an exogenous inducer. They are characterized by specificity for a large number of soluble protein substrates as casein, bovine serum albumin, gelatin and hemoglobin; and insoluble substrates as feathers, wool, hair, nail, horn, silk, collagen, elastin, corneal layer and azokeratin (Singh, 2014; El-Ayouty et al., 2012; Agrawal and Dalal, 2015). These enzymes have improved ability to act on compact substrates such as keratin when compared with other proteolytic enzymes that is what distinguishes keratinases from other proteases. Keratinases plays an important role in biotechnological processes, highlighting the Eco-leather applications, degradation of the waste produced in the poultry industry, nutritional improvement of animal feed from feathers, the manufacture of detergents, as well as in medicine by eliminating the keratin in human acne and callus (Agrawal and Dalal, 2015; Haggran, 2014; Jaouadi et al., 2013).

Several microorganisms may synthesize the keratinase enzyme, thus isolating microorganisms that produce stronger, specific and thermostable keratinolytic enzymes to be applied in the industry has been made with interest of reducing possible environmental impacts (Rajput and Gupta, 2013; Jeevana et al., 2013; Kumar and Kushwaha, 2014). Cosmopolitan filamentous fungi, showing great survival skills and development in different environments, represent the Zygomycetes class. The *Cunninghamella* genus has more than 12 described species, was characterize by cause diseases known as zygomycoses using organic matter as substrate (More et al., 2013; Santana, 2011; Saibabu et al., 2013).

The Caatinga is an exclusively brazilian biome. Its climate has characterized by high temperatures, with irregular and low rainfall. The fungal diversity in arid and semi-arid ecosystems can be equal or greater when compared to humid environments (Crowther and A'Bear, 2012). This is due to low soil water potential, inappropriate for the growth of bacteria, which makes the food chain in arid systems based primarily on fungi. Fungi are ecologically and economically important, acting as decomposers and metabolites producers including enzymes of biotechnological use. The enzyme production capacity allows these organisms live in practically all substrates, with great versatility for life forms. The fungi in this region are still little known and deserve special attention by the potential they represent, justifying studies in search of species or isolates capable of degrading and synthesize compounds used in biotechnological processes of interest to agriculture, industrial and/or environmental (Santos et al., 2011).

In this context, this study aimed to produce, quantify, characterize and purify keratinases obtained from fungi *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 and *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 isolated from the soil of the Caatinga.

Materials and Methods

Microorganisms- *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 and *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 isolated from the soil of the Caatinga by project SISBIOTA from RENNORFUN (Redenorte e nordeste de fungosfilamentosos), were provided by the Culture Bank of the Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Recife, Brazil. For maintenance of the microorganisms, the strains were maintained in test tubes containing Synthetic Medium for Mucoralean as culture medium and stored at 5 °C.

Feather preparation- The chicken feathers were provide by the farm Pinto Formoso, located in Carpina, Pernambuco. The feathers were wash with water at 60 °C, then were dried at 60 °C and cut into small pieces. The treatment continued for degreasing feathers in chloroform and methanol solution (1:1, for 30 minutes at 37 °C), after they were wash with distilled water and placed at rest in a neutral detergent solution for 16 hours at 42 °C. Finally, they were rinse with distilled water and final drying was done at 60 °C. After drying, the feathers were ground in mill blades and sieved through 28-mesh sieve.

Production of keratinase by Fungi- The pre-inoculum was carried out using microorganisms which were inoculated for 15 days on solid medium containing (g/L): 0.5 g NaCl, 0.7 g KH_2PO_4 , 1.4 g K_2HPO_4 , 0.1 g MgSO_4 , 10 g of feather meal previously prepared and 20 g of Agar. The pH was adjust to 10.0. Subsequently suspensions of spores were made of 10^6 spores/ml in sterile water and added to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid medium having the same composition as described above with 1% of feather meal. The fungi were inoculated and maintained incubated for 15 days at 28 °C and 180 rpm. Every three days aliquots were remove. The fungal mycelium was remove by filtration, the filtrate centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and the supernatant was used for determination of the keratinolytic activity, protein content, pH changes dung the production of the enzyme, optimum pH and temperature with keratinase with increased activity.

Determination of activity Keratinase- To determine the keratinolytic activity casein was use as substrate and tyrosine as standard. Was add 5 mL of 0.65% casein and solubilized in potassium phosphate buffer pH 7.5, 1 ml of crude extract, incubated at 37 °C for 10 minutes. Subsequently were add 5 ml of trichloroacetic acid (TCA) 300 mM to stop the reaction and incubated at 37 °C for 30 minutes. Then, the samples were filter and collect to 2 ml colorimetric assay by adding 5 mL of 0.5M Na_2CO_4 , then 2 ml of Folin-Ciocalteu 1N and incubated for 30 minutes to stabilize the color. After that, the absorbanceofthesolution was spectrophotometrically determined at 660 nm. Keratinase activity it defined as the amount of enzyme used to require releasing 1 μM of tyrosine per minute according to the equation:

$$\text{Units/ml} = \mu\text{M tyrosine} \times 11/10 \times 2 \quad (1)$$

Where:

11 = Total volume used in the test determination

10 = Reaction time in minutes

2 = Volume used in the colorimetric test

Determination of protein content- The protein content in the medium was determined using the method of protein estimation by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

pH Effects on keratinase activity- The optimum pH for enzyme activity was determined using the following buffers: 0.2 M citrate buffer (pH 4-6), 0.2 M phosphate buffer (pH 7-8), and buffer 0.2 M bicarbonate-carbonate (pH 9-10). The determination of the enzymatic activity were performed as described above using 0.65% of casein as substrate (MUHSIN and AUBAID, 2000).

Effect of temperature on keratinase activity- The optimum temperature for the keratinolytic activity determined by incubation of the enzyme with the substrate, which were subjected to different temperatures ranging from 28 °C to 75 °C for a period of 10 minutes. The enzymatic activity was determined as described above using 0.65% of casein as substrate.

Thermal stability of keratinase- To determine the temperature stability, the enzyme previously incubated in 45°C, 55°C and 75°C. Aliquots was removed for the determination of the keratinolytic activity at the following times 0, 10, 30, 60, 90 and 120 minutes. Keratinase activity was determined from samples taken at each time as described above using 0.65% of casein as substrate.

Keratin fiber magnetization- The feather of chicken (1 g) were add in 200 mL of distilled water. The suspension stirred for about 10 minutes, and added 10 ml of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.1M) and 10 ml of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.6M) simultaneously. Ammonium hydroxide were added to reach pH 11. The magnetic support kept under constant stirring for 30 minutes in a water bath at 100 °C. Feathers were removed from the suspension by sieving and were washed successively until the pH reaches 7.0. Then, the support were dried at 50 °C (NERI et al., 2009, adapted).

Keratinase precipitation- Keratin were precipitated by acetone in the 30-80% fractions. The acetone was added in 3:1 (acetone:enzyme broth) and incubated for 60 minutes at -20 °C. The sample centrifuged at 15.000 rpm for 15 minutes and the supernatant discarded. The precipitates dissolved in Tris-acetate buffer at pH 7.0 and the enzymatic activity and protein content were determined as described above.

Keratinase purification- To evaluate the efficiency of the purification method the acetone extracts were incubated with 10 mg of keratin magnetized for 2 hours at 4 °C under stirring. After stirring, the particles collected by a magnetic field 6000 Oe and the supernatant saved to determine total protein. The first protein peak (total proteins) it obtained using phosphate buffer solution 0.05 mol/L pH 8.0 (5 mL). After that , the specifically bound proteins to the matrix were eluted with phosphate buffer 0.05 mol/L pH 8.0 containing 1M NaCl buffer . The amount of protein was spectrophotometrically monitored at 280 nm. Keratinolytic activity and the total protein of the fractions containing keratinase were determined (fractions eluted with 1 M NaCl).

Electrophoresis analysis of acetone extract and purified enzyme (SDS-PAGE)- To check the state of purity of the samples and to determine the molecular weight of the proteins, the electrophoresis on polyacrylamide gels with denaturing of the proteins (SDS-PAGE) was according to Laemmli et al. (1970). It was performed in 10% gradient gel (16 kDa- 97 kDa) acrylamide/bisacrylamide in buffer containing Tris-HCl, glycine and SDS at 70 mA and 100 W. Commercial standard molar mass of 10,000-24,000 Da (Thermo Scientific) was used, and samples was prepared on commercial buffer according to Lämmli (Sigma-Aldrich) and heated for 5 minutes in boiling water. After the electrophoretic run, the protein it stained with silver nitrate. The gel it denatured in 50% ethanol and solutions of sodium thiosulfate and silver nitrate with formaldehyde added during the process. After the staining period, the gel it applied to a developer solution containing Na₂CO₃ with formaldehyde and sodium thiosulfate to visualize the protein bands, using 13% acetic acid to stop the reaction.

Results

The change in pH it studied during keratinase production process. Since the initial pH 10.0, Figure 1 shows the pH ranges obtained during cultivation of the isolates.

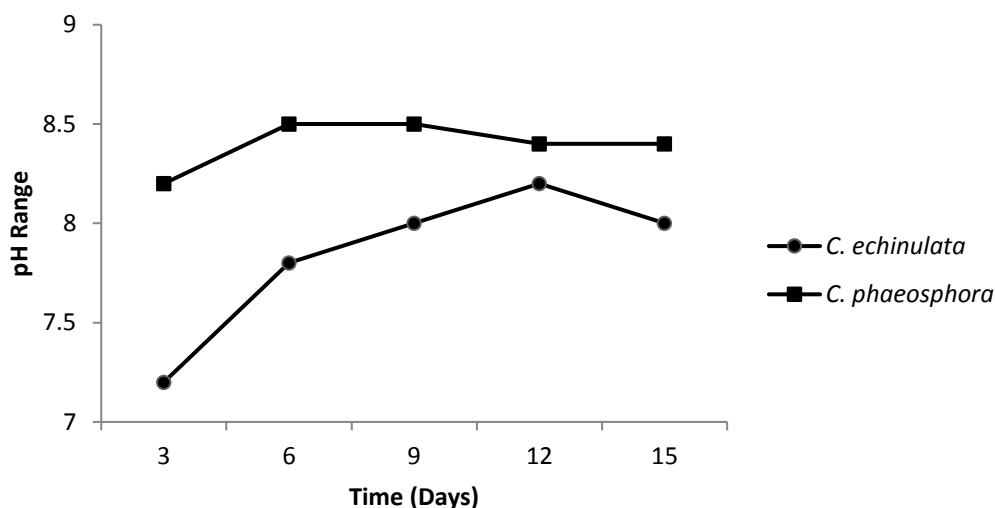


Figure 1. Change of pH during the production of keratinase by *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303

During the growth of the isolates, there was pH neutralization and then an increase to alkaline range in the interval from the ninth to fifteenth culturing day that coincided with higher keratinolytic activity.

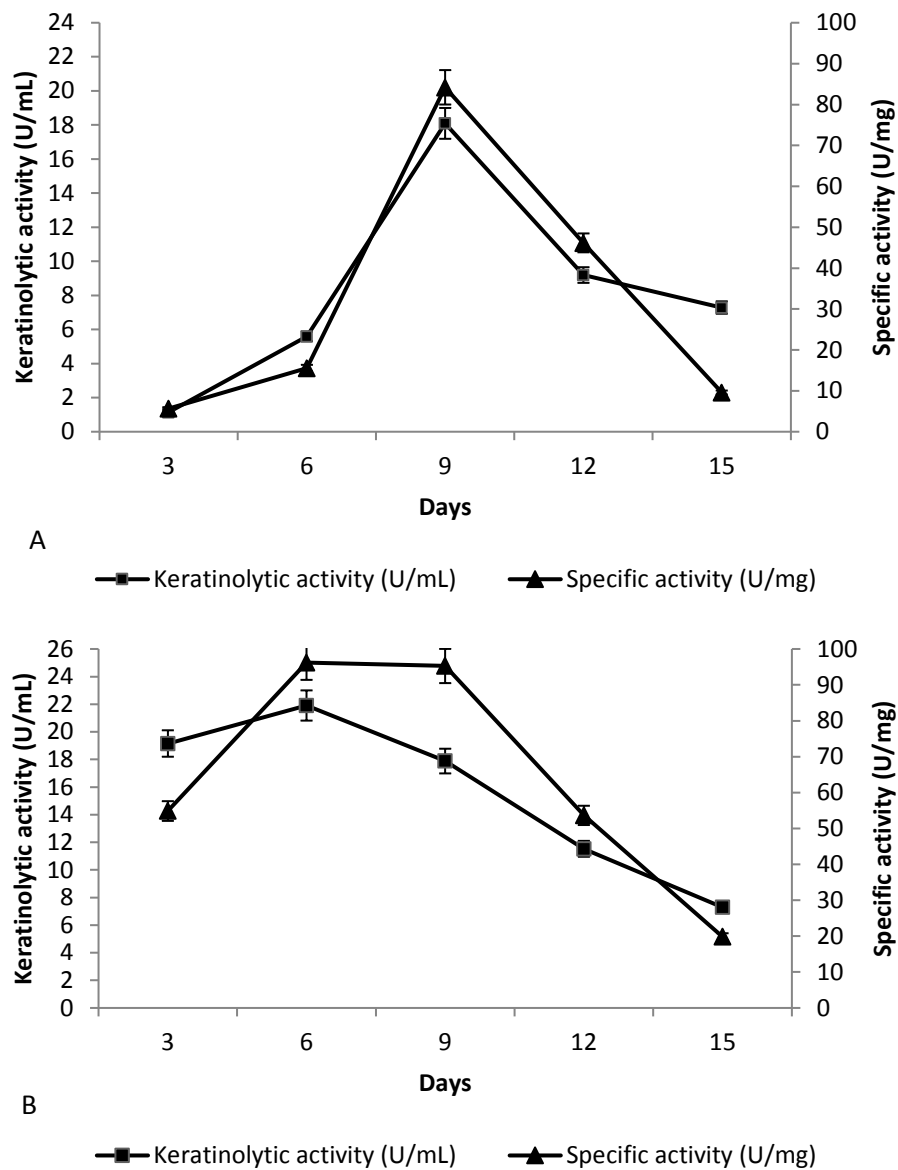


Figure 2. Displays of the specific keratinase activity of the isolates tested

Keratinase activity presented higher activity in the ninth day of culture, with the value of 18.1 U/ml of activity with a specific activity of 84.19 U/mg of soluble protein for *C. echinulata* UCP 1299 cultivation. *C. phaeospora* UCP 1303 showed higher enzymatic and specific activity on the sixth (21.9 U/mL; 96.2 U/mg) and ninth (17.8 U/mL; 95.2 U/mg) day of culture.

The effect of pH in the keratinase activity was also tested and it showed in Figure 3.

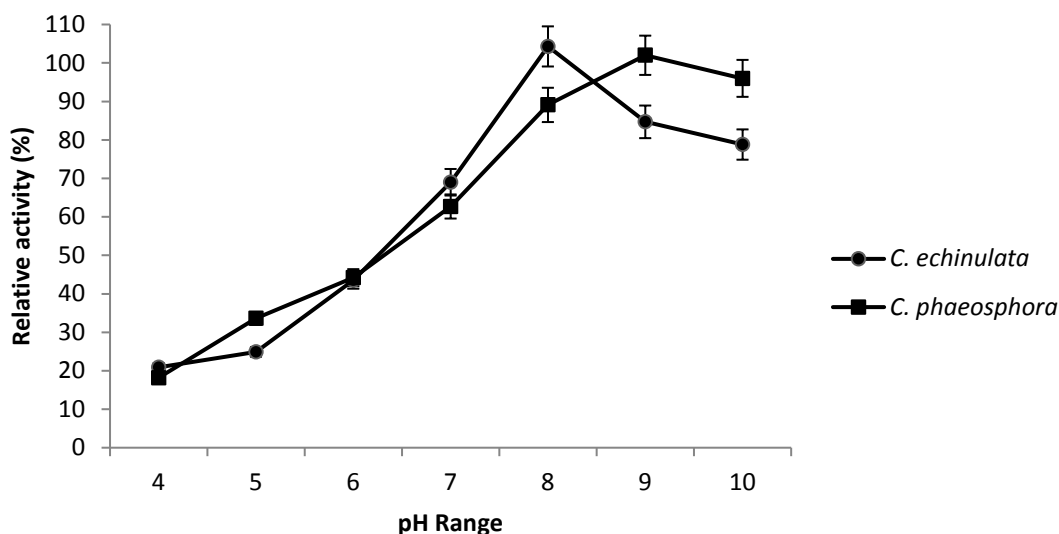


Figure 3. Effect of pH on the keratinase activity from *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303

Keratinase from *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303 it presented maximal activity in pH 8.0 and 9.0, respectively (Figure 3). The enzyme showed significant activity when subjected to pH changes leading to 65% reduction of its activity in the pH 4.0 for both isolates and reduced 29.3% and 27% at pH 7.0 and 9.0 respectively for the keratinase obtained from *C. echinulata* UCP 1299, and reduced 11.9% and 0.4% at pH 8.0 and 10.0 respectively for the keratinase obtained from *C. phaeosphora* UCP 1303 cultivation.

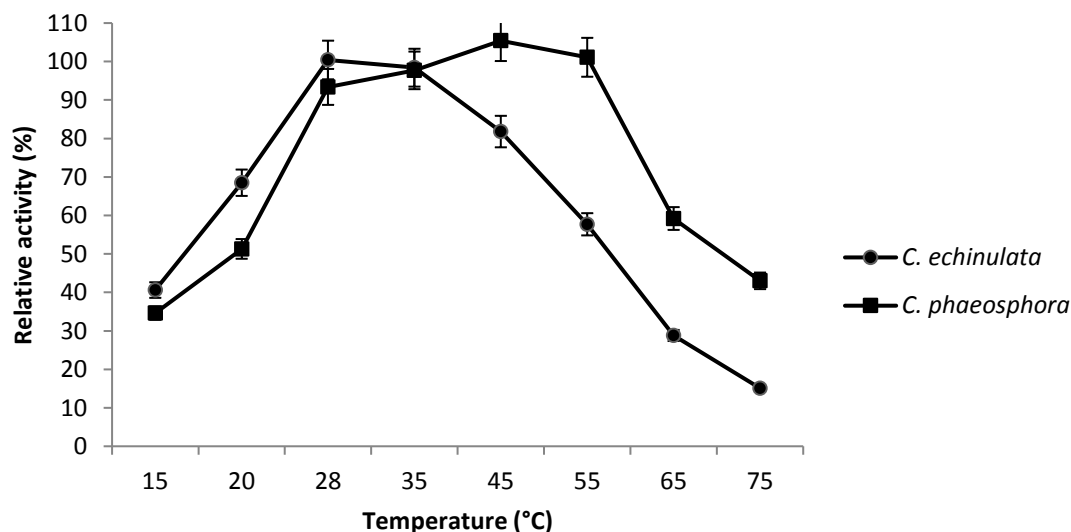


Figure 4. Effect of the temperature in keratinase activity of *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303

The best keratinase activity from *C. echinulata* UCP 1299 when subjected to different temperatures was shown in 28°C, 35°C and 45°C, for the keratinase activity of *C. phaeosphora* UCP 1303, the best results were shown in 35°C, 45°C and 55°C. The keratinase had considerable activities when subjected to temperature variation, keeping a relative activity above 60% between 28°C to 55°C leading to a reduction in activity at the highest temperatures of 65°C and 75°C, respectively.

The thermostability of the keratinase it showed in Figure 5.

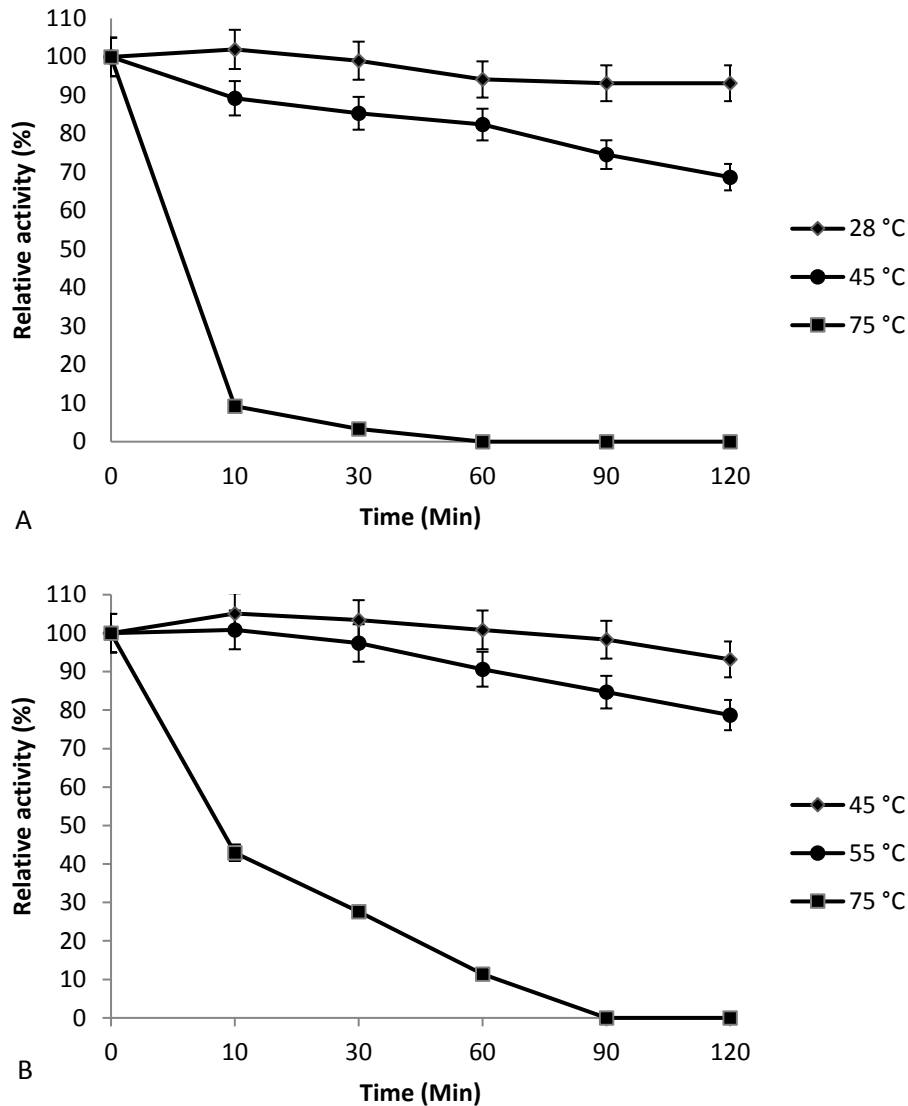


Figure 5. Thermostability of keratinase. A- *C. echinulata* UCP 1299; B- *C. phaeosphora* UCP 1303

Keratinase from both *Cunninghamella* is thermal stable at the investigated temperatures. *C. echinulata* lost about 20% (comparing temperatures 28°C and 45°C) of its activity during 2 h of incubation whereas *C. phaeosphora* 10% (comparing 45°C and 55°C). However, the keratinase from *C. echinulata* and *C. phaeosphora* lost their activities at 75°C after 60 and 90 min of incubation demonstrated a low enzymatic activity and zero activity, results of a gradative denaturation of the protein.

The results of the purification procedures it summarized in Table 1 and 2. SDS-PAGE analysis of the samples revealed a single band (Fig.7), indicating that the keratinase was purified. The overall purification factor was about 4.76-fold and 4.96-fold; the final yields were 37.4 % and 44.1% and the final products had specific activities of about 470 U/mg and 507 U/mg to *C. echinulata* UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303, respectively.

Table 1. Purification patterns of keratinase obtained from *C. echinulata* UCP 1299

Purification step	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (mg/mL)	Foldpurification	Yield (%)
Crudeextract	20	4.28	361.8	84.5	1	100
Acetoneprecipitation	10	2.19	216	98.6	1.16	59.7
Magnetizable Keratin	1	0.17	80.8	469.7	5.56	22.3

Table 2. Purification patterns of keratinase obtained from *C. phaeospora* UCP 1303

Purificationstep	Volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (mg/mL)	Foldpurification	Yield (%)
Crudeextract	20	4.54	438	96.2	1	100
Acetoneprecipitation	10	2.43	248	102.05	1.06	56.6
Magnetizable Keratin	1	0.21	109.6	506.8	5.26	25

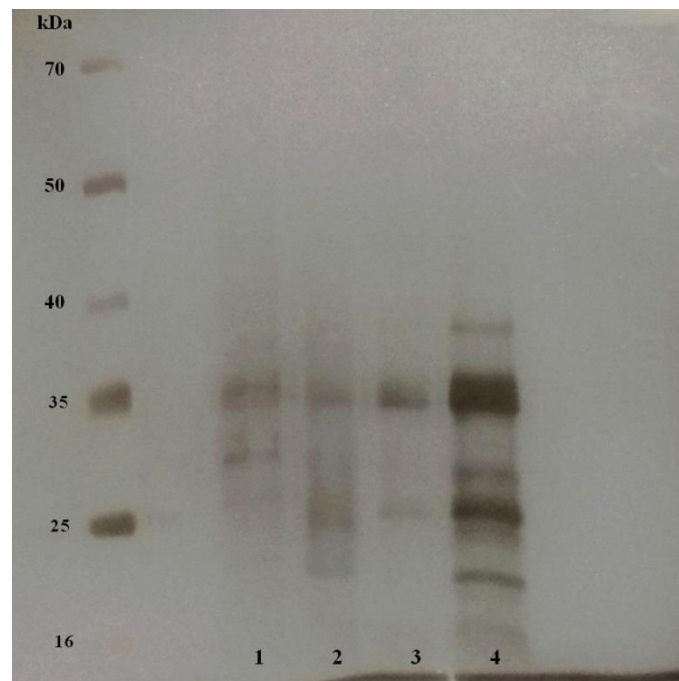


Figure 6. SDS-Page electrophoresis of the protein fractions collected from *C. echinulata* and *C. phaeospora* keratinase purification. (1) *C. echinulata* UCP 1299 purified sample; (2) *C. echinulata* UCP 1299 acetone precipitated sample; (3) *C. phaeospora* UCP 1303 purified sample; (4) *C. phaeospora* UCP 1303 acetone precipitated sample

The electrophoresis showed strong bands at the molecular weight of 35 kDa (keratinase molecular weight reported in the literature) in all collected fractions but is evident the reduction of bands comparing the purified samples with the acetone purified samples

Discussion

C. echinulata UCP 1299 and *C. phaeosphora* UCP 1303 are capable to produce keratinase induced by feathers substrate in approximately 140 h. Feathers are the mostly utilized substrate for keratinase production. Following feather degradation and keratinase production the pH value of the culture decreased to about 7.2 to 9.0. *C. echinulata* had been widely utilized for keratinase production, as other Zygomycetes species; however, this is the first study of keratinase production by *Cunninghamella phaeosphora*. Among these isolates, *C. phaeosphora* degraded feathers more quickly than *C. echinulata* UCP 1299.

Many keratinases are capable of hydrolyzing a broad range of soluble and insoluble proteins. For that reason, enzymes like keratinase submitted to extreme temperatures and pH to study its stability. The highest concentration of extracellular keratinase produced from 144 h to 216 h. Similar activity was obtained by the fungus *Aspergillus carbonarius* 1546 RMUs in its 5th day of culture, with a keratinolytic activity of 48.9 U/ml (Sales et al., 2008; Mousavi et al., 2013; Raju and Divakar, 2013; Sanchez et al., 2012). Since the production of keratinase varies from organism to organism, the study of the nutritional and environmental factors controlling the keratinase production from a highly potent strain of fungi is warranted (Leeriputten and Horisberger, 1974).

Additionally, it is visible that the keratinase obtained from the isolates were maintained at a pH optimum in the range from 7.0~9.0. These results were similar to keratinase of *Kocuriarosea* that been proposed in leather industry. A number of factors such as temperature, pH, and the nature of carbon and nitrogen sources present in the medium influences the keratinase production by microorganisms (Leeriputten and Horisberger, 1974).

Keratinases described in the literature are mostly serine proteases, moderately thermophilic (45~90 °C). The results are similar to those described by More et al. (2013) in which they used the same organism, however the keratinase produced for different isolates showed the best activity in the same temperature range 28~60 °C. In general, the enzymes react slowly at subfreezing temperatures and their activity increases with increasing temperature to achieve optimal activity, typically at temperatures in the range of 45 °C.

The results of the purification procedures indicated that using acetone precipitation followed by magnetic keratin particles purified keratinase preparation it achieved for both fungi. Besides the specific activity increase, the collected fractions presented a protein band corresponding to the described molecular weight for keratinase. The use of magnetic affinity materials were illustrated by Dunnill and Lilly (1974), they made a purification of L-asparaginase and B-galactosidase with the affinity. The separation of the enzyme were made using porous supports. Both enzymes were active over a temperature range of 28~65 °C, presenting an optimum value at 55 °C.

The isolates studied had keratinase activity and the samples showed a significant activity on the sixth to ninth day of incubation in submerged liquid culture. The sample of *C. echinulata* showed an 18.1 U/ml of activity with a specific activity of 84.19 U/mg of soluble protein, and for *C. phaeosphora* 21.9 U/ml of activity with a specific activity of 96.2 U/mg.

The optimum pH of keratinolytic activity was observed in the range of values between 7.0~9.0 being the best pH the 8.0 for *C. echinulata* UCP 1299 and 9.0 for *C. phaeosphora* UCP 1303;

Its optimal temperature was observed in the range of 28~55 °C. The thermostability tests demonstrated that the enzyme is moderately thermophilic. Its stability in temperature and alkaline pH range allows the performance of this enzyme in the leather industry providing an effective particularly in the bio treatment process of shaving, is suitable to replace chemical processes which cause environmental pollution;

For purification, both keratinases showed affinity for magnetization keratin. In the electrophoresis the enzyme purified for *Cunninghamella* species, showed a molecular weight of approximately 35 kDa.

Besides being a promising enzyme in biotechnological processing sectors such as animal feed production from feather meal, use in cosmetics, bioremediation of poultry industry waste, among others.

Conclusion

The isolates studied had keratinase activity and the samples showed a significant activity on the 6~9th day of incubation in submerged liquid culture, which showed an activity of 18.1 U/ml of activity with a specific activity of 84.19 U/mg of soluble protein for *C. echinulata* UCP 1299 cultivation and 21.9 U/ml of activity with a specific activity of 96.2 U/mg for *C. phaeospora* UCP 1303, respectively.

The optimum pH of keratinolytic activity was observed in the range of values between 7.0~9.0 being the best pH the 8.0 for *C. echinulata* UCP 1299 and 9.0 for *C. phaeospora* UCP 1303;

Its optimal temperature was observed in the range of 28~55 °C. The thermostability tests demonstrated that the enzyme is moderately thermophilic. Its stability in temperature and alkaline pH range allows the performance of this enzyme in the leather industry providing an effective particularly in the biotreatment process of shaving, is suitable to replace chemical processes which cause environmental pollution;

For purification, both keratinases showed affinity for magnetization keratin. In the electrophoresis the enzyme purified for *Cunninghamella* species, showed a molecular weight of approximately 35 kDa;

Besides being a promising enzyme in biotechnological processing sectors such as animal feed production from feather meal, use in cosmetics, bioremediation of poultry industry waste, among others.

Acknowledgements

We're thankful to CAPES, CNPq, FACEPE and REDE SISBIOTA for the financial support. **José Henrique Edmilson Souza Freitas, KeissyVanderley de Santana,**

References

- Agrawal B, Dalal M (2015) Screening and Characterisation of Keratinase Enzyme Obtained From Keratin Degrading Microorganism Isolated From Sanjan Poultry Waste Dumping Soil. Euro Acad Res. 11
- Anitha TS, Palanivelu P. (2013) Molecular identification of two new isolates of keratinolytic fungi using internal transcribed spacer regions. J ApplSci Environ. Sanit. 8:67-75
- Balakumar S, Narayanan M, Arunkumar M, Sivakumar R, Hemambujavalli V (2013) Optimization of Keratinase Production by Keratinolytic Organisms under submerged Fermentation. Int J Pharm Res. 5:1294-1300.

Crowther TW, A'Bear AD (2012) Impacts of grazing soil fauna on decomposer fungi are species-specific and density-dependent. *Fun Ecol.* 5:277-281.

Dunnill P, Lilly MD. (1974) Purification of Enzymes Using Magnetic Bio-Afinity Materials. *Biotechnology and bioengineering.* Vol. 16.

El-Ayouty YM, El-Said A, Salama AM (2012) Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes*. *Afr J Biotechnol.* 11:2313-2319, doi: 10.5897/AJB

Haggran AA (2014) Enhanced Keratinase Production and Feathers Degradation by a Mutant Strain of *Bacillus subtilis*. *J ApplSci Res.* 10:46-52.

Han M, Luo W, Gu Q, Yu X (2012) Isolation and characterization of a keratinolytic protease from a feather-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* C11. *Afr J Microbiol Res.* 6:2211–2222, doi:10.5897/AJMR2014.7172

Jaouadi NZ, Rekik H, Badis A, Trabelsi S, Belhouli M (2013) Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. *PLoS ONE.* 8, doi: 10.1371/journal.pone.0023085

Jeevana P, Lakshmi CH, Kumari MC, Lakshmi VV (2013) Efficient Degradation of Feather by Keratinase Producing *Bacillus* sp. *Int J Microbiol.* doi: 10.9735/0975-5276

Kumar J, Kushwaha RKS (2014) Screening of fungi efficient in feather degradation and keratinase production. *Arch ApplSci Res.* 6:73-78.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685.

Leeriputten EVE, Horisberger M (1974) Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles. *Biotechnology and Bioengineering.* 16:385-394.

Manju R (2013) Isolation, Identification, Characterization of *Bacillus subtilis* producing the Keratinase Enzyme under Optimization, Purification and immobilization method. *Int J Adv Res.* 1:456-465.

More SS, Sridhar DL, Prakash SN, Vishwakarma J, Umashankar S (2013) Purification and properties of a novel fungal alkaline keratinase from *Cunninghamella echinulata*. *Turk J of Biochem.* 38:68-74, doi: 10.5505/tjb.2014.47113.

Mousavi S, Salouti M, Shapoury R, Heidari Z (2013) Optimization of Keratinase Production for Feather Degradation by *Bacillus subtilis*. *Jund J Microbiol.* 6:7160, doi: 10.5812/jjm.10722

Ramya K, Deepak VMM, Tankachi A (2014) Isolation, optimization of production conditions, characterisation and partial purification of keratinase enzyme from *Bacillus* sp. *IntJCurr Res.* 6:4413-4419

Raju EVN, Divakar G (2013) Production of keratinase by using *Pseudomonas aeruginosa* isolated from poultry waste. *Int J Pharm ChemBioSci.* 3:79-86.

Nayaka S, Vidyasagar GM (2013) Purification and characterization of keratinase from native featherdegrading *Streptomyces albus*. *Int J Dev Res.* 3:34-39.

Rajput R, Gupta R (2013) Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresour Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.2015.02.076.

Saibabu V, Niyongabo Y, Niyonzima R, Sunil SM (2013) Isolation, Partial purification and Characterization of Keratinase from *Bacillus megaterium*. Int Res J Biol Sci. 2, doi: 10.7150/ijbs.10615.

Sanchez JF, Somoza AD, Keller NP, Wang CC (2012) Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. Nat Prod Rep. 29:51-71.

Singh I (2014) Extracellular keratinase of some dermatophytes, their teleomorphs and related keratinolytic fungi. Euro J Exp Biol. 4:57-60.

Sivakur TT, Shankar V, Thangapandian V, Remasubramanian V (2013) Optimization of Cultural Condition for Keratinase Production Using *Bacillus cereus* TS1. InsMicrobiol, 3:1-8.

Santana WA (2011) Detecção e caracterização parcial de queratinases obtidas de dermatófitos estocados na coleção de culturas Micoteca URM. Dissertarion, Federal University of Pernambuco.

Santos JC, Leal IR, Almeida-Cortez JS, Fernandes GW, Tabarelli M (2011) Caatinga: the scientific negligence experienced by a dry tropical Forest. TropConsSci. 4:276-286.

5 CONCLUSÃO

- Os isolados estudados hidrolisaram o substrato queratinoso utilizado evidenciando a produtividade enzimática;
- Foi quantificado uma significativa atividade enzimática no sexto ao nono dia de cultivo submerso com 18,1 U/ml de atividade queratinolítica e 84,19 U/mg de atividade específica para *C. echinulata* UCP 1299 e 21,9 U/ml de atividade queratinolítica com atividade específica de 96,2 U/mg para *C. phaeosphora* UCP 1303.
- O ótimo pH para a máxima atividade queratinolítica foi observada na faixa de 7,0~9,0 com o pH de melhor atividade 8,0 para a *C. echinulata* UCP 1299 e 9,0 para *C. phaeosphora* UCP 1303;
- A temperatura média para a máxima atividade das enzimas obtidas foram demonstrada na faixa de 28~55°C;
- Os testes de termoestabilidade demonstraram que as queratinases é moderadamente termofílica, zerando a atividade das mesmas quando submetidas a temperatura de 75°C por 120 minutos;
- Para a purificação, ambas as queratinases mostraram afinidade com as micropartículas magnetita-queratina obtendo uma significativa redução das proteínas solúveis.
- No ensaio de eletroforese com as enzimas purificadas das espécies de *Cunninghamella*, foi evidenciado o peso molecular de aproximadamente 35 kDa para ambas amostras.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

FORMATAÇÃO DA REVISTA

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

- Please select a concise and informative title (composed of no more than 130 characters).
- Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").
- Manuscripts must be written in English and the complete text should be formatted in 1,5 line spacing.
- Mini-Reviews on biotechnological products and processes or an apparatus and reactors used for biotechnological processes are welcome. They should provide a short historical outline of the development, extensively review the current state and conclude with an outline of trends and prospects for the future. For biotechnological products the competitiveness of the biotechnological process as compared to chemical processes or to processes, which rely on the isolation of the product from natural sources, should be provided. Applications and cost figures should be provided. Mini-reviews should contain a structural formula or a photograph of the biotechnological product, an outline of the biosynthetic pathway, a scheme of the apparatus, plant or reactor or a flow scheme of the process. Authors are asked to contact the Editor-in-Chief before submitting a mini-review.

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

- Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.

- Footnotes

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

- Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

- Materials and methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

- Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

- Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

- WDCM culturecollections
- NCBI Bio Project
- HUPO proteomics standard initiative
- American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

All taxa names (species names, genus names, and names of higher categories) **should be in italics.**

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses.

Multi-author papers must be cited in the text with "et al."; first author name is not sufficient; names of two-authors papers must both be given.

Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journalarticle

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. Eur J ApplPhysiol 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

- Articleby DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN Website

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

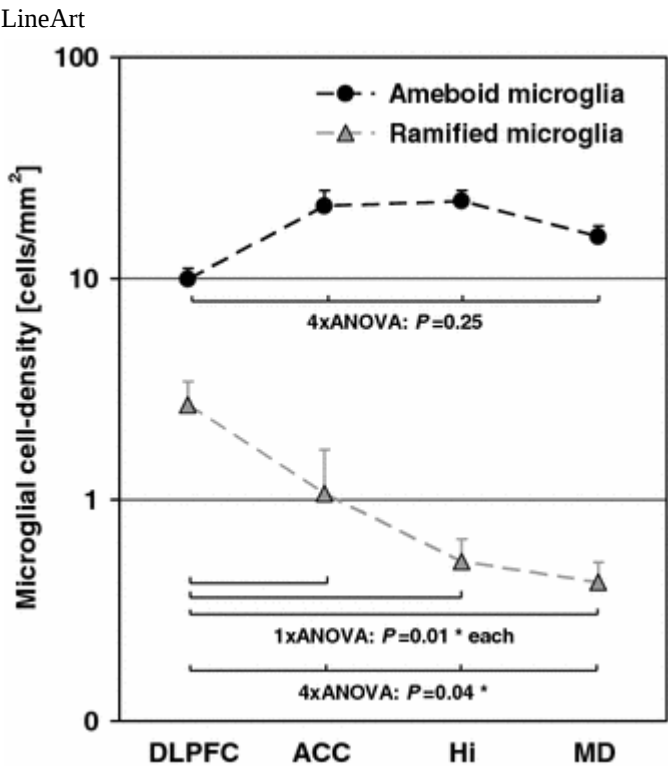
- EndNoteStyle

Please note:

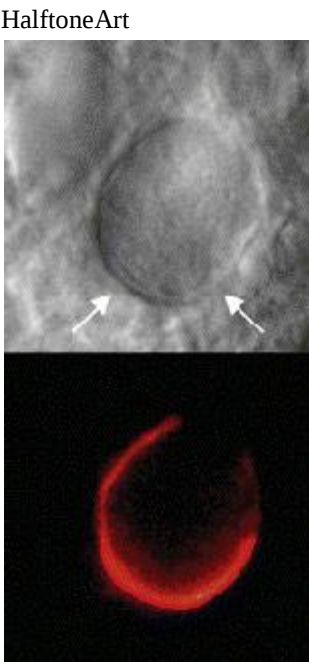
- All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts!
- Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al."!
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

- Supplyall figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are alsoacceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.



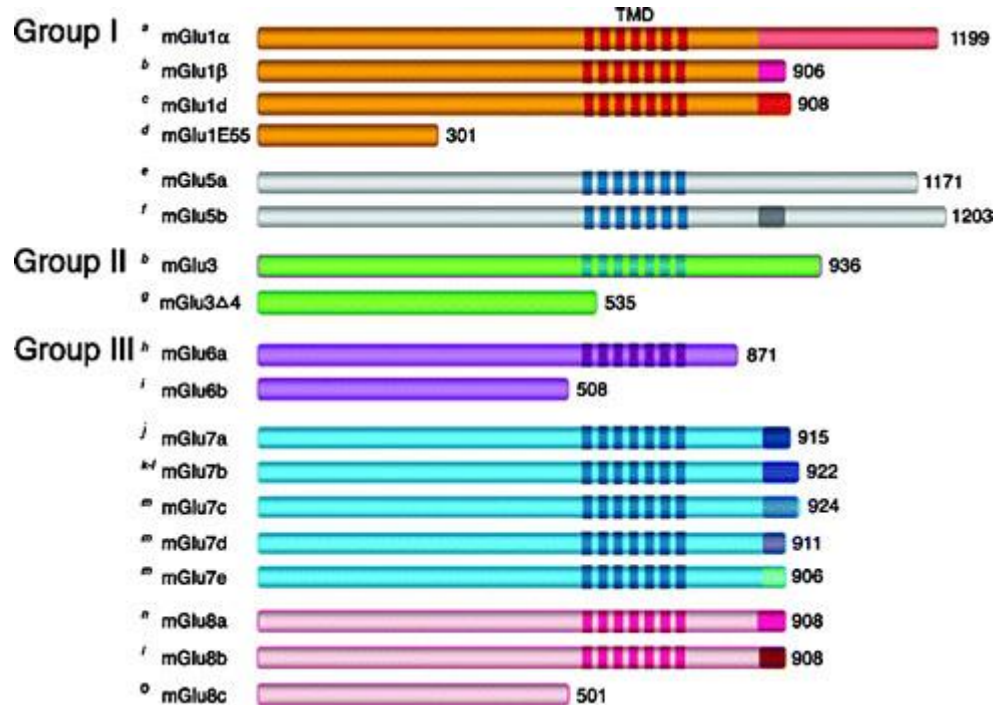
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

CombinationArt



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [EdanzEnglishediting for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [EdanzEnglishediting for scientists](#)