



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PURIFICAÇÃO DE QUERATINASE POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO  
INTEGRADO À ULTRAFILTRAÇÃO**

**ENG<sup>a</sup>. LUISA SALA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil**

Orientadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Costa Moraes**

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PURIFICAÇÃO DE QUERATINASE POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO  
INTEGRADO À ULTRAFILTRAÇÃO**

**ENG<sup>a</sup>. LUISA SALA**

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de mestre em  
Engenharia e Ciência de Alimentos

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil**

Orientadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline Costa Moraes**

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2013

*Aos meus pais, Lili e Jucimar, que me deram muito mais do que a vida.*  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

*“fa.mí.lia: o pai, a mãe e os filhos”*

Agradeço aos meus pais, Jucimar e Lili, se não fosse por vocês eu não teria chegado até aqui, afinal *‘educação é a única coisa que a gente deixa pros nossos filhos’*. Muito obrigado pelo apoio, pelo ‘colo’, pelo cuidado, pelo amor e principalmente por me ajudarem na realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão Davi e aos meus *nonos*, Lirio e Diva, por todo incentivo e apoio durante esta jornada.

*“o.ri.en.tar: dirigir, encaminhar, guiar, nortear”*

Agradeço, com muito carinho, a minha orientadora e professora Susana, a qual admiro pela sua sabedoria, simplicidade e generosidade. Muito obrigada pela orientação (não só do mestrado, mas desses sete anos), pelos conselhos e ensinamentos e por todas as oportunidades.

*“dizem que os amigos são pra sempre quando vivem como irmãos”*

Agradeço imensamente a minha amiga e hoje coorientadora Carol, primeiramente pela orientação na iniciação científica (sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar contigo) e depois no mestrado. Muito obrigada por essa amizade que simplesmente aconteceu, assim sem querer.

Ailton e Carlos Eduardo, agradeço por todos os momentos, sejam eles de diversão (que só vocês sabem proporcionar), choros, cuidados ou abraços. Muito obrigada pela amizade, levarei as lembranças para sempre.

Marciele, muito obrigada por todos esses anos de amizade, incentivo e confiança, tu estás sempre por perto, mesmo longe. Difícil encontrar pessoas como você.

*“a.mi.go: indivíduo unido a outro por amizade; pessoa que quer bem a outra; defensor, protetor; aliado”*

Joana e Rafa, agradeço pela orientação na iniciação científica, pela amizade, pelo apoio sempre que eu precisei, pelas ‘camas’, risadas, confiança, e principalmente por me aguentarem, muito obrigada por tudo.

À Betina, Elisa e ao João, por não entenderem nada sobre a minha dissertação, mas por me apoiarem sempre. Muito obrigada pela amizade, jogatinas, parceria, risadas e madrugadas.

Aos meus grandes amigos conquistados em Rio Grande. Guido, meu irmão durante a graduação, saiba que tens muita contribuição na minha vida, inclusive por eu ter chegado até aqui. Manu e Isa, às vezes a gente não sabe como uma amizade começa, foi assim, a nossa começou com um simples ‘oi’. Fê e Rafa vocês faziam parte da melhor equipe, amigos de pouco tempo ‘emprestados’, mas de grande coração.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações. Em especial a Dai, Déh, Fabrício e Ju (Biscoito), por garantirem os momentos de descontração.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, Felipe e Gabrielle, que auxiliaram muito no desenvolvimento deste trabalho, e também por me deixarem contribuir para a formação de vocês. Muito obrigada pela ajuda e pelo comprometimento com o trabalho.

A Ana por ser, literalmente, nossa mãe no laboratório.

À minha família ‘de coração’ de Rio Grande, tio Neri, tia Maritza, Vinicius e André.

Aos moradores da Mansão Braga, Ítalo, Thaís e Rafa, obrigada pelos fins de semanas.

Quero agradecer a todos que, em algum momento durante esta pesquisa, pararam para me ouvir falar dela ou simplesmente sentaram comigo para me aliviar um pouco.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição valiosa à melhoria do trabalho.

Agradeço ao Prof. Adriano Brandelli por permitir a realização de análises no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFRGS e pelo fornecimento da farinha de penas. Agradeço também a ajuda essencial da Ana Paula Corrêa.

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Caroline Costa Moraes por permitir a realização de análises no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNIPAMPA.

Agradeço à FURG, por permitir um estudo de qualidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

*Perguntaram ao Dalai Lama:*

*- O que mais te surpreende na Humanidade?*

*E ele respondeu:*

*- O homem. Porque perde a saúde para juntar dinheiro, depois perde dinheiro para recuperar a saúde. E por pensar ansiosamente no futuro, esquece do presente de tal forma que acaba por não viver nem o presente nem o futuro. E vive como se nunca fosse morrer... e morre como se nunca tivesse vivido.*

## SUMÁRIO

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                                                  | <b>ix</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                  | <b>x</b>  |
| <b>CAPÍTULO I - RESUMO, ABSTRACT E INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                   | <b>12</b> |
| RESUMO .....                                                                   | 12        |
| ABSTRACT .....                                                                 | 13        |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                            | 14        |
| 2. OBJETIVOS .....                                                             | 16        |
| 2.1. Objetivo geral .....                                                      | 16        |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                               | 16        |
| <b>CAPÍTULO II - REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                               | <b>17</b> |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                                 | 18        |
| 3.1. Queratinas .....                                                          | 18        |
| 3.2. Proteases .....                                                           | 19        |
| 3.2.1. Queratinases .....                                                      | 20        |
| 3.2.2. Aplicações das queratinases .....                                       | 21        |
| 3.3. Micro-organismos queratinolíticos .....                                   | 22        |
| 3.3.1. Gênero <i>Bacillus</i> .....                                            | 23        |
| 3.4. Separação e purificação de proteínas.....                                 | 24        |
| 3.4.1. Sistema aquoso bifásico .....                                           | 24        |
| 3.4.1.1. Diagrama de fases.....                                                | 25        |
| 3.4.1.2. Fatores que influenciam o diagrama de fases .....                     | 27        |
| 3.4.2. Processo de separação por membranas .....                               | 28        |
| 3.4.2.1. Ultrafiltração.....                                                   | 29        |
| 3.4.2.2. Diafiltração .....                                                    | 31        |
| 3.5. Purificação de queratinases.....                                          | 33        |
| <b>CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....</b>                        | <b>35</b> |
| <b>ARTIGO 1: MAXIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE QUERATINASE POR</b>                 |           |
| <b>SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO .....</b>                                           | <b>36</b> |
| RESUMO .....                                                                   | 37        |
| ABSTRACT .....                                                                 | 37        |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                            | 38        |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                    | 39        |
| 2.1. Cultivo submerso .....                                                    | 39        |
| 2.1.1. Micro-organismo .....                                                   | 39        |
| 2.1.2. Preparo do inóculo.....                                                 | 40        |
| 2.1.3. Cultivo e extração.....                                                 | 40        |
| 2.2. Purificação de queratinase por SAB .....                                  | 41        |
| 2.2.1. Sistema aquoso bifásico: primeira etapa .....                           | 41        |
| 2.2.1.1. Preparo do sistema aquoso bifásico .....                              | 41        |
| 2.2.1.2. Maximização da purificação de queratinase.....                        | 41        |
| 2.2.1.3. Validação do modelo .....                                             | 42        |
| 2.2.2. Sistema aquoso bifásico: segunda etapa.....                             | 42        |
| 2.2.2.1. Preparo do sistema aquoso bifásico .....                              | 42        |
| 2.2.2.2. Influência da solução diluente e da concentração de sulfato de amônio | 42        |
| 2.3. Determinações analíticas .....                                            | 43        |
| 2.3.1. Atividade proteolítica .....                                            | 43        |
| 2.3.2. Proteínas .....                                                         | 43        |

|                                                                                                                                 |                                                                            |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.                                                                                                                            | Determinação da eficiência do processo .....                               | 43        |
| 3.                                                                                                                              | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                               | 44        |
| 3.1.                                                                                                                            | Purificação de queratinase por sistema aquoso bifásico .....               | 44        |
| 3.1.1.                                                                                                                          | Sistema aquoso bifásico: primeira etapa.....                               | 44        |
| 3.1.1.1.                                                                                                                        | Maximização da purificação de queratinase .....                            | 47        |
| 3.1.1.2.                                                                                                                        | Validação do modelo DCCR 2 <sup>2</sup> .....                              | 55        |
| 3.1.2.                                                                                                                          | Sistema aquoso bifásico: segunda etapa .....                               | 57        |
| 3.1.2.1.                                                                                                                        | Influência da solução diluente e da concentração de sulfato de amônio..... | 57        |
| 4.                                                                                                                              | CONCLUSÃO.....                                                             | 60        |
| 5.                                                                                                                              | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                           | 61        |
| <b>ARTIGO 2: INTEGRAÇÃO DA ULTRAFILTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO AO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO NA PURIFICAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE.....</b> |                                                                            | <b>65</b> |
| RESUMO.....                                                                                                                     |                                                                            | 66        |
| 1.                                                                                                                              | INTRODUÇÃO.....                                                            | 67        |
| 2.                                                                                                                              | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                    | 68        |
| 2.1.                                                                                                                            | Cultivo submerso.....                                                      | 68        |
| 2.1.1.                                                                                                                          | Micro-organismo .....                                                      | 68        |
| 2.1.2.                                                                                                                          | Preparo do inóculo .....                                                   | 68        |
| 2.1.3.                                                                                                                          | Cultivo e extração .....                                                   | 69        |
| 2.2.                                                                                                                            | Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico ..... | 69        |
| 2.2.1.                                                                                                                          | Remoção do polietilenoglicol .....                                         | 69        |
| 2.2.2.                                                                                                                          | Sistema aquoso bifásico: primeira etapa.....                               | 70        |
| 2.2.3.                                                                                                                          | Sistema aquoso bifásico: segunda etapa .....                               | 71        |
| 2.2.4.                                                                                                                          | Operação da ultrafiltração/diafiltração .....                              | 71        |
| 2.3.                                                                                                                            | Zimograma .....                                                            | 71        |
| 2.4.                                                                                                                            | Eletroforese .....                                                         | 72        |
| 2.5.                                                                                                                            | Efeito da temperatura na atividade da enzima .....                         | 72        |
| 2.6.                                                                                                                            | Degradação de substratos proteicos .....                                   | 72        |
| 2.7.                                                                                                                            | Determinações analíticas.....                                              | 73        |
| 2.7.1.                                                                                                                          | Atividade proteolítica .....                                               | 73        |
| 2.7.2.                                                                                                                          | Proteínas.....                                                             | 73        |
| 2.7.3.                                                                                                                          | Determinação de polietilenoglicol (PEG).....                               | 73        |
| 2.8.                                                                                                                            | Determinação da eficiência do processo .....                               | 74        |
| 2.8.1.                                                                                                                          | Fator de purificação e recuperação enzimática.....                         | 74        |
| 2.8.2.                                                                                                                          | Fluxo .....                                                                | 74        |
| 2.8.3.                                                                                                                          | Fator de retenção do polietilenoglicol e atividade enzimática.....         | 74        |
| 3.                                                                                                                              | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                               | 75        |
| 3.1.                                                                                                                            | Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico ..... | 75        |
| 3.2.                                                                                                                            | Zimograma e eletroforese.....                                              | 81        |
| 3.3.                                                                                                                            | Efeito da temperatura na atividade da enzima .....                         | 82        |
| 3.4.                                                                                                                            | Hidrólise de substratos proteicos .....                                    | 83        |
| 4.                                                                                                                              | CONCLUSÃO.....                                                             | 85        |
| 5.                                                                                                                              | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                           | 85        |
| <b>CAPÍTULO IV - CONCLUSÃO GERAL .....</b>                                                                                      |                                                                            | <b>89</b> |
| 4.                                                                                                                              | CONCLUSÃO GERAL .....                                                      | 90        |
| 5.                                                                                                                              | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....                                      | 91        |
| <b>CAPÍTULO V .....</b>                                                                                                         |                                                                            | <b>92</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                         |                                                                            | <b>92</b> |
| 6.                                                                                                                              | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                           | 93        |

## LISTA DE TABELAS

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Aplicações das queratinases microbianas. .... | 21 |
|----------------------------------------------------------|----|

### **ARTIGO 1: Maximização da purificação de queratinase por sistema aquoso bifásico**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Variáveis independentes, níveis codificados e reais dos delineamentos.....                                                                                                                                                                                                       | 41 |
| Tabela 2 – Efeito da concentração de PEG e fosfato de potássio no fator de purificação ( <i>FP</i> ), recuperação enzimática (% <i>Rec</i> ) e razão de volumes ( <i>V<sub>r</sub></i> ). ....                                                                                              | 46 |
| Tabela 3 – Matriz do delineamento composto central 2 <sup>3</sup> , valores codificados e reais (entre parênteses), fator de purificação na fase de topo ( <i>FP</i> ), recuperação enzimática na fase de topo (% <i>Rec</i> ) e razão de volumes ( <i>V<sub>r</sub></i> ) do sistema. .... | 48 |
| Tabela 4 – Estimativa dos efeitos da concentração de PEG, fosfato de potássio e NaCl no DCC 2 <sup>3</sup> para o fator de purificação e a recuperação enzimática. ....                                                                                                                     | 48 |
| Tabela 5 – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> , valores codificados e reais (entre parênteses), fator de purificação na fase de topo, recuperação enzimática na fase de topo e razão de volumes ( <i>V<sub>r</sub></i> ). ....                        | 51 |
| Tabela 6 – Análise de variância (ANOVA) para as respostas fator de purificação ( <i>FP</i> ) e recuperação (% <i>Rec</i> ) do DCCR 2 <sup>2</sup> . ....                                                                                                                                    | 52 |
| Tabela 7 – Fator de purificação e recuperação enzimática experimental e predita com o respectivo desvio relativo na validação do DCCR 2 <sup>2</sup> . ....                                                                                                                                 | 56 |
| Tabela 8 – Influência do diluente no fator de purificação e na recuperação enzimática na segunda etapa de purificação. ....                                                                                                                                                                 | 57 |
| Tabela 9 – Influência da concentração de sulfato de amônio no fator de purificação e na recuperação enzimática durante a segunda etapa de purificação. ....                                                                                                                                 | 58 |

### **ARTIGO 2: Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico na purificação da enzima queratinase**

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Concentração de PEG nas fases de topo das duas etapas de purificação por sistema aquoso bifásico.....                              | 75 |
| Tabela 2 – Fator de purificação e recuperação enzimática para o <i>design</i> 1. ....                                                         | 77 |
| Tabela 3 – Fator de purificação e recuperação enzimática para o <i>design</i> 2. ....                                                         | 79 |
| Tabela 4 – Hidrólise de diferentes substratos proteicos catalisados pelo extrato enzimático e pela enzima purificada ( <i>design</i> 2). .... | 84 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Estrutura da queratina. ....                                                                                                                                                                                                                        | 18 |
| Figura 2 – Diagrama de fases genérico de um sistema aquoso bifásico formado por um polímero e um sal, onde PC é o ponto crítico, M indica a composição global do sistema, T indica a composição da fase de topo e F indica a composição da fase de fundo. .... | 26 |
| Figura 3 – Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas. ....                                                                                                                                     | 28 |
| Figura 4 – Filtração convencional e filtração tangencial. ....                                                                                                                                                                                                 | 30 |
| Figura 5 – (a) Diafiltração no modo contínuo e (b) no modo descontínuo. ....                                                                                                                                                                                   | 32 |

### **ARTIGO 1: Maximização da purificação de queratinase por sistema aquoso bifásico**

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Micro-organismo <i>Bacillus</i> sp. P45, aumento de 1000 x. ....                                                                                                                                         | 40 |
| Figura 2 – Diagrama de fases para o sistema aquoso bifásico PEG 1500 Da-fosfato de potássio pH 7,0. Onde (●) representa os dados de Minami (1997) e (□) representa as concentrações utilizadas neste trabalho. .... | 45 |
| Figura 3 – (a) Curva de contorno para o fator de purificação e (b) recuperação enzimática. ..                                                                                                                       | 53 |
| Figura 4 – Sobreposição das curvas de contorno para o fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (% Rec) em função da concentração de PEG e NaCl. ....                                                      | 55 |
| Figura 5 – Diagrama esquemático para a purificação de queratinase de <i>Bacillus</i> sp. P45. ....                                                                                                                  | 60 |

### **ARTIGO 2: Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico na purificação da enzima queratinase**

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Diagrama esquemático dos <i>designs</i> utilizados na integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico. ....                            | 69 |
| Figura 2 – Módulo de ultrafiltração/diafiltração utilizado na purificação da enzima queratinase. ....                                                                  | 70 |
| Figura 3 – Fator de retenção do PEG e fluxo médio do permeado em função do número de ciclos durante o processo de diafiltração na ausência do extrato enzimático. .... | 76 |
| Figura 4 – Fluxo médio do permeado e fatores de retenção de PEG e atividade enzimática no processo de diafiltração para o <i>design</i> 1. ....                        | 77 |
| Figura 5 – Fatores de retenção de PEG e de atividade enzimática durante o processo de diafiltração para o <i>design</i> 2. ....                                        | 79 |
| Figura 6 – (a) Zimograma e (b) eletroforese das frações extrato enzimático bruto (EE), <i>designs</i> 1 e 2 e marcador (M). ....                                       | 82 |
| Figura 7 – Atividade enzimática relativa (%) da enzima purificada ( <i>design</i> 2) em função da temperatura. ....                                                    | 83 |



**CAPÍTULO I**  
**RESUMO, ABSTRACT E INTRODUÇÃO GERAL**



## RESUMO

Resíduos ricos em queratina são insolúveis e resistentes à degradação por diversas enzimas proteolíticas. Em decorrência disso, a biodegradação da queratina é restrita a certo número de micro-organismos, dentre os quais se destacam as bactérias do gênero *Bacillus*. As queratinases são proteases intra ou extracelulares produzidas por estes micro-organismos. Possuem inúmeras aplicações de interesse industrial, podendo ser empregadas na produção de peptídeos de queratina, na degradação de príons, na indústria farmacêutica, entre outras. A aplicação industrial da enzima queratinase demanda técnicas de purificação eficientes e passíveis de ampliação em larga escala. Dentre as técnicas de purificação passíveis de ampliação de escala e de baixo custo se destacam o sistema aquoso bifásico (SAB) e a ultrafiltração (UF). A presente dissertação foi dividida em dois artigos. No primeiro artigo, a purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus* sp. P45 foi maximizada utilizando duas etapas de SAB. Na primeira etapa de purificação, o sistema formado por 3% de polietilenoglicol 1500 Da, 23% de fosfato de potássio (pH 7,0) e 8% (m/m) de NaCl particionou a enzima para a fase de topo obtendo fatores de purificação na ordem de 4,4 vezes e recuperação enzimática de 87%. A fase de topo, contendo a enzima de interesse, foi submetida à segunda etapa do sistema aquoso bifásico. Este sistema foi composto por 36% fase de topo (1ª etapa do SAB), 28% de sulfato de amônio, 36% (m/m) de tampão Tris-HCl (pH 7,0), a enzima foi particionada para a fase de topo, onde fatores de purificação na ordem de 5,6 vezes e recuperações de 90% foram obtidos. No segundo artigo, o SAB foi integrado à ultrafiltração/diafiltração, e avaliou-se a aplicação da enzima bruta e purificada em diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis. A enzima purificada por duas etapas de SAB seguida de diafiltração (*design* 2) apresentou fator de purificação na ordem de 6,1 vezes e recuperação enzimática de 56,3%. Durante o processo de diafiltração foi possível separar a enzima do polietilenoglicol. A enzima purificada pelo *design* 2 apresentou atividade ótima na temperatura de 50°C e foi capaz de catalisar com maior eficiência a degradação de diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis quando comparada à enzima bruta, justificando sua purificação.

**Palavras-chave:** queratina, polietilenoglicol, purificação, diafiltração, proteólise.

## ABSTRACT

Keratin-rich waste are insoluble and resistant to degradation by various proteolytic enzymes. As a result, the biodegradation of keratin is restricted to certain microorganisms, among which highlighting the *Bacillus*. Keratinases are intra or extracellular proteases produced by these microorganisms. These enzymes exhibit numerous of industrial applications, can be used to produce keratin peptides, degradation of prions, pharmaceutical industry, among others. The keratinase industrial application demand efficient and scale-up purification techniques. Among the scale-up and low-cost purification techniques, the aqueous two-phase system (ATPS) and ultrafiltration (UF) stand out. This work was divided into two articles. In the first article, the purification of keratinase from *Bacillus* sp. P45 by two steps of ATPS was optimized. In the first step of ATPS purification, the system formed by 3% polyethylene glycol 1500 Da, 23% of potassium phosphate (pH 7.0) and 8% (w/w) NaCl promoted the partition of enzyme to top phase with purification factor of 4.4 fold and enzymatic recovery of 87%. The top phase containing the target enzyme was submitted to the second step of the ATPS. This system was composed of 36% top phase (1<sup>st</sup> step of ATPS), 28% ammonium sulfate, 36% (w/w) of tris-HCl buffer (pH 7.0). The enzyme was partitioned for top phase and were obtained purification factor of 5.6 fold and enzymatic recovery of 90%. In the second article, the ATPS was integrated to ultrafiltration/diafiltration, and crude and purified enzymes were applying in soluble and insoluble protein substrates. The enzyme purified by two steps of ATPS followed by diafiltration (design 2) presented purification factor of 6.1 fold and enzymatic recovery of 56.3%. During the diafiltration, it was possible to separate the enzyme from polyethylene glycol. The purified enzyme showed optimum activity in temperature of 50°C and was able to more efficiently catalyze the degradation of soluble and insoluble protein substrates as compared to crude enzyme, justifying its purification.

**Keywords:** keratin, polyethylenoglycol, purification, diafiltration, proteolysis.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas se apresenta como uma alternativa viável frente aos processos convencionais que utilizam catalisadores químicos, principalmente em virtude da demanda por tecnologias que não causem problemas ambientais. As queratinases são proteases produzidas por micro-organismos que apresentam capacidade de degradar a queratina. Estas enzimas distinguem-se das outras proteases por uma maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como, por exemplo, a queratina (ONIFADE et al., 1998).

Nos últimos anos, as queratinases microbianas têm atraído à atenção de muitos pesquisadores na área biotecnológica, uma vez que possuem inúmeras aplicações de interesse industrial, tais como: depilação do couro (PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMULU, 2010), indústria de detergentes (RAI, KONWARH, MUKHERJEE, 2009; XIE et al., 2010), indústria farmacêutica (MOHORCIC et al., 2007), degradação de príons (LANGEVELD et al., 2003; WANG et al., 2005; YOSHIOKA et al., 2007) e mais recentemente, na produção de peptídeos de queratina com atividade antioxidante (FAKHFAKH et al., 2012). Além disso, as queratinases podem converter a queratina presente em resíduos queratinosos, como as penas, aumentando o valor nutricional da farinha de penas (ONIFADE et al., 1998).

Os processos tradicionais para purificação dessa enzima geralmente envolvem técnicas como a cromatografia de troca iônica e de gel-filtração. Essas técnicas são dispendiosas, trabalhosas e consomem tempo, sendo normalmente adequadas para produzir pequenas quantidades (GALLO et al., 2005; NAJAFI, KEMBHAVI, 2005) e eficientes quando se deseja caracterizar ou ainda estudar as propriedades catalíticas do bioproduto. Porém, quando o objetivo é aplicar industrialmente a enzima é necessário um protocolo com técnicas de purificação mais eficientes, menos dispendiosas e passíveis de ampliação de escala. Os métodos não-cromatográficos podem ser uma alternativa às etapas cromatográficas, principalmente quando a obtenção de bioprodutos com alto grau de pureza não é requerida. Dentre os métodos não-cromatográficos destacam-se as técnicas de sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração (UF).

A grande versatilidade oferecida pelo SAB, o qual explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros quimicamente diferentes e hidrossolúveis, ou um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas (MINAMI, 1997; ALBERTSSON, 1986), torna o estudo desta técnica potencialmente atrativa para a purificação de enzimas. A enzima de interesse migra para uma

das fases, enquanto que parte dos contaminantes migra para a fase oposta, promovendo assim a sua purificação. Diversos fatores, como a concentração de polietilenoglicol (PEG) e de fosfato de potássio e a adição de cloreto de sódio (NaCl) ao sistema podem influenciar a partição das proteínas no sistema e consequentemente a purificação de queratinase.

Após o particionamento da biomolécula para uma das fases, esta pode ser separada, concentrada e purificada utilizando a ultrafiltração. A UF é um processo de separação por membranas baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas de solutos em membranas semipermeáveis, poliméricas ou inorgânicas, utilizando como força motriz, para a transferência de massa através da membrana, a pressão mecânica (HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006). A UF opera em pressões e temperaturas relativamente baixas e não envolve mudanças de fase ou aditivos químicos, minimizando a extensão da desnaturação, desativação e degradação de produtos biológicos (CHARCOSSET, 2006; ZEMAN, ZYDNEY, 1996).

Além disso, a UF pode ser operada em modo de diafiltração, a qual contribui para uma melhor separação e é frequentemente utilizada para melhorar a pureza do soluto. Na diafiltração o volume de alimentação é mantido constante por adição de solvente (água ou tampão). A alimentação é diluída com adição de solvente para reduzir a concentração dos componentes permeáveis e para removê-los através da permeação pela membrana (WANG, ZHANG, OUYANG, 2002).

Com base na importância de estabelecer um protocolo eficiente de purificação de biomoléculas, este trabalho teve por objetivo a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração/diafiltração.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Purificar a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 utilizando sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração, visando obter um produto de maior pureza e rendimento.

### 2.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito da concentração de PEG, fosfato de potássio e cloreto de sódio (NaCl) no sistema aquoso bifásico PEG 1500 Da-fosfato de potássio pH 7,0;
- Maximizar a partição da enzima queratinase no sistema aquoso bifásico através de planejamento experimental;
- Estudar o efeito da concentração de sulfato de amônio e do diluente na segunda etapa de purificação por SAB;
- Integrar a ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico, visando a purificação da enzima queratinase bem como a separação do PEG da enzima;
- Avaliar a aplicação da enzima bruta e purificada em diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

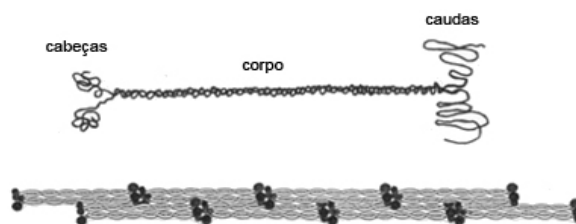
#### 3.1. Queratinas

As queratinas, proteínas estruturais fibrosas conhecidas como escleroproteínas, são produzidas nas células epiteliais de vertebrados superiores (répteis, aves e mamíferos) e humanos, atuando como barreira mecânica e protetora, uma vez que se apresentam como constituinte majoritário da pele e seus apêndices (pelos, penas, unhas, cascos, chifres e escamas) (FRASER MACRAE, ROGERS, 1972; JONES et al., 1997).

Estas proteínas são resistentes a fatores ambientais, físicos e químicos, e não são efetivamente degradadas por proteases comuns, como tripsina ou pepsina (BRANDELLI, 2008); são insolúveis em água, soluções salinas, ácidos diluídos e alcalinos a temperatura ambiente (SHIAH, 1979). Estas distintas propriedades das queratinas frente a outras moléculas são consequência do empacotamento da cadeia proteica em estruturas de  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -pregueada ( $\beta$ -queratina) e do elevado nível de enovelamento da cadeia polipeptídica. Além disso, apresenta alto grau de ligações inter e intracadeia através da formação de ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (PARRY, NORTH, 1998).

Dentro de cada cadeia polipeptídica, o corpo helicoidal ou região central da queratina contém cerca de 310 aminoácidos, sendo este flanqueado nas suas extremidades (regiões terminais) por domínios não helicoidais denominados ‘cabeça’ e ‘cauda’, sendo estas regiões terminais responsáveis pela conformação flexível da queratina (COHLBERG, 1993). As regiões terminais são mais ricas em resíduos de cisteína do que a região central. Assim, a associação destes resíduos permite a formação de um arranjo com uma conformação de superespiralamento das cadeias em paralelo umas sobre as outras, de maneira a formar uma estrutura filamentar (JONES et al., 1997). A Figura 1 apresenta o modelo da estrutura da queratina.

**Figura 1** – Estrutura da queratina.



**Fonte:** BRANDELLI, 2008.

As queratinas podem se dividir em ‘*rígidas*’ ou ‘*leves*’ de acordo com o conteúdo de cisteína. Queratinas ‘*leves*’ apresentam um baixo conteúdo de cisteína (inferior a 2%), ligações cruzadas fracas e baixa resistência a fatores químicos, sendo encontradas na camada externa da pele e no centro do cabelo (FRASER, MACRAE E ROGERS, 1972; KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, BOHACZ, 2011). Por outro lado, as queratinas ‘*rígidas*’ apresentam um alto conteúdo de cisteína (até 22%) e são encontradas no cabelo, unhas, garras, chifres, penas, bicos e pele (MARCHISIO, FUSCONI, QUERIO, 2000).

A cadeia polipeptídica presente na queratina das penas é observada em ambas as configurações ( $\alpha$ - e  $\beta$ -queratina) e a relação encontrada nas penas é de 2:1, respectivamente (FRASER, MACRAE, ROGERS, 1972).

### 3.2. Proteases

Proteases (EC 3.4), também denominadas peptidases ou proteinases, são enzimas com a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas, causando alterações irreversíveis ou destruição dos substratos, que do ponto de vista biológico podem ser importantes, principalmente nos processos fisiológicos, patológicos e também tecnológicos (BARRET, RAWLINGS, O'BRIEN, 2001).

As proteases são encontradas em todos os organismos vivos existentes, podendo ser obtidas de diferentes fontes. Papaína e bromelina representam proteases de origem vegetal, enquanto que tripsinas, quimiotripsinas, pepsinas e reninas são as mais conhecidas proteases de origem animal (BOYER, 1971; RAO et al., 1998). Em contrapartida, ambas as fontes requerem um processo de obtenção demorado, pois dependem da disponibilidade de área para cultivo e condições climáticas ou da disponibilidade de animais para o abate (RAO et al., 1998).

As proteases de origem vegetal e animal são incapazes de atender a demanda mundial. Neste sentido, há um enorme interesse em proteases de origem microbiana, visto que os micro-organismos apresentam um rápido crescimento e requerem pouco espaço para o seu cultivo. Além disso, as proteases microbianas, de um modo geral, são mais estáveis quando comparadas com seus homólogos de origem vegetal e animal (RAO et al., 1998).

Os micro-organismos produzem uma grande variedade de proteases, as quais podem ser intracelulares e/ou extracelulares. As proteases intracelulares participam de vários processos celulares e metabólicos, enquanto que as extracelulares são importantes na nutrição através da hidrólise de proteínas, facilitando a absorção dos produtos pelas células (GUPTA et

al., 2002; KALISZ, 1988). Além disso, as proteases extracelulares têm sido comercialmente utilizadas na degradação de proteínas em processos industriais (KUMAR E TAKAGI, 1999).

As proteases formam um complexo grupo de enzimas, que variam enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (RAO et al., 1998). A classificação destas enzimas não ocorre de forma satisfatória através de métodos utilizados para a maioria das enzimas, uma vez que todas as proteases catalisam basicamente a mesma reação – hidrólise de ligações peptídicas (BARRET, RAWLINGS, O'BRIEN, 2001). Contudo, estas são classificadas segundo critérios básicos: **(i)** tipo de reação catalisada, em endo ou exoprotease, dependendo do local de clivagem em relação às regiões terminais do substrato; **(ii)** pH de atividade ótimo em proteases ácida, neutras ou alcalinas; **(iii)** natureza química do sítio catalítico em serino, cisteína, aspartil, treonino ou metaloproteases; e **(iv)** relações evolutivas a respeito de sua estrutura (GUPTA et al., 2002; RAO et al., 1998).

As proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total de vendas mundial de enzimas em vários setores industriais (MEHRNOUSH et al., 2011). Estas enzimas podem ser utilizadas como componentes na indústria de detergentes, na indústria de alimentos, couro, tratamento de resíduos, biorremediação, síntese de peptídeos, na indústria de produtos farmacêuticos, entre outras aplicações (SINGH et al., 2010; SYNOWIECKI, 2010; VERMA et al., 2011).

Somando-se a isso, as proteases microbianas extracelulares são diretamente excretadas no meio de cultivo, simplificando os processos de *downstream* da enzima quando comparado às proteases intracelulares (GUPTA et al., 2002).

### 3.2.1. Queratinases

As proteases intra ou extracelulares produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases (EC 3.4.21-24/99). Estas enzimas distinguem-se das outras proteases por uma maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como, por exemplo, a queratina. A maior parte das queratinases são enzimas indutivas, as quais exigem a presença de queratina como indutor exógeno (ONIFADE et al., 1998).

Queratinases de vários micro-organismos têm sido purificadas e caracterizadas, sendo que a maior parte destas são serino proteases (BRANDELLI, DAROIT, RIFFEL, 2010; GUPTA et al., 2002), enquanto que algumas metaloproteases tem mostrado atividade queratinolítica (RIFFEL et al., 2007; THYS, BRANDELLI, 2006).

As características destas enzimas têm se mostrado bastante diversificada dependendo do micro-organismo produtor. A caracterização da enzima possibilitou encontrar enzimas de massas molares de 18 kDa (BRESSOLIER et al., 1999) até superiores a 200 kDa (BERNAL, CAIRÓ, COELHO, 2006), com pH ótimo de atividade também variando de 6,0 (BRESSOLIER et al., 1999) a 10 (BERNAL, CAIRÓ, COELHO, 2006) e temperatura ótima de 40°C (BERNAL, CAIRÓ, COELHO, 2006) até 80°C (FRIEDRICH, ANTRANIKIAN, 1996).

### 3.2.2. Aplicações das queratinases

As queratinases microbianas são consideradas biocatalisadores promissores para aplicação na alimentação animal, fertilizantes, detergentes, couro, indústria têxtil, farmacêutica e biomédica. Apesar disso, ao comparar a aplicação industrial e, conseqüentemente, a demanda no mercado de queratinases com outras enzimas industriais, é possível notar que esta ainda se encontra em estágio inicial (RAI, KONWARH, MUKHERJEE, 2009). A Tabela 1 apresenta um resumo das aplicações industriais.

**Tabela 1** – Aplicações das queratinases microbianas.

| Área                      | Aplicações                                                                                                                                 | Referência                                                                                                                                             |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agroindústria             | Produção de hidrolisados proteicos;<br>Suplementação da ração animal;<br>Degradação de penas,<br>Fertilizantes na liberação de nitrogênio. | CAO et al., 2008; ICHIDA et al., 2001; KHARDENAVIS, KAPLEY, PUROHIT, 2009; SYED et al., 2009; VASILEVA-TONKOVA, GOUSTEROVA, NESHEV, 2009               |
| Farmacêutica<br>Biomédica | Hidrólise de príons;<br>Tratamento dermatológico.                                                                                          | LANGEVELD et al., 2003; MOHORCIC et al., 2007; WANG et al., 2005; YOSHIOKA et al., 2007                                                                |
| Indústria                 | Tratamento do couro;<br>Modificação de fibras (têxtil);<br>Detergentes.                                                                    | CAO et al., 2009; FRIEDRICH et al., 2005; KONWARH et al., 2009; PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMUL, 2010; RAI, KONWARH, MUKHERJEE 2009; XIE et al., 2010; |
| Biomassa<br>Bioenergia    | Bioconversão de resíduo queratinoso para produção de biohidrogênio.                                                                        | BÁLINT et al., 2005                                                                                                                                    |

A indústria avícola gera elevadas quantidades de penas, as quais atingem milhões de toneladas por ano no mundo. As penas são convertidas em farinha de penas através da cocção hidrotérmica sob alta pressão, porém, este processamento requer elevado gasto energético e o

produto final é utilizado como suplemento de proteína na dieta animal em uma base limitada, devido à baixa digestibilidade e valor nutricional (ONIFADE et al., 1998; PAPADOPOULOS et al., 1986). Em contraposição ao tratamento convencional, o processamento biotecnológico de penas para a produção de ração animal oferece vantagens relacionadas ao enriquecimento proteico porque não destrói aminoácidos essenciais e não forma derivados de aminoácidos não-assimiláveis, além de representar uma sensível economia de energia (DALEV, IVANOV, LIUBOMIROVA, 1997; ONIFADE et al., 1998). Recentemente, Fakhfakh et al. (2012) verificaram que o hidrolisado proteico de penas obtido através do cultivo com uma bactéria queratinolítica apresentou atividade antioxidante, indiciando que este pode ser utilizado como suplemento de proteínas e de antioxidantes na formulação da ração animal.

Além disso, estudos sugerem que o hidrolisado de penas é um produto potencialmente útil como fertilizante, devido ao teor de nitrogênio, que atinge cerca de 15% (ICHIDA et al., 2001). As enzimas queratinolíticas que não apresentam atividade colagenolítica são exploradas na indústria do couro, particularmente para o processo depilatório, representando uma alternativa ao processamento convencional o qual utiliza sulfeto (PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMUL, 2010).

Na indústria farmacêutica, as queratinases podem ser utilizadas para aumentar a permeabilidade de medicamentos nas unhas (MOHORCIC et al., 2007). Enquanto que na indústria biomédica podem ser utilizadas para a degradação de príons, estruturas proteicas que causam doenças neurodegenerativas fatais em animais e humanos (LANGEVELD et al., 2003; WANG et al., 2005; YOSHIOKA et al., 2007).

As queratinases que apresentam atividade e estabilidade em pH alcalino, baixa a moderadas temperaturas, compatibilidade com detergentes e surfactantes possibilitam o seu uso como aditivo em formulações de detergentes (RAI, KONWARH, MUKHERJEE, 2009; XIE et al., 2010). Também encontra-se aplicações na indústria têxtil, devido à sua capacidade de modificar as fibras das proteínas da lã (KONWARH et al., 2009; PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMUL, 2010).

### **3.3. Micro-organismos queratinolíticos**

Apesar das moléculas de queratinas serem altamente estáveis e resistentes à maioria das proteases, verifica-se que não há acúmulo na natureza, confirmando a existência de micro-organismos produtores de enzimas capazes de degradar a queratina (ONIFADE et al., 1998). Estes micro-organismos são chamados de queratinolíticos e podem crescer em diferentes

condições ecológicas e ambientais. As enzimas queratinolíticas têm sido produzidas por fungos (SANTOS et al., 1996), actinomicetos (BÖCKLE, GALUNSKI, MÜLLER, 1995) e bactérias, geralmente isolados de solos onde materiais queratinosos são depositados (RIFFEL, BRANDELLI, 2006).

Embora inicialmente estas enzimas tenham sido estudadas em fungos, nos últimos anos elas têm sido produzidas e caracterizadas de procariotos representados por vários gêneros de bactérias, preferencialmente aquelas com certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Estes trabalhos levaram ao isolamento de diferentes gêneros de bactérias, a partir de resíduos das indústrias avícolas e do solo em que se encontram, capazes de produzir diferentes queratinases (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009; ICHIDA et al., 2001; RIFFEL, BRANDELLI, 2002, 2006; WILLIAMS et al., 1990; ZAGHLOUL, AL-BAHRA, AL-AZMEH, 1998), de um modo que os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* se destacam pelo alto potencial queratinolítico (BRESSOLIER et al., 1999; DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009; ZAGHLOUL, EMBABY, ELMAHD, 2011).

### 3.3.1. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia, com forma de bastonetes, Gram-positivos, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo na sua maioria catalase positiva. *Bacillus* são micro-organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como: alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para o cultivo; capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e a certificação GRAS fornecida pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para algumas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004).

O gênero *Bacillus* é considerado como um dos maiores produtores de enzimas industriais, incluindo espécies encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas como participante da microbiota intestinal (CHANTAWANNAKUL et al., 2002; MAURER, 2004).

Dentre os potenciais micro-organismos queratinolíticos, a bactéria *Bacillus* sp. P45 foi reportada por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) pela eficiente degradação de penas de frango (cerca de 90% após 72 h), produção de proteases queratinolíticas extracelulares e também pela capacidade de reduzir pontes dissulfeto. A produção de queratinases por esta cepa em cultivo submerso foi investigada, onde a maior produção enzimática foi obtida quando se utilizou farinha de pena como substrato, representando um meio de cultivo de baixo custo para a produção de queratinases (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2011). Esta enzima foi

purificada através de técnicas de precipitação, filtração em gel e cromatografia de troca iônica, e caracterizada quanto à temperatura e pH ótimo, sendo estes de 55°C e 8,0, respectivamente (DAROIT et al., 2010).

### 3.4. Separação e purificação de proteínas

Na indústria biotecnológica, após o cultivo, é necessário que o bioproduto de interesse seja recuperado e purificado. Esta etapa, a qual engloba diversas operações de extração, concentração e purificação, é também conhecida como *downstream processing*, podendo representar cerca de 50-90% do custo final do bioproduto dependendo do grau de pureza requerido (AZEVEDO et al., 2009; DIAMOND, HSU, 1992). Portanto, para a produção de enzimas ou proteínas comerciais é de extrema importância o desenvolvimento de um processo de *downstream* eficiente e de baixo custo, que consiga atingir alto rendimento e pureza desejados do bioproduto em questão, mantendo a sua atividade biológica.

A escolha do método de purificação depende da localização da proteína alvo e da pureza requerida do produto, a qual também é determinada pela sua utilização. Neste sentido, tem sido demonstrado que é possível utilizar o sistema aquoso bifásico como etapa inicial de *downstream*, uma vez que esta é capaz de separar e concentrar simultaneamente a proteína alvo (ALBERTSSON, 1986; COSTA, PESSOA-JR, ROBERTO, 2000; KRONER, HUSTEDT, KULA, 1984).

Após a partição da biomolécula no sistema aquoso bifásico para uma das fases é necessário à separação do polímero e/ou do sal. Neste sentido, a ultrafiltração é um processo atraente de separação por membranas que pode ser integrado ao sistema aquoso bifásico, uma vez que podem ser operados em baixas temperaturas e são extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de aumento de escala.

#### 3.4.1. Sistema aquoso bifásico

Sistemas contendo duas fases líquidas em equilíbrio termodinâmico são muito úteis para aplicações em extração e/ou purificação de biocompostos (proteínas, enzimas, células, vírus, organelas) presentes em inúmeros processos tecnológicos (CHOUYYOK et al., 2005). Porém, para aplicação desta técnica é necessário a utilização de sistemas em que as duas fases apresentam semelhanças em termos de propriedades físico-químicas com o meio aquoso presente nos seres vivos (SELBER et al., 2004).

A formação do sistema aquoso bifásico é conhecida desde o final do século XIX. Em 1896, Beijerinck descobriu que soluções aquosas de gelatina e ágar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, formavam misturas turvas que, em repouso, separavam espontaneamente em duas fases líquidas límpidas. A fase mais densa era enriquecida em ágar (ou amido) e a fase superior em gelatina, sendo que a água era o componente majoritário em ambas as fases. Porém, foi apenas com os trabalhos de Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente a grande potencialidade de aplicação destes sistemas na partição/purificação de materiais biológicos – desde proteínas até células (DA SILVA, LOH, 2000).

O sistema aquoso bifásico é formado por dois polímeros ou um polímero e sal incompatíveis em solução aquosa (ALBERTSSON, 1986) e a separação espontânea das fases ocorre sempre que concentrações críticas são atingidas, resultando em duas fases (ALBERTSSON, 1970).

Apesar da grande variedade de sistemas de duas fases aquosas, a quantidade de sistemas realmente aplicáveis para extração líquido-líquido fica reduzida basicamente aos formados por PEG-dextrana e PEG-sal (fosfato, citrato e sulfato) (SINHA, DEY, PANDA, 2000). A fase mais leve é rica em PEG, enquanto que a fase mais pesada é enriquecida com dextrana ou sais. Como o solvente é a água em ambas as fases, entre 70-90%, estes sistemas fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas, evitando mudanças em suas estruturas e perda da atividade biológica (SCHMIDT, VENTOM, ASENJO, 1994). Quando fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo, possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação das fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade, faixa de aplicação, elevada seletividade das proteínas são considerados, o SAB composto por PEG-sal prevalece, uma vez que apresenta baixo custo e menor tempo de separação das fases, em relação ao sistema PEG-dextrana (RAGHAVARAO, 1995).

Dentre as vantagens desta técnica, destaca-se: **(i)** facilidade em prever o *scale up* através de ensaios em laboratório; **(ii)** transferência de massa e o equilíbrio das fases são atingidos rapidamente, o que reduz os gastos com energia; **(iii)** os polímeros estabilizam as enzimas e **(iv)** a separação é seletiva e rápida.

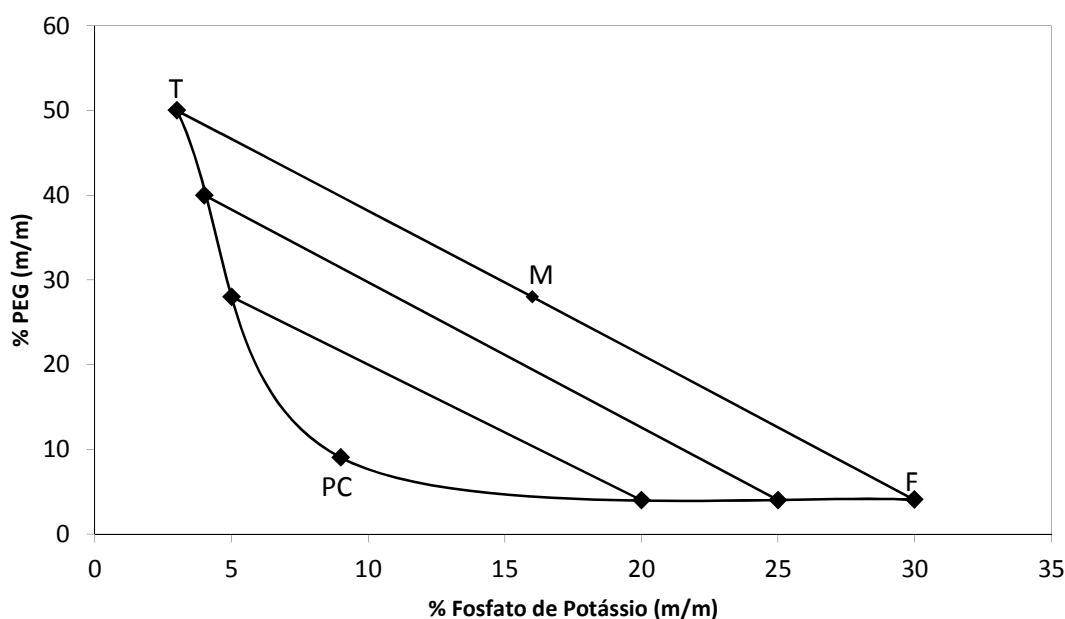
#### **3.4.1.1. Diagrama de fases**

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. O diagrama de fases apresenta a região monofásica e bifásica de acordo com a

concentração de cada componente, expressa em % (m/m) devido à alta viscosidade das soluções poliméricas, que poderiam causar erros caso as concentrações fossem expressas em volumes (MINAMI, KILIKIAN, 1998).

A Figura 2 apresenta um diagrama de fases genérico, onde a abscissa representa a concentração de sal e a ordenada, a concentração do polímero presente no sistema. O diagrama é designado pela curva binodal (T-PC-F), a qual separa a área de formação de duas fases aquosas (acima da curva binodal) da área de uma fase aquosa (abaixo da curva binodal). A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio. Existem diferentes métodos para obtenção da linha binodal, sendo geralmente utilizado o de titulação turbidimétrica (ALBERTSSON, 1986).

**Figura 2** – Diagrama de fases genérico de um sistema aquoso bifásico formado por um polímero e um sal, onde PC é o ponto crítico, M indica a composição global do sistema, T indica a composição da fase de topo e F indica a composição da fase de fundo.



**Fonte:** SINHA, DEY, PANDA 2000.

Além dessas informações, o diagrama de fases fornece a composição exata da fase de topo e de fundo, sendo que esta informação está na linha de amarração (linha T-M-F). O ponto M indica a composição global do sistema, enquanto que os pontos T e F fornecem as composições exatas das fases de topo e fundo, respectivamente. Todas as misturas com composições globais pertencentes a uma mesma linha de amarração fornecerão fases superiores com composições idênticas, porém com volumes diferentes. O mesmo princípio aplica-se às

fases inferiores. O ponto PC no diagrama de fases representa o ponto crítico, onde a composição e o volume das duas fases teoricamente são iguais (ALBERTSSON, TJERNELD, 1994).

#### **3.4.1.2. Fatores que influenciam o diagrama de fases**

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e consequentemente alteram o diagrama de fases são: a massa molar do polímero e da proteína, a temperatura, a concentração dos componentes do sistema, o pH do sistema, o tipo de sal, sais dissolvidos e a concentração de proteínas (ALBERTSSON, 1986).

Quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração necessária para a formação de duas fases. Isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que a massa molar do polímero aumenta. Para um sistema polímero-polímero (PEG/dextrana) a curva binodal torna-se cada vez mais assimétrica à medida que a diferença entre as massas molares dos polímeros aumenta. A massa molar do polímero afeta o tempo de separação das fases, mas tal problema pode ser minimizado pela centrifugação do sistema após a mistura das fases (ALBERTSSON, TJERNELD, 1994). A massa molar do polímero afeta também o comprimento da linha de amarração, que tende a aumentar com o aumento da concentração dos polímeros (FORCINITI, HALL, KULA, 1991).

A concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes (ALBERTSSON, 1970).

A temperatura causa influência no diagrama de fases, pois altera a composição das fases no equilíbrio, desloca a curva binodal e modifica também o comprimento da linha de amarração. Em geral, o comprimento da linha de amarração diminui com o aumento de temperatura. O seu efeito varia de acordo com o tipo de sistema. No caso de sistemas PEG/dextrana, a formação das fases é facilitada em temperaturas baixas (menores que a ambiente) e para os sistemas PEG/fosfato, a situação é oposta, pois temperaturas mais altas e próximas do ambiente facilitam a separação entre as fases. O aumento da temperatura no sistema causa, ainda, em um sistema PEG/sal, aumento na concentração de PEG na fase polimérica e redução da sua concentração na fase salina. Esse efeito é uma das razões de se trabalhar com a temperatura do sistema fixa (MINAMI, 1997).

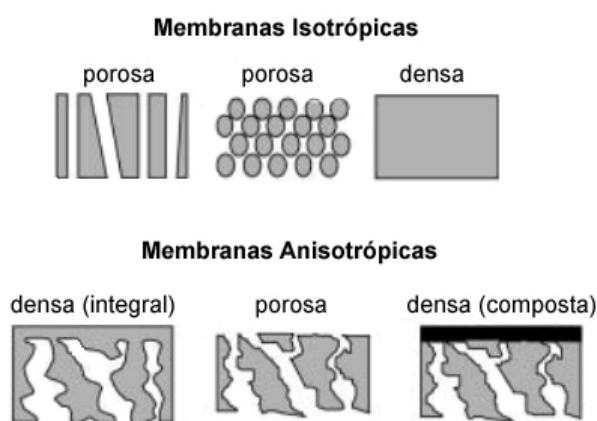
### 3.4.2. Processo de separação por membranas

Os processos de separação por membranas, em sua grande maioria, promovem a separação sem que ocorra mudança de fase. De uma maneira geral, uma membrana pode ser definida como uma barreira que separa duas fases e restringe, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas presentes nas fases. Quando o objetivo é a concentração, a fração retida será o produto final. Porém, no caso de purificação, tanto a fração retida quanto a permeada podem conter o produto desejado, dependendo das impurezas que se quer eliminar (MULDER, 1996).

Os processos com membranas são aplicados na separação de substâncias termossensíveis, tendo em vista que podem ser operados à temperatura ambiente e a baixas temperaturas. Além disso, apresentam a vantagem de ser extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de ampliação de escala (BAKER, 2004).

De um modo geral as membranas podem ser classificadas em duas grandes categorias: densas e porosas. Tanto as membranas densas quanto as porosas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, ou seja, podem ou não apresentar as mesmas características morfológicas ao longo de sua espessura (Figura 3) (HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006).

**Figura 3** – Representação esquemática da seção transversal dos diferentes tipos de morfologia de membranas sintéticas.



**Fonte:** HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006

Para que ocorra o transporte de uma espécie através de uma membrana é necessário a existência de uma força motriz agindo sobre a mesma. Os processos comerciais de separação utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico e/ou o gradiente de potencial

elétrico. Como os processos com membranas são, em sua grande maioria, atérmicos, o gradiente de potencial químico pode ser expresso apenas em termos do gradiente de pressão e de concentração (ou de pressão parcial) (PESSOA-JR, KILILIAN, 2005).

A morfologia da membrana definirá, também, os principais parâmetros responsáveis por sua capacidade seletiva. Assim, em processos que utilizam membranas porosas, a capacidade seletiva está diretamente associada à relação entre o tamanho das espécies presentes e o tamanho dos poros da membrana. Esse é o caso de processos como a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e a diálise. Além disso, as espécies presentes devem ser, na medida do possível, inertes em relação ao material que constitui a membrana (PESSOA-JR, KILILIAN, 2005).

#### **3.4.2.1. Ultrafiltração**

Dentre os processos de separação com membranas destaca-se a ultrafiltração (UF), que é uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das macromoléculas (GHOSH, CUI, 1998). A ultrafiltração é comumente utilizada para a recuperação de macromoléculas e retenção de partículas e coloides suspensos, sendo integrada em ambos processos de *downstream* e *upstream*. A ultrafiltração tem potencial aplicação para concentrar proteínas, sistema de troca de tampão, clarificar suspenções celulares e esterilizar líquidos removendo bactérias e vírus (CHARCOSSET, 2006).

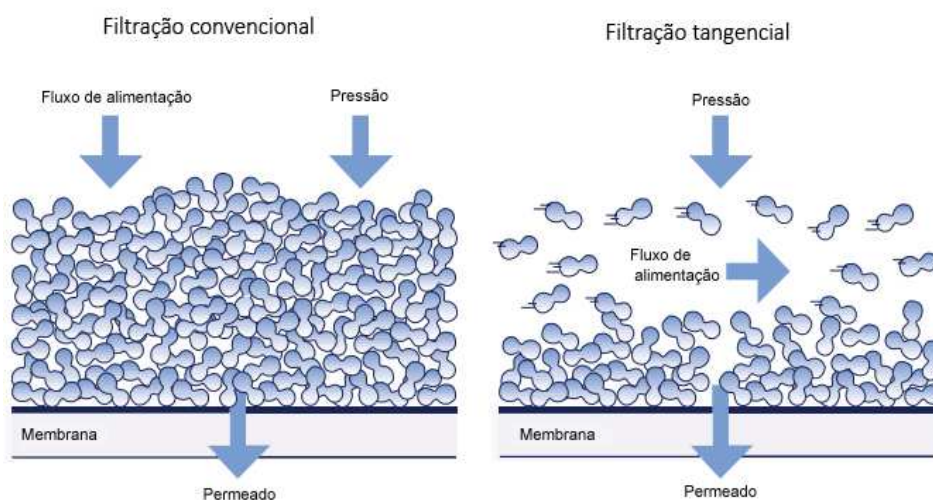
Estes sistemas podem ser aplicados às moléculas biológicas, uma vez que operam em temperaturas e pressões relativamente baixas, não envolve mudança de fases, minimizando assim a desnaturação desativação e/ou degradação dos bioprodutos (ZEMAN, ZYDNEY, 1996). Assim, a UF pode ser aplicada em larga escala, tanto para a purificação como para o polimento de produtos biológicos, tais como enzimas, drogas terapêuticas e anticorpos (GHOSH, CUI, 1998).

A UF emprega membranas microporosas anisotrópicas, as quais possuem poros com diâmetros variando entre 1 e 500 nm. Assim, a ultrafiltração é capaz de reter macromoléculas em solução sendo, no entanto, permeáveis todos os solutos de baixa massa molar. O tamanho do poro define, em princípio a capacidade seletiva da membrana. Os fabricantes utilizam a chamada “massa molar limite” (*cut off*) para caracterizar uma membrana de ultrafiltração. O limite de retenção de uma membrana de ultrafiltração é definido como o valor da massa molar de uma macromolécula rejeitada em 95% pela membrana (HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006). As membranas de UF são moldadas a partir de uma variedade

de polímeros, como a polisulfona, polietersulfona e celulose regenerada, sendo essas de maior interesse em aplicações biotecnológicas (VAN REIS, ZYDNEY, 2001).

Na sua forma mais simples, a UF consiste em filtrar uma solução sob pressão através da superfície da membrana, podendo ser operada em escoamento tangencial ou convencional (Figura 4). Na operação do tipo convencional uma solução ou suspensão é pressionada contra a membrana. O solvente passa pela membrana e o soluto ou materiais em suspensão são retidos, acumulando-se próximo a superfície da membrana, fenômeno chamado polarização de concentração. Trata-se de um modo de operação fundamentalmente transiente, uma vez que a polarização aumenta sempre. Na filtração tangencial, a solução de alimentação escoia em paralelo à superfície da membrana, enquanto que o permeado é transportado transversalmente a esta. A polarização de concentração continua presente, mas é possível minimizar seu efeito (PESSOA-JR, KILILIAN, 2005).

**Figura 4** – Filtração convencional e filtração tangencial.



**Fonte:** MILLIPORE (2003).

Ao se processar uma solução ou uma suspensão, sem escoamento da alimentação (filtração convencional), o fluxo permeado decresce de modo contínuo com o tempo, em um comportamento tipicamente transiente. Já na operação com escoamento tangencial, o que se observa é uma queda inicial no fluxo permeado e um valor estável de fluxo a seguir, comportamento típico de operação em regime estabelecido. A queda inicial de fluxo se deve ao fenômeno de polarização de concentração, provocado pela retenção do soluto ou por material em suspensão. A polarização de concentração quando o sistema é operado em fluxo tangencial,

é um fenômeno que se estabelece rapidamente, no início da operação e, uma vez mantida a velocidade de escoamento, não se altera mais com o tempo (PESSOA-JR, KILILIAN, 2005).

A maior vantagem do processo de biosseparação por ultrafiltração sobre os processos convencionais é o alto rendimento do produto (GHOSH, CUI, 1998). No entanto, apesar do uso difundido da ultrafiltração em processos como a filtração e concentração, a potencial utilização desta técnica para o fracionamento de proteínas ainda não é explorado pela indústria biotecnológica. Isto se deve, principalmente, pela falta de compreensão dos mecanismos de separação envolvidos na ultrafiltração, sendo estes: interação soluto-soluto, interação soluto-membrana, polarização, transporte predominante do soluto (conectivo ou difusivo), entre outros vários fatores que podem ser responsáveis pelo fracionamento das proteínas (GHOSH, CUI, 2000). Outra característica que limita o uso industrial do processo de separação por membranas é a redução do fluxo do permeado através da membrana ao longo do tempo, devido à polarização de concentração e incrustações (*fouling*). A diminuição no desempenho da membrana pode ser revertida em caso de polarização de concentração, porém o fenômeno de incrustações na membrana é irreversível. A incrustação é caracterizada por obstrução dos poros devido à adsorção do soluto e deposição sobre a superfície da membrana e os poros (SAXENA et al., 2009). Estes efeitos não podem ser completamente eliminados, mas o uso de algumas estratégias no processo pode minimizá-lo.

O fracionamento de proteínas utilizando UF é um processo complexo e as condições deste sistema como a taxa de cisalhamento na superfície da membrana, a pressão, resistência da membrana, porosidade, morfologia e carga de superfície podem afetar o processo de separação destes bioprodutos (CHARCOSSET, 2006). Neste processo, a obtenção de boa resolução e alta produtividade é fortemente dependente das condições de operação e da diferença de tamanho entre as proteínas presentes (GHOSH, CUI, 2000).

A UF tem sido utilizada para a recuperação de uma gama de compostos, tais como lisozima a partir de ovos (GHOSH, SILVA, CUI, 2000), proteases e hidrolisados proteicos provenientes de vísceras de peixe (GILDBERG, 1992), proteases de atum (LI, YOURAVONG, H-KITTIKUN, 2006), proteínas do plasma sanguíneo de frango (TORRES et al., 2002) e proteínas do leite (HOLLAND, KACKMAR, CORREDIG, 2012).

#### **3.4.2.2. Diafiltração**

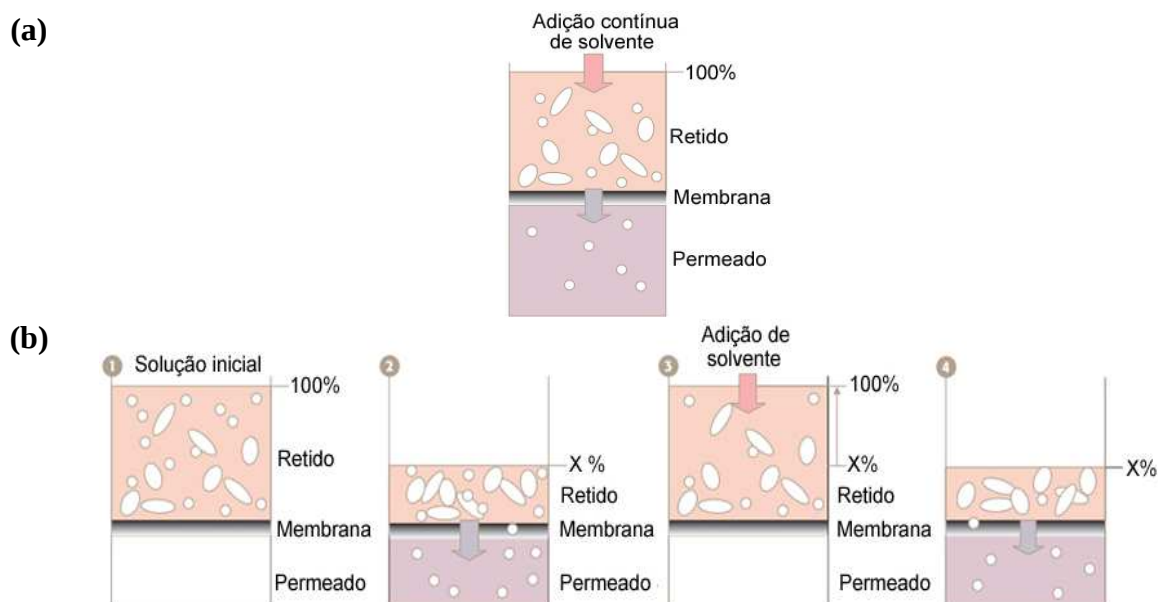
A diafiltração é um modo alternativo de operar os sistemas de micro, ultra e nanofiltração e mesmo de osmose inversa. A combinação da ultrafiltração com a diafiltração é

conhecida como uma técnica de purificação efetiva e rápida. Na indústria de alimentos, a diafiltração é comumente utilizada para purificar proteínas de origem vegetal (ASPELUND, GLATZ, 2010) e animal ou humana (BELHOCINE et al., 1998; GHOSH, SILVA, CUI, 2000). Enquanto que na indústria biotecnológica, é utilizada para concentrar enzimas e remover peptídeos, oligossacarídeos, sais e outras impurezas (VEIDE, LINDBÄCK, ENFORS, 1989).

Na verdade, a diafiltração pode ser entendida como um processo de purificação a volume constante. Industrialmente, a diafiltração é utilizada para manter o fluxo do permeado e melhorar a eficiência de extração. Neste processo, tampão ou água é adicionado à fração retida enquanto que, simultaneamente, ocorre a remoção dos microssolutos na fração permeada (NG, LUNDBLAD, GAUTAM, 1976). A diluição do extrato na alimentação promove a redução na concentração dos componentes permeáveis, facilitando assim a sua remoção através da membrana.

A diafiltração pode ser operada no modo contínuo ou descontínuo, conforme mostra a Figura 5. No modo contínuo, o diluente é adicionado ao retido na mesma vazão do permeado. Em contraste, no modo descontínuo, o diluente é adicionado em etapas a célula em vazões iguais ao permeado (FOLEY, 2006).

**Figura 5 – (a) Diafiltração no modo contínuo e (b) no modo descontínuo.**



**Fonte:** CDR (2004).

A diafiltração utiliza membranas de ultrafiltração para separar completamente açúcares, sais, enzimas, polímeros e ácidos de soluções ricas em proteínas, pectina ou outras

macromoléculas, melhorando assim o rendimento do produto (YAZDANSHENASA et al., 2005). A diafiltração é empregada quando se deseja eliminar componentes de menor tamanho ou de menor massa molar de uma dada mistura.

### 3.5. Purificação de queratinases

As diversas técnicas empregadas para a purificação de queratinases tomam como base as estratégias utilizadas nas proteases alcalinas microbianas. Gupta et al. (2002) ressaltam que não existem regras para a purificação de proteases. De um modo geral, após a separação da cultura presente no meio de cultivo através de centrifugação ou filtração, o sobrenadante é concentrado por técnicas como a precipitação por sulfato de amônio e diálise (BALAJI et al., 2008).

Para as etapas de purificação posteriores, a combinação de uma ou mais técnicas é muito usual, dentre as quais no âmbito das queratinases se destacam a combinação de diferentes técnicas, como a cromatografia de troca iônica e permeação em gel (BALAJI et al., 2008; DAROIT et al., 2010; LIN et al., 1992), não sendo esta a ordem de execução obrigatória, porém atingindo purificações na ordem de 20 a 70 vezes. O alto custo representado por ambas as técnicas mencionadas se torna um entrave com relação ao *scale up* de obtenção deste bioproduto; o que sugere e incentiva a busca por técnicas eficiente e viáveis para este fim.

Somando-se a isso, a literatura reporta a purificação de proteases alcalinas por SAB. Porto et al. (2005) extraíram e purificaram uma protease alcalina em sistema composto por PEG-fosfato de potássio, onde obtiveram fatores de purificação na ordem de 2 e 5 vezes e recuperação de 11 e 4% para PEG 550 e 8.000 Da, respectivamente. Klomklao et al. (2005) investigaram a partição de uma protease em SAB formado por PEG-sulfato de magnésio (15-20%, m/m), onde fator de purificação na ordem de 6,6 vezes e 69% de recuperação enzimática foram obtidos. O particionamento de uma protease alcalina de *Bacillus subtilis* TISTR 25 em sistemas formados por PEG 1.000-fosfato de potássio foi estudado por Chouyyok et al. (2005), onde a enzima apresentou fator de purificação na ordem de 6 vezes e recuperação enzimática de 62%. De um modo geral, o sistema aquoso bifásico é uma etapa de purificação primária, o qual apresenta fatores de purificação da ordem de 2-6,6 vezes e recuperações enzimáticas que variam de 4-69% para proteases alcalinas.

A enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 foi purificada por Daroit et al. (2010), através das técnicas de precipitação com sulfato de amônio, seguido por permeação em gel e

cromatografia de troca iônica, resultando em fator de purificação na ordem de 20,1 vezes e rendimento enzimático de 18%.

Cerveira, Sala e Brites (2010) estudaram a purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus* sp. P45 em sistema aquoso bifásico, onde avaliaram a influência da massa molar do PEG e do pH na partição enzimática. O sistema formado por PEG 1500 Da e fosfato de potássio pH 7,0 foi reportado por apresentar uma combinação favorável entre o fator de purificação e a recuperação enzimática, sendo estes de 1,4 vezes e 69,9%, respectivamente.

A concentração e purificação por ultrafiltração da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 foi estudada por Severo, Oliveira e Machado (2011). A influência do pH, da pressão de operação e da massa molar limite da membrana foram avaliadas. As melhores condições de operação da ultrafiltração foram obtidas quando o extrato enzimático (pH 8,0) foi permeado em uma membrana com massa molar limite de 10 kDa (Millipore, celulose regenerada) e aplicado 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão.

Na literatura existem poucos trabalhos que reportam o sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração/diafiltração para recuperação e purificação de enzimas (NANDINI, RASTOGI, 2011; SRINIVAS, BARHATE, RAGHAVARAO, 2002; TANUJA et al., 2000), sendo estes referentes a enzimas como peroxidase, amiloglicosidase, lactoperoxidase.

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**ARTIGO 1:**  
**MAXIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE QUERATINASE POR SISTEMA AQUOSO**  
**BIFÁSICO**

## MAXIMIZAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE QUERATINASE POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

### RESUMO

Queratinases são enzimas proteolíticas com capacidade de degradar a queratina presente em diferentes substratos queratinosos. Possuem inúmeras aplicações de interesse industrial, podendo ser empregadas na produção de peptídeos de queratina, na degradação de príons, na indústria farmacêutica, entre outras. Para a aplicação desta enzima, é necessário utilizar métodos de purificação que sejam passíveis de ampliação de escala, e que apresentem uma boa resolução em termos de fator de purificação e rendimento, destacando-se o sistema aquoso bifásico (SAB). Neste trabalho, a purificação da enzima queratinase produzida por *Bacillus* sp. P45 foi maximizada utilizando duas etapas de SAB. Na primeira etapa de purificação, o sistema formado por 3% de polietilenoglicol 1500 Da, 23% de fosfato de potássio (pH 7,0) e 8% (m/m) de NaCl particionou a enzima para a fase de topo obtendo fatores de purificação na ordem de 4,4 vezes e recuperação enzimática de 87%. A fase de topo, contendo a enzima de interesse, foi utilizada em um segundo sistema aquoso bifásico composto por 36% fase de topo (1<sup>o</sup> etapa do SAB), 28% de sulfato de amônio e 36% (m/m) de tampão tris-HCl (pH 7,0), promovendo o particionamento da enzima para a fase de topo. A utilização de duas etapas de SAB para a purificação da enzima queratinase resultou em um fator de purificação de 5,6 vezes e recuperação enzimática de 90%.

**Palavras-chave:** protease, polietilenoglicol, recuperação enzimática, fator de purificação.

### ABSTRACT

Keratinases are proteolytic enzymes capable to degrade keratin present in different keratinous substrates. They exhibit numerous industrial applications, can be used to produce keratin peptides, degradation of prion, pharmaceutical industry, among others. For application this enzyme, it is necessary use methods of purification able of scaling up, and have a good resolution in terms of recovery and purification factor, among this methods stand out the aqueous two-phase system (ATPS). In this work, the purification of the keratinase produced by *Bacillus* sp. P45 was optimized by using two steps of ATPS. In the first step of purification, the system formed by 3% polyethylene glycol 1500 Da, 23% of potassium phosphate (pH 7.0) and 8% (w/w) NaCl promoted partition of enzyme to the top phase with purification factors of 4.4-fold and enzymatic recovery of 87%. The top phase containing the enzyme of interest was used in a second step of ATPS composed of 36% top phase (1<sup>st</sup> step of ATPS), 28% ammonium sulfate and 36% (w/w) tris-HCl buffer (pH 7.0) partitioning of the enzyme to the top phase. Using two steps of ATPS for keratinase purification resulted in a purification factor of 5.6 fold and enzyme recovery of 90%.

**Keywords:** protease, polyethylene glycol, enzymatic recovery, purification factor.

## 1. INTRODUÇÃO

As queratinas são proteínas insolúveis e estáveis encontradas como componente majoritário da pele e seus apêndices (pelos, penas, unhas, cascos, chifres e escamas). Estas proteínas recalcitrantes são produzidas em grandes quantidades pelo processamento agroindustrial e geralmente não são degradadas por proteases comuns como a pepsina e tripsina. Dentre as proteases microbianas capazes de hidrolisar a queratina encontram-se as queratinases (BRANDELLI, 2008).

Nos últimos anos, as queratinases microbianas têm atraído à atenção de muitos pesquisadores na área biotecnológica, uma vez que possuem inúmeras aplicações de interesse industrial. As queratinases podem converter a queratina presente em resíduos queratinosos, produzindo hidrolisados proteicos que podem ser utilizados como suplemento na ração animal (ONIFADE et al., 1998) e na produção de fertilizantes nitrogenados (ICHIDA et al., 2001). Podem ser utilizadas na indústria de detergentes (XIE et al., 2010), na indústria farmacêutica (MOHORCIC et al., 2007), na depilação do couro (PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMULU, 2010), na degradação de príons (YOSHIOKA et al., 2007), como também na produção de peptídeos de queratina com atividade antioxidante (FAKHFAKH et al., 2012).

Os processos tradicionais de purificação de biomoléculas geralmente envolvem muitas etapas, transformando-os em processos lentos e trabalhosos. Além disso, podem ocorrer perdas no rendimento final do produto, contribuindo no custo final do processo (ZHANG et al., 2007). A indústria demanda de processos de purificação de proteínas rápidos e econômicos, passíveis do aumento de escala e que permitam a obtenção de produtos com alto rendimento e pureza. O sistema aquoso bifásico (SAB) é um dos métodos de purificação que atende todos esses critérios, uma vez que o seu ambiente de operação é ameno em termos de temperatura e pH, apresenta facilidade em prever o aumento de escala, é um processo rápido, o material utilizado é de baixo custo e as condições operacionais minimizam a desnaturação das proteínas (ANDERSSON, HAHN-HÄGERDAL, 1990; CHEN E LEE, 1995).

O SAB é um método seletivo utilizado para purificar biomoléculas formado pela mistura de duas soluções aquosas incompatíveis, tais como polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou PEG e sal (ALBERTSSON, 1986). Quando uma solução contendo biomoléculas é misturada no SAB, ela se particiona desigualmente entre as fases. A adição de sais, os quais não fazem parte da composição inicial do SAB, em sistemas formados por polímero-sal é um dos fatores que influenciam fortemente a partição das proteínas (ANDREWS, NIELSEN, ASENJO, 1996),

sendo o cloreto de sódio (NaCl) o sal mais comumente utilizado em SAB e geralmente sua concentração varia até 15% (m/m) (ANDREWS, NIELSEN, ASENJO, 1996; OELMEIER, DISMER, HUBBUCH, 2011; ROSA et al., 2009).

Os sistemas formados por polímero sal tem vantagens adicionais quando comparados com aqueles formados por dois polímeros: os produtos químicos são econômicos (os sais, geralmente, mais econômicos que os polímeros) e as fases apresentam menor viscosidade, assim, são requeridos tempos menores para a separação de fases. Portanto, SABs formados por polímero-sal são amplamente utilizados para aplicações em larga escala e escala laboratorial (VEIDE, LINDBÄCK, ENFORS, 1989; WU et al., 2000).

A purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por SAB compostos por PEG e fosfato de potássio foi estudada por Cerveira, Sala e Brittes (2010), onde a influência da massa molar do polímero (1500, 4000 e 10000 Da), e do pH (6,0, 7,0 e 8,0) foram avaliados. O sistema que promoveu a maior purificação da enzima foi composto por 17% (m/m) de PEG 1500 Da e 16% (m/m) de fosfato de potássio pH 7,0, com fator de purificação na ordem de 1,4 vezes e recuperação enzimática em torno de 70%.

Com base nos resultados prévios obtidos por Cerveira, Sala e Brittes (2010) e na lacuna que existe na literatura em termos de purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por técnicas que sejam passíveis do aumento de escala e que apresentem um bioproduto com alto rendimento visando aplicações industriais, o objetivo deste trabalho foi maximizar a purificação da enzima utilizando duas etapas de sistema aquoso bifásico. A primeira etapa consistiu na maximização do sistema aquoso composto por PEG 1500 Da e fosfato de potássio, investigando os efeitos da concentração de PEG, fosfato de potássio e cloreto de sódio no fator de purificação e na recuperação enzimática. Na segunda etapa, o sistema foi composto por sulfato de amônio, diluente e fase de topo proveniente da primeira etapa, avaliando-se a influência da concentração de sulfato de amônio e o diluente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

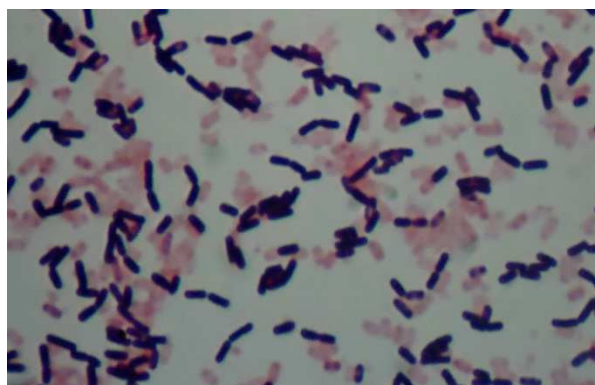
### 2.1. Cultivo submerso

#### 2.1.1. Micro-organismo

A bactéria com comprovada ação queratinolítica, *Bacillus* sp. P45 (Figura 1), cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do

Rio Grande do Sul – UFRGS, foi utilizada para a produção da enzima queratinase. O micro-organismo possui registro no GenBank com o número de acesso AY962474. Uma caracterização parcial baseada no sequenciamento 16S rDNA mostrou que esta cepa enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS. A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009; SIRTORI et al., 2006).

**Figura 1** – Micro-organismo *Bacillus* sp. P45, aumento de 1000 x.



### 2.1.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2011).

### 2.1.3. Cultivo e extração

A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011), utilizando farinha de penas como substrato. O meio de cultura foi composto por (g.L<sup>-1</sup>): farinha de penas (43) e NH<sub>4</sub>Cl (1,9) preparado em meio mineral (NaCl (0,5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4)). O pH inicial do meio foi ajustado em 7,0 e o cultivo iniciado com 1% (v/v) de inóculo. As condições de cultivo foram 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático com células foi clarificado através de centrifugação (5000 x g, 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

## 2.2. Purificação de queratinase por SAB

### 2.2.1. Sistema aquoso bifásico: primeira etapa

#### 2.2.1.1. Preparo do sistema aquoso bifásico

O sistema aquoso bifásico foi preparado em tubos graduados, onde foram adicionados o polietilenoglicol (PEG) 1500 Da, tampão fosfato de potássio (40% (m/m), pH 7,0), cloreto de sódio e água, em quantidades pré-definidas, de acordo com o diagrama de fases descrito por Minami (1997). Os tubos foram homogeneizados até a dissolução do PEG e foi adicionado o extrato enzimático o qual representa 20% (m/m) do sistema total. O sistema foi centrifugado (5000 x g, 30 min) e deixado em repouso até atingir o equilíbrio entre as fases. Os volumes das fases de topo e de fundo foram medidos, separados (ANTELO et al., 2010) e quantificados quanto à atividade enzimática e concentração de proteína.

Os sistemas controle foram preparados como descrito anteriormente, com exceção da adição do extrato enzimático, onde este foi substituído por água.

#### 2.2.1.2. Maximização da purificação de queratinase

A maximização da partição da enzima queratinase foi realizada através de uma sequência de delineamentos experimentais. No primeiro delineamento composto central (DCC) 2<sup>3</sup>, três variáveis independentes nomeadas concentração de PEG, concentração de fosfato de potássio e concentração de NaCl foram estudadas em 3 níveis com 3 réplicas no ponto central. Os níveis das variáveis independentes foram determinados com base em experimentos preliminares e estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Variáveis independentes, níveis codificados e reais dos delineamentos.

| Delineamento        | Variável independente       | Nível |      |      |      |       |
|---------------------|-----------------------------|-------|------|------|------|-------|
|                     |                             | -1,41 | -1   | 0    | +1   | +1,41 |
| DCC 2 <sup>3</sup>  | % PEG (m/m)                 | -     | 1,0  | 5,0  | 9,0  | -     |
|                     | % Fosfato de potássio (m/m) | -     | 21,0 | 23,0 | 25,0 | -     |
|                     | % NaCl (m/m)                | -     | 0,0  | 4,0  | 8,0  | -     |
| DCCR 2 <sup>2</sup> | % PEG (m/m)                 | 3,0   | 5,0  | 10,0 | 15,0 | 17,0  |
|                     | % NaCl (m/m)                | 0,0   | 1,2  | 4,0  | 6,8  | 8,0   |

No segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, as variáveis independentes significativas oriundas do primeiro delineamento (DCC 23) foram avaliadas em 5 níveis com 4 réplicas no ponto central. Os valores codificados e reais, bem como as variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1. A concentração de fosfato de potássio foi fixada em 23,0% (m/m).

A análise de variância (ANOVA) dos modelos foi realizada e a significância foi verificada através do teste estatístico de Fisher (*F*-teste) e coeficiente de correlação (*R*). Os parâmetros com nível menor de confiança ( $p > 0,05$ ) foram excluídos, e adicionados ao resíduo.

#### **2.2.1.3. Validação do modelo**

O modelo preditivo obtido no DCCR 2<sup>2</sup> foi validado nas condições onde apresentou o maior fator de purificação aliado a maior recuperação enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.2.2. Sistema aquoso bifásico: segunda etapa**

#### **2.2.2.1. Preparo do sistema aquoso bifásico**

O segundo sistema aquoso bifásico foi formado pela adição da fase de topo proveniente do primeiro SAB (30-40% m/m), diluente (30-40% m/m) e sulfato de amônio (20-40% m/m) (YANG et al., 2010) correspondente à concentração de estudo. Estes sistemas foram homogeneizados, centrifugados (5000 x g, 30 min) e deixados em repouso até atingir o equilíbrio das fases. As fases de topo e de fundo foram medidas, separadas e analisadas em termos de atividade enzimática e concentração de proteína.

#### **2.2.2.2. Influência da solução diluente e da concentração de sulfato de amônio**

A influência da solução diluente na fase de topo (tampão tris-HCl pH 7,0 100 mM e água) foi avaliada, mantendo-se a concentração de sulfato de amônio fixa em 36% (m/m). Os ensaios foram realizados em triplicata e avaliados estatisticamente pelo teste *t*.

Estabelecida a melhor solução diluente, a influência da concentração de sulfato de amônio (20, 24, 28, 32, 36 e 40% (m/m)) foi estudada. Estes ensaios foram realizados em triplicatas e tratados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey.

## 2.3. Determinações analíticas

### 2.3.1. Atividade proteolítica

A atividade queratinolítica foi monitorada utilizando-se o substrato solúvel azocaseína, uma vez que a azoqueratina é insolúvel no meio reacional composto por tampão tris-HCl. Além disso, Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) demonstraram que a atividade proteolítica e queratinolítica do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P45 nos substratos de azocaseína e azoqueratina, respectivamente, mostraram-se relacionadas.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando o substrato azocaseína 1% (m/v) em tampão tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional composta por 100 µL de tampão tris-HCl (100 mM, pH 8,0), 300 µL de azocaseína e 100 µL de enzima foi mantida em banho com agitação a 40°C por 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g, 20 minutos) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com testes controles para cada condição, onde o ácido tricloroacético foi adicionado anteriormente à enzima.

### 2.3.2. Proteínas

A concentração total de proteínas foi determinada segundo metodologia de Bradford (1976) utilizando azul de Coomassie G-250 e albumina de soro bovino como padrão, com leitura de transmitância a 595 nm. A atividade específica foi expressa em termos de atividade enzimática (U) por massa de proteína (mg).

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para levar em conta a interferência dos componentes do sistema (PEG, fosfato de potássio e cloreto de sódio), testes controles foram realizados nas fases de topo e fundo na ausência do extrato enzimático.

## 2.4. Determinação da eficiência do processo

A eficiência do processo de extração, purificação e concentração da enzima queratinase foi avaliada pelo fator de purificação (*FP*) e recuperação enzimática (% *Rec*) conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$FP = \frac{A_{e.s.}}{A_{e.e.}} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $A_{e.s.}$  é a atividade específica da fração de saída ( $\text{U.mg}^{-1}$ ) e  $A_{e.e.}$  é a atividade específica da fração de entrada ( $\text{U.mg}^{-1}$ ).

$$\%Rec = \frac{A_s \cdot V_s}{A_e \cdot V_e} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde  $A_s$  é a atividade da fração de saída ( $\text{U.mL}^{-1}$ );  $A_e$  é a atividade da fração de entrada ( $\text{U.mL}^{-1}$ );  $V_s$  é o volume da fração de saída (mL) e  $V_e$  é o volume da fração de entrada (mL).

A razão de volume ( $V_r$ ) do sistema aquoso bifásico foi determinada pela Equação 3.

$$V_r = \frac{V_{ft.}}{V_{ff.}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $V_{ft.}$  e  $V_{ff.}$  é o volume (mL) da fase de topo e fase de fundo após o processo de purificação, respectivamente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Purificação de queratinase por sistema aquoso bifásico

##### 3.1.1. Sistema aquoso bifásico: primeira etapa

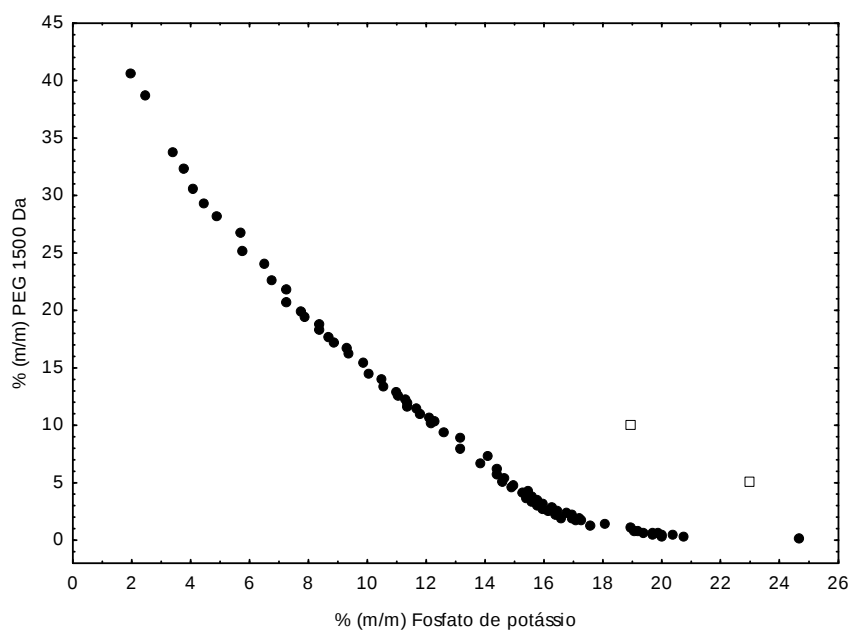
O sistema aquoso bifásico composto por 17% (m/m) de PEG de massa molar 1500 Da e 16% (m/m) de fosfato de potássio pH 7,0 (Sistema A, Tabela 2) foi previamente estabelecido por Cerveira, Sala e Brittes (2010) para a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45. A enzima foi particionada para a fase de topo, apresentando fator de purificação de 1,4 vezes, recuperação enzimática de 69,9% e razão de volumes igual a 1,8. Cerveira, Sala e Brittes (2010) verificaram que quando razões de volumes ( $V_r$ ) menores foram utilizadas, a enzima migrou preferencial para a fase de topo, fenômeno este não observado para parte dos contaminantes, o que resultou em maiores fatores de purificação.

Em sistemas PEG-sal, a partição da biomolécula é determinada principalmente por dois fatores: a capacidade *salting out* na fase de fundo e o limite de exclusão do polímero na fase de topo. A solubilidade da biomolécula na fase rica em sal (fase de fundo) diminui com o aumento da concentração de sal, uma vez que as interações entre biomolécula e água são reduzidas, resultando no particionamento da biomolécula para a fase de topo desde que haja espaço suficiente para acomodá-la, sendo este fenômeno conhecido como efeito *salting out*.

Enquanto que, soluções com polímeros de cadeia longa e linear formam uma rede, a qual limita as biomoléculas de acordo com a massa molar que podem se acomodar nela, e como consequência, a biomolécula tende a particionar para a fase de fundo. O espaço disponível para outras biomoléculas é conhecido como volume de exclusão e diminui com o aumento da massa molar do polímero (TRINDADE et al., 2005).

O sistema A (Tabela 2) foi selecionado como parâmetro, e sistemas com razões de volumes menores (aumento na concentração de sal e diminuição na concentração do polímero) foram estudados na curva binodal do sistema formado por PEG 1500-fosfato de potássio pH 7,0. Estes sistemas estão apresentados na Figura 2 e os resultados obtidos na Tabela 2.

**Figura 2** – Diagrama de fases para o sistema aquoso bifásico PEG 1500 Da-fosfato de potássio pH 7,0. Onde (●) representa os dados de Minami (1997) e (□) representa as concentrações utilizadas neste trabalho.



**Tabela 2** – Efeito da concentração de PEG e fosfato de potássio no fator de purificação (*FP*), recuperação enzimática (% *Rec*) e razão de volumes (*V<sub>r</sub>*).

| Sistema | PEG<br>% (m/m) | Fosfato de<br>potássio | Fase  | <i>FP</i> | % <i>Rec</i> | <i>V<sub>r</sub></i> | Referência                          |
|---------|----------------|------------------------|-------|-----------|--------------|----------------------|-------------------------------------|
| A       | 17,0           | 16,0                   | Topo  | 1,4       | 69,9         | 1,8                  | CERVEIRA,<br>SALA,<br>BRITES, 2010. |
|         |                |                        | Fundo | 0,3       | 5,7          |                      |                                     |
| B       | 10,0           | 19,0                   | Topo  | 1,4       | 65,4         | 0,44                 | Este trabalho                       |
|         |                |                        | Fundo | 0,9       | 2,0          |                      |                                     |
| C       | 5,0            | 23,0                   | Topo  | 1,9       | 70,6         | 0,20                 | Este trabalho                       |
|         |                |                        | Fundo | 0,2       | 2,6          |                      |                                     |

Como é possível observar, a enzima queratinase é particionada e concentrada preferencialmente para a fase de topo, rica em PEG. Albertsson (1986) reporta que a fase rica em PEG – fase de topo – apresenta características hidrofóbicas e a fase rica em sal – fase de fundo – características hidrofílicas, indicando assim uma afinidade maior da enzima queratinase por um meio menos polar.

No geral, proteínas carregadas negativamente têm preferência pela fase de topo em sistemas formados por PEG-sal, enquanto que proteínas carregadas positivamente normalmente particionam para a fase de fundo. As proteases alcalinas produzidas por diversas cepas de *Bacillus* e estudadas por Chouyyok et al. (2005), Hotha e Banik (1997) e Sinha et al. (1996), e a queratinase estudada por Bach et al. (2012) mostraram um comportamento similar, particionando preferencialmente para a fase de topo.

A utilização de uma solução polimérica de baixa concentração (5% m/m) e de baixa massa molar (1,5 kDa), aliada a alta concentração de fosfato de potássio favoreceu que a enzima por efeito *salting out* migrasse preferencialmente para a fase de topo, enquanto que parte dos contaminantes migrou para a fase de fundo. Além disso, o aumento ou a diminuição do fator de purificação pode ser atribuído ao efeito de concentração, o qual é indiretamente representado pela razão de volumes – *V<sub>r</sub>*. Uma diminuição na razão de volumes implica na redução do volume da fase de topo e aumento da fase de fundo (BENAVIDES, RITO-PALOMARES, 2004). Consequentemente, a queratinase, presente na fase de topo, foi concentrada e como resultado um ocorreu o aumento no fator de purificação da enzima alvo, devido à elevada afinidade e permanência da queratinase na fase de topo.

Chouyyok et al. (2005) verificaram que o fator de purificação de uma protease alcalina de *Bacillus subtilis* ISTR 25 aumentou com a diminuição da razão de volume no sistema formado por PEG 1000 Da-fosfato de potássio e quando um sistema com razão de volume igual a 0,04 foi utilizado a enzima foi purificada 6,1 vezes e a recuperação enzimática foi de 70%.

Quando a razão de volumes ( $V_r$ ) das fases do sistema foi igual a 0,20 (Sistema C, Tabela 2), o fator de purificação aumentou em torno de 35% quando comparado aos sistemas estudados por Cerveira, Sala e Brittes (2010), enquanto que as recuperações enzimáticas foram semelhantes. Além disso, há um ganho econômico, uma vez que a concentração de PEG foi reduzida cerca de 3,5 vezes. Assim, o sistema formado por 5,0% de PEG e 23,0% de fosfato de potássio foi selecionado para a continuidade deste trabalho.

### **3.1.1.1. Maximização da purificação de queratinase**

A utilização de delineamentos experimentais no SAB é limitada pela curva binodal. Portanto, primeiramente é necessário encontrar uma região na curva binodal onde ocorra o particionamento da enzima, e em torno desta maximizar as variáveis envolvidas na purificação. A utilização de ferramentas como delineamentos experimentais é um método convencional para estudar os efeitos dos parâmetros envolvidos no processo de purificação. Além disso, permite estimar os efeitos significativos nas respostas, bem como as suas possíveis interações (Porto et al., 2008).

A estratégia utilizada para atingir a maximização da purificação foi, primeiramente, avaliar os efeitos na variação da concentração de PEG, fosfato de potássio e NaCl em torno da condição experimental previamente selecionada (5% PEG 1500 Da e 23% de fosfato de potássio pH 7,0) através de um delineamento composto central (DCC)  $2^3$  com 3 pontos centrais. A matriz do delineamento e as respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 3.

Através do DCC  $2^3$ , pode ser observado que o fator de purificação variou de 1,0 (Ensaio 5 e 3) até 3,2 (Ensaio 7 e 9), a recuperação enzimática variou de 12,2 (Ensaio 1) a 78,2% (Ensaio 2) e a razão de volume de 0,03 (Ensaio 7) a 0,42 (Ensaio 2). A enzima queratinase, em todos os ensaios, não particionou para a fase de fundo. As menores recuperações enzimáticas foram obtidas em sistemas onde a razão de volumes ( $V_r$ ) foi inferior a 0,1. Nesses ensaios, o volume livre disponível na fase de topo para a solubilizar a enzima alvo não foi suficiente, refletindo na baixa recuperação enzimática.

**Tabela 3** – Matriz do delineamento composto central 2<sup>3</sup>, valores codificados e reais (entre parênteses), fator de purificação na fase de topo (*FP*), recuperação enzimática na fase de topo (% *Rec*) e razão de volumes (*V<sub>r</sub>*) do sistema.

| Ensaio | PEG      | Fosfato de potássio | NaCl     | FP  | % Rec | V <sub>r</sub> |
|--------|----------|---------------------|----------|-----|-------|----------------|
|        | % (m/m)  |                     |          |     |       |                |
| 1      | -1 (1,0) | -1 (21,0)           | -1 (0,0) | 1,6 | 12,2  | 0,05           |
| 2      | +1 (9,0) | -1 (21,0)           | -1 (0,0) | 1,6 | 78,2  | 0,42           |
| 3      | -1 (1,0) | +1 (25,0)           | -1 (0,0) | 1,0 | 24,8  | 0,10           |
| 4      | +1 (9,0) | +1(25,0)            | -1 (0,0) | 1,3 | 64,1  | 0,36           |
| 5      | -1 (1,0) | -1 (21,0)           | +1 (8,0) | 1,0 | 19,4  | 0,08           |
| 6      | +1 (9,0) | -1 (21,0)           | +1 (8,0) | 3,0 | 67,5  | 0,35           |
| 7      | -1 (1,0) | +1 (25,0)           | +1 (8,0) | 3,2 | 24,5  | 0,03           |
| 8      | +1 (9,0) | +1(25,0)            | +1 (8,0) | 2,8 | 66,1  | 0,36           |
| 9      | 0 (5,0)  | 0 (23,0)            | 0 (4,0)  | 3,2 | 68,7  | 0,21           |
| 10     | 0 (5,0)  | 0 (23,0)            | 0 (4,0)  | 3,0 | 67,0  | 0,21           |
| 11     | 0 (5,0)  | 0 (23,0)            | 0 (4,0)  | 3,0 | 65,4  | 0,21           |

O fator de purificação (*FP*) e a recuperação enzimática (*Rec*) apresentados na Tabela 3 foram analisados estatisticamente para estimar os efeitos de cada variável independente sobre as respostas ao nível de 95% de confiança (Tabela 4).

**Tabela 4** – Estimativa dos efeitos da concentração de PEG, fosfato de potássio e NaCl no DCC 2<sup>3</sup> para o fator de purificação e a recuperação enzimática.

| Variável            | Fator de purificação |           |          | % Recuperação enzimática |           |          |
|---------------------|----------------------|-----------|----------|--------------------------|-----------|----------|
|                     | Efeito               | Erro puro | <i>p</i> | Efeito                   | Erro puro | <i>p</i> |
| PEG                 | 0,5 *                | 0,08      | 0,028    | 48,8 *                   | 1,17      | < 0,001  |
| Fosfato de potássio | 0,3                  | 0,08      | 0,078    | 0,5                      | 1,17      | 0,684    |
| NaCl                | 1,1 *                | 0,08      | 0,005    | -0,5                     | 1,17      | 0,737    |

\* Efeito significativo (*p* < 0,05)

Conforme apresentado na Tabela 4, verifica-se um incremento no fator de purificação ao elevar as variáveis do nível -1 para o nível +1. Dentre os três fatores, considerando as faixas estudadas, as variáveis concentração de NaCl e PEG apresentaram efeito

estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança para o fator de purificação, sendo este de 1,1 e 0,5 vezes, respectivamente.

No que diz respeito à recuperação enzimática é possível verificar que a concentração de PEG apresentou efeito significativo positivo, ao passar do nível -1 (1,0%) para +1 (9,0%), onde um incremento de 48,8% na recuperação enzimática foi registrado.

A concentração do polímero e a massa molar afetam o comportamento da partição da biomolécula no SAB (DIAMOND, HSU, 1992). O efeito da concentração do PEG no particionamento depende da enzima. Nitsawang, Hatti-Kaul e Kanasawud (2006) não observaram diferença na partição da papaína em SABs formados por diferentes concentrações de PEG 6000 Da e sulfato de amônio. Entretanto, Sarangi et al. (2011) observaram um efeito significativo da concentração de PEG (15, 20 e 25% (m/m)) na partição da protease alcalina em sistemas formados por PEG 6000 Da e 15% de citrato de sódio, sendo que os maiores fatores de purificação e recuperações enzimáticas foram obtidos quando concentrações menores de PEG foram utilizadas.

A adição de 4% (m/m) de NaCl na partição da queratinase (Ensaio 9, 10 e 11, Tabela 3), quando comparado ao sistema previamente selecionado sem a adição de sal (Sistema C, Tabela 2), provocou um incremento no fator de purificação de 61%, enquanto que a recuperação enzimática diminuiu cerca de 5%.

Com base nos efeitos obtidos no DCC 2<sup>3</sup>, a fim de maximizar a purificação de queratinase por SAB, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 totalizando 12 ensaios (4 fatoriais, 4 axiais e 4 centrais). A concentração de fosfato de potássio foi fixada em 23,0% (ponto central), uma vez que esta não apresentou efeito significativo no fator de purificação e na recuperação enzimática e pelos melhores resultados obtidos estarem no ponto central. As variáveis concentração de PEG e NaCl, por apresentarem efeito positivo no fator de purificação e na recuperação enzimática, foram estudadas em cinco níveis definidos em função dos efeitos obtidos no delineamento anterior. A concentração de PEG apresentou um aumento no fator de purificação e na recuperação enzimática, assim a faixa de estudo foi determinada em 3,0 a 17,0%. E por fim, a concentração de NaCl, que apesar de influenciar positivamente no fator de purificação, tem como limitante a sua solubilidade, portanto a faixa de estudo foi mantida (0,0 a 8,0%).

A matriz do DCCR 2<sup>2</sup> com os valores codificados e reais está apresentada na Tabela 5, onde também estão apresentadas as respostas obtidas para cada ensaio, bem como, o fator de

purificação predito pelo modelo codificado (Equação 4) e a recuperação predita pelo modelo codificado (Equação 5), além dos respectivos desvios relativos.

$$FP = 3,17 - 0,43 \cdot X_1 + 0,40 \cdot (X_1)^2 + 0,57 \cdot X_2 - 0,33 \cdot (X_2)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\% Rec = 78,62 + 11,27 \cdot X_2 - 5,96 \cdot (X_2)^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde,  $X_1$ : % PEG (m/m) e  $X_2$ : % NaCl (m/m).

O fator de purificação variou de 1,6 (Ensaio 5) a 4,6 vezes (Ensaio 7) enquanto que a recuperação enzimática variou de 52,1 (Ensaio 5) a 89,7% (Ensaio 2), e a razão de volume variou de 0,09 (Ensaio 7) a 0,76 (Ensaio 8).

**Tabela 5** – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$ , valores codificados e reais (entre parênteses), fator de purificação na fase de topo, recuperação enzimática na fase de topo e razão de volumes ( $V_r$ ).

| Ensaio | Variáveis    |             | Fator de Purificação |         |                     | % Recuperação enzimática |         |                     | $V_r$ |
|--------|--------------|-------------|----------------------|---------|---------------------|--------------------------|---------|---------------------|-------|
|        | $X_1$        | $X_2$       | Experimental         | Predito | Desvio Relativo (%) | Experimental             | Predito | Desvio Relativo (%) |       |
| 1      | -1 (5,0)     | -1 (1,2)    | 3,0                  | 3,1     | -3,3                | 63,2                     | 61,4    | 2,8                 | 0,16  |
| 2      | -1 (5,0)     | +1 (6,8)    | 4,3                  | 4,2     | 2,3                 | 89,7                     | 83,9    | 6,5                 | 0,19  |
| 3      | +1 (15,0)    | -1 (1,2)    | 2,5                  | 2,2     | 12,0                | 58,3                     | 61,4    | -5,3                | 0,60  |
| 4      | +1 (15,0)    | +1 (6,8)    | 3,2                  | 3,4     | -6,2                | 82,2                     | 83,9    | -2,1                | 0,61  |
| 5      | 0 (10,0)     | -1,41 (0,0) | 1,6                  | 1,7     | -6,2                | 52,1                     | 50,9    | 2,3                 | 0,37  |
| 6      | 0 (10,0)     | +1,41 (8,0) | 3,4                  | 3,3     | 2,9                 | 80,1                     | 82,7    | -3,2                | 0,39  |
| 7      | -1,41 (3,0)  | 0 (4,0)     | 4,6                  | 4,6     | 0,0                 | 80,8                     | 78,6    | 2,7                 | 0,09  |
| 8      | +1,41 (17,0) | 0 (4,0)     | 3,3                  | 3,4     | -3,0                | 79,1                     | 78,6    | 0,6                 | 0,76  |
| 9      | 0 (10,0)     | 0 (4,0)     | 3,2                  | 3,2     | 0,0                 | 80,5                     | 78,6    | 2,4                 | 0,38  |
| 10     | 0 (10,0)     | 0 (4,0)     | 3,2                  | 3,2     | 0,0                 | 77,8                     | 78,6    | -1,0                | 0,37  |
| 11     | 0 (10,0)     | 0 (4,0)     | 3,3                  | 3,2     | 3,0                 | 78,6                     | 78,6    | 0,0                 | 0,38  |
| 12     | 0 (10,0)     | 0 (4,0)     | 3,0                  | 3,2     | -6,7                | 73,6                     | 78,6    | -6,8                | 0,36  |

$X_1$ : % PEG (m/m) e  $X_2$ : % NaCl (m/m).

Para a verificação da validade dos modelos obtidos na purificação de queratinase por *Bacillus* sp. P45 em função das variáveis significativas codificadas (Equações 4 e 5), foi realizada a análise de variância (ANOVA) (Tabela 6), onde observou-se a validade dos modelos pelo *F*-teste e coeficiente de correlação (*R*), ao nível de 95% de confiança. A relação entre o *F*-calculado e o *F*-tabelado para o fator de purificação foi de 13,8 vezes, e 14,4 vezes para a recuperação enzimática. O coeficiente de correlação (*R*) foi de 0,98 e 0,96 para o fator de purificação e a recuperação, respectivamente. Consequentemente, os modelos obtidos foram considerados adequados para descrever as superfícies de respostas para o fator de purificação e recuperação da enzima queratinase em função da concentração de NaCl e PEG. Somando-se a isso, os desvios foram relativamente baixos (inferiores a 12%).

**Tabela 6** – Análise de variância (ANOVA) para as respostas fator de purificação (*FP*) e recuperação (% *Rec*) do DCCR 2<sup>2</sup>.

| Fonte de Variação | Soma dos quadrados |              | Graus de liberdade |              | Média quadrática |              | F calculado |              | R         |              |
|-------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|------------------|--------------|-------------|--------------|-----------|--------------|
|                   | <i>FP</i>          | % <i>Rec</i> | <i>FP</i>          | % <i>Rec</i> | <i>FP</i>        | % <i>Rec</i> | <i>FP</i>   | % <i>Rec</i> | <i>FP</i> | % <i>Rec</i> |
| Regressão         | 6,17               | 1247,0       | 4                  | 2            | 1,542            | 623,5        | 57,1        | 61,1         | 0,98      | 0,96         |
| Resíduo           | 0,19               | 91,5         | 7                  | 9            | 0,027            | 10,2         |             |              |           |              |
| Falta de ajuste   | 0,14               | 66,1         | 4                  | 6            |                  |              |             |              |           |              |
| Erro puro         | 0,05               | 25,4         | 3                  | 3            |                  |              |             |              |           |              |
| Total             | 6,36               | 1338,5       | 11                 | 11           |                  |              |             |              |           |              |

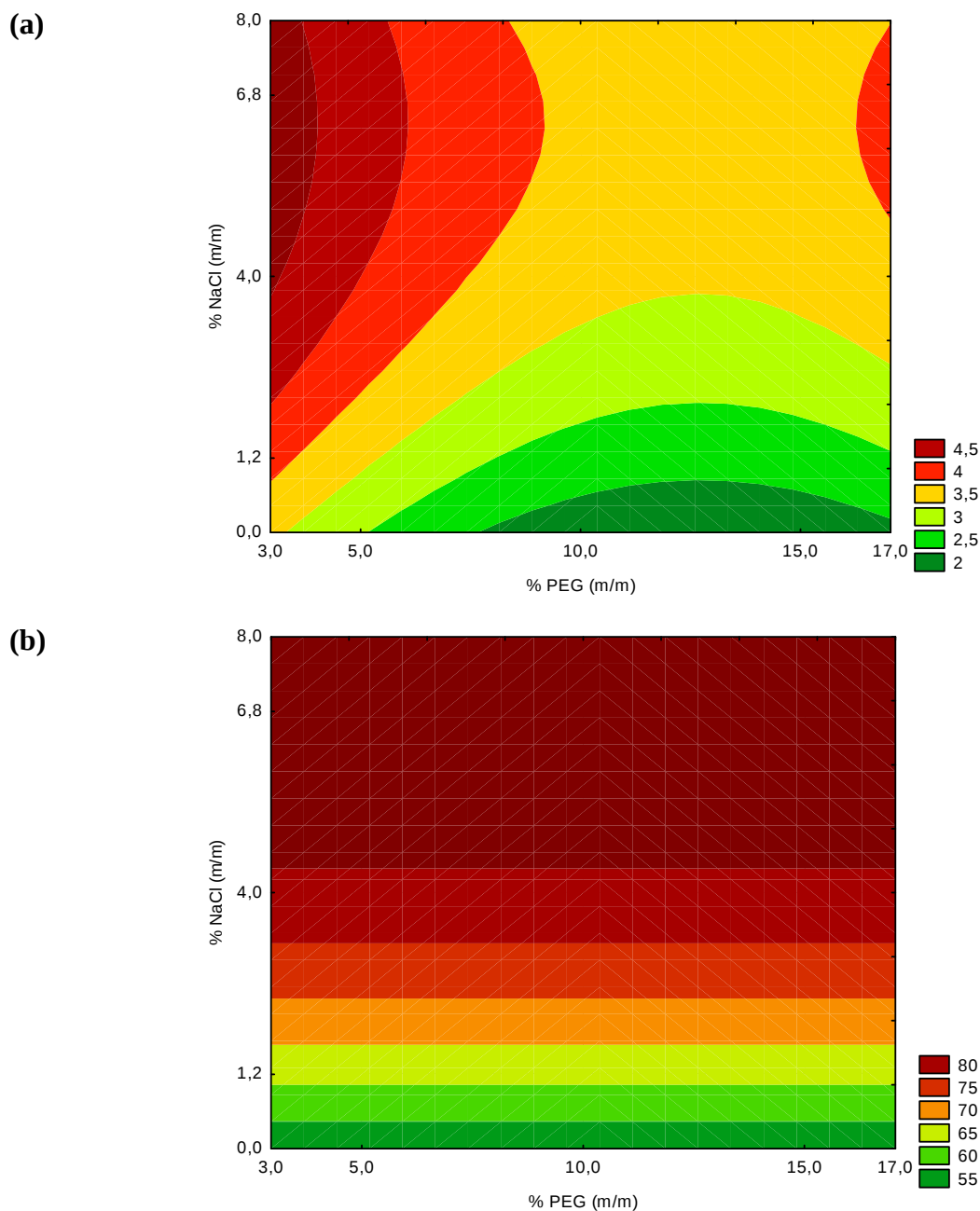
$F_{0,05; 4,7}$ : 4,12;  $F_{0,05; 2,9}$ : 4,26

A partir do modelo obtido foi possível construir as curvas de contorno para analisar as melhores concentração de PEG e NaCl para a purificação de queratinase que conduzem a um maior fator de purificação e recuperação. As curvas de contorno obtidas estão apresentadas na Figura 3.

O fator de purificação foi afetado significativamente por ambas as variáveis, concentração de PEG e NaCl. A concentração de NaCl apresentou um efeito significativo positivo mais pronunciado, sendo que ao passar do nível -1 (1,2%) para o nível + 1 (6,8%) ocorreu um aumento de 1,14 no fator de purificação. O efeito da concentração de PEG foi negativo, ao passar no nível -1 (5,0%) para o nível +1 (15,0%), diminuiu 0,86 o fator de purificação. Assim, a curva de contorno para o fator de purificação (Figura 3a) sugere que quando são associadas altas concentrações de NaCl (4,0 – 8,0% (m/m)) e baixa concentração

de PEG (3,0 (m/m)) a purificação da enzima é favorecida obtendo fatores de purificação de até 4,5 vezes.

**Figura 3 – (a) Curva de contorno para o fator de purificação e (b) recuperação enzimática.**



É possível verificar que a recuperação enzimática foi significativamente afetada pela concentração de NaCl, onde a mudança do nível -1 para o nível +1 resultou em um aumento de 22,5%. A concentração de PEG não exerceu influência na recuperação enzimática (Figura

3b) sendo esta exclusivamente dependente da concentração de NaCl, onde altas concentrações (6,8 – 8,0% (m/m)) favorecem a recuperação da enzima, em torno de 80%.

Neste planejamento (DCCR 2<sup>2</sup>), a adição de NaCl foi o fator que apresentou maior influência na purificação e recuperação da enzima queratinase. Asenjo et al. (1994) reportam que a resolução do SAB aumenta com a concentração de NaCl. A adição de um sal, o qual não faz parte da formação inicial das fases no SAB, afeta o particionamento das proteínas através da distribuição diferencial dos íons do sal nas duas fases, alterando assim as interações hidrofílicas, hidrofóbicas (HACHEM, ANDREWS, ASENJO, 1996) e eletrostáticas (JOHANSSON, 1974) entre as proteínas e os componentes formadores das fases. Em sistemas formados por PEG-sal, a adição de NaCl aumenta a hidrofobicidade das fases, promovendo a partição das proteínas mais hidrofóbicas para a fase de topo (ASENJO et al., 1994).

Em geral, diferentes tipos de sais apresentam diferentes íons com diferentes afinidades para as duas fases, resultando em uma força motriz que conduz a partição desigual dos íons entre as fases. A força motriz eletroquímica no particionamento é explicada pela formação de uma diferença de potencial eletrostático sobre a interface (JOHANSSON, 1974; SARAVANAN et al., 2008). Esta diferença de potencial é criada pelas diferentes afinidades dos íons nas duas fases. A diferença de potencial eletrostático irá afetar a separação de proteínas ou outras moléculas carregadas presentes no sistema (SARAVANAN et al., 2008).

Asenjo et al. (1994), Miranda e Casconc (1994) e Schmidt et al. (1994) relatam que as proteínas hidrofóbicas podem ser separadas eficientemente dos seus contaminantes em sistemas formados por PEG-sal com a adição de até 10% (m/m) de NaCl.

Lahore et al. (1995) verificaram que a adição de NaCl (8,7% (m/m)) aumentou o coeficiente de partição de uma protease ácida de *Mucor bacilliformis* de 1,1 para 35 em sistemas formados por PEG 3350 Da-fosfato de potássio. Mehrnoush et al. (2012) reportam que a adição de 4,5% (m/m) de NaCl afetou significativamente a partição da protease alcalina proveniente da casca de manga para a fase de topo em sistemas formados por PEG 8000 Da-dextrana.

A adição de sais ao SAB diminui a atividade de água da fase de fundo devido ao aumento na concentração de sal e assim, a proteína hidrofóbica é excluída dessa fase (LAHORE et al. (1995). Portanto, na presença de NaCl, a queratinase foi recuperada e purificada na fase de topo, e como consequência os seus contaminantes foram transferidos para a fase de fundo. Além disso, o cloreto de sódio é um sal não tóxico e, portanto, pode ser utilizado para modificar o processo de partição sem afetar o destino final de utilização da enzima.

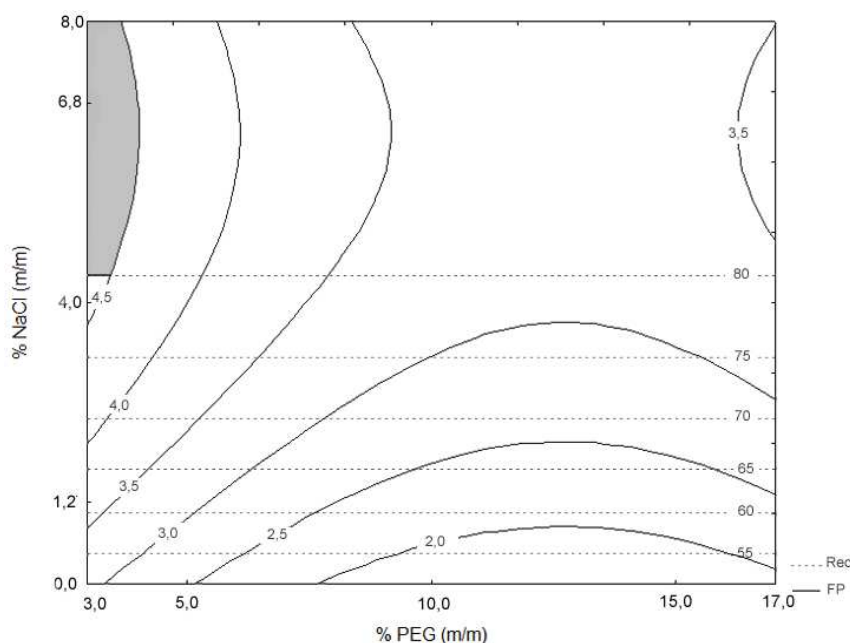
Considerando que a utilização de concentrações acima de 8% (m/m) de NaCl provoca a precipitação deste sal no SAB e em relação ao PEG não é interessante estudar concentrações abaixo de 3,0% pela proximidade da curva binodal e consequentemente resultar na não formação de duas fases aquosas, foi possível considerar maximizada a partição da enzima queratinase no SAB composto por PEG 1500 Da-fosfato de potássio pH 7,0.

### 3.1.1.2. Validação do modelo DCCR 2<sup>2</sup>

Considerando que o fator de purificação e a recuperação são os dois fatores mais importantes no processo de purificação, a sobreposição das curvas de contorno destes parâmetros na presença de 23,0% (m/m) de fosfato de potássio foi analisada e está apresentada na Figura 4.

A área destacada na Figura 4 é o espaço experimental que apresenta simultaneamente o melhor fator de purificação e recuperação enzimática obtida pelo modelo. A sobreposição das curvas de contorno indica que alta purificação e recuperação podem ser obtidas quando o sistema aquoso bifásico é composto por 3,0% PEG e 6,8 – 8,0% de NaCl.

**Figura 4** – Sobreposição das curvas de contorno para o fator de purificação (*FP*) e recuperação enzimática (% *Rec*) em função da concentração de PEG e NaCl.



Dois sistemas **(1)** 3,0% PEG e 8,0% NaCl e **(2)** 3,0% PEG e 6,8% NaCl com baixas concentrações de PEG e altas concentrações de NaCl foram selecionados para validar o modelo. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7** – Fator de purificação e recuperação enzimática experimental e predita com o respectivo desvio relativo na validação do DCCR 2<sup>2</sup>.

| Ensaio | Variáveis      |                | Fator de purificação |              |                     | % Recuperação enzimática |              |                     | V <sub>r</sub> |
|--------|----------------|----------------|----------------------|--------------|---------------------|--------------------------|--------------|---------------------|----------------|
|        | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | Predito              | Experimental | Desvio relativo (%) | Predito                  | Experimental | Desvio relativo (%) |                |
| 1      | -1,41 (3,0)    | +1,41 (8,0)    | 4,7                  | 4,4 ± 0,2    | -6,8                | 83,2                     | 87,0 ± 5,8   | +4,3                | 0,10           |
| 2      | 1,41 (3,0)     | +1 (6,8)       | 4,8                  | 4,5 ± 0,3    | -6,6                | 83,4                     | 86,8 ± 2,1   | +3,9                | 0,10           |

X1: % PEG (m/m) e X2: % NaCl (m/m).

Verifica-se uma proximidade entre resultados experimentais obtidos na validação do DCCR 2<sup>2</sup> (Tabela 7) e os preditos pelo modelo, com desvios relativos médios inferiores a 7% nos dois sistemas validados para ambas as respostas, indicando assim, que o modelo é preditivo e significativo. O sistema composto por 3% de PEG, 23% de fosfato de potássio e 8% de NaCl, o qual fornece fatores de purificação na ordem de 4,4 vezes e recuperação enzimática de 87,0%, foi selecionado e utilizado para a continuidade do trabalho.

O SAB tem sido utilizado para a purificação de diferentes compostos como enzimas (BABU, RASTOGI, RAGHAVARAO, 2008), hormônios (HE et al., 2005) e antibióticos (MOKHTARANI et al., 2008). No que diz respeito à extração e purificação de proteases, a literatura reporta diferentes sistemas sendo os mais comuns formados por PEG-citrato de sódio (BACH et al., 2012, PORTO et al., 2008; SARANGI et al., 2011), PEG-sulfato de amônio (BACH et al., 2012; NITSAWANGA, HATTI-KAUL, KANASAWUD, 2006), PEG-fosfato de potássio (CHOUYYOK et al., 2008; SARANGI et al., 2011), PEG-fosfato de sódio (PERIČIN, MADAREV-POPOVIĆ, RADULOVIĆ-POPOVIĆ, 2009) e PEG-sulfato de magnésio (KLOMKLAO et al., 2005; NALINANON et al., 2009). A extração e purificação destas enzimas proteolíticas de diferentes origens através dos mais variados sistemas de duas fases aquosas proporcionou fatores de purificação que variam de 2,6 a 7,4 vezes e recuperações de 68 a 131%.

Nesta primeira etapa de purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por SAB foi possível incrementar o fator de purificação e a recuperação enzimática avaliando as variáveis concentração de PEG, fosfato de potássio e NaCl. Ao comparar os resultados obtidos

(Ensaio 1, Tabela 7) com o sistema previamente selecionado (Sistema C, Tabela 2), é possível verificar que o FP passou de 1,9 para 4,4 vezes e a recuperação enzimática de 70,6 para 87,0%. Dessa forma, a utilização do sistema aquoso bifásico para a purificação de queratinase se apresenta como uma técnica viável para processos aplicáveis em larga escala.

### 3.1.2. Sistema aquoso bifásico: segunda etapa

#### 3.1.2.1. Influência da solução diluente e da concentração de sulfato de amônio

Quando se objetiva um fator de purificação e recuperação maiores e/ou a migração da enzima para a fase de fundo é possível submeter à fase de topo para um segundo sistema aquoso bifásico (MINAMI, KILIKIAN, 1998; YANG et al., 2010). A adição de três sais – NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – para a formação do segundo sistema aquoso bifásico na purificação de esterase foi estudada por Yang et al. (2010), sendo que o sistema formado pela fase de topo proveniente do primeiro SAB (PEG 1000 Da-fosfato de sódio) e 6% (m/m) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  promoveu a partição da enzima para a fase de fundo. Com base neste trabalho, o sal sulfato de amônio foi selecionado para compor o segundo SAB para purificação da enzima queratinase. Além disso, o novo sistema aquoso bifásico foi composto ainda pela fase de topo proveniente da primeira etapa e um diluente.

Para que ocorresse a formação de duas fases aquosas foi necessário a adição de um diluente, uma vez que a fase de topo proveniente da primeira etapa do SAB possui um baixo teor de água disponível para a interação sal-água. Os diluentes testados foram água destilada e tampão tris-HCl pH 7,0 100 mM. Os sistemas foram formados por 32% (m/m) de fase de topo (1º etapa), 32% (m/m) diluente e 36% (m/m) de sulfato de amônio. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Influência do diluente no fator de purificação e na recuperação enzimática na segunda etapa de purificação.

| Diluente                         | Fator de purificação | % Recuperação enzimática |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------|
| Água destilada                   | $1,6 \pm 0,1^a$      | $92 \pm 1^b$             |
| Tampão tris-HCl pH 7,0<br>100 mM | $1,5 \pm 0,1^a$      | $99 \pm 1^a$             |

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (teste *t*).

Conforme apresentado na Tabela 8 o diluente não influenciou no fator de purificação, porém alterou a recuperação enzimática. A enzima queratinase não migrou para a fase de fundo destes sistemas, portanto, a recuperação deve estar relacionada com a desnaturação enzimática. Pode-se observar que quando tampão foi utilizado como diluente, a enzima foi menos susceptível a desnaturação quando comparado ao diluente água destilada. Isso provavelmente ocorreu, pois quando se utilizou o tampão com pH 7,0 as variações de pH foram insignificantes, uma vez que a primeira etapa de purificação também foi realizada em pH 7,0. Somando-se a isso, não há diferença significativa na atividade enzimática quando diluída em pH 7,0 e 8,0 (dados não mostrados). Dessa forma, o sistema composto por tampão tris-HCl pH 7,0 100 mM forneceu fator de purificação na ordem de 1,5 e recuperação enzimática próxima a 100% na segunda etapa de purificação.

Estabelecido o melhor diluente, tampão tris-HCl pH 7,0 100 mM, a influência da concentração de sulfato de amônio (20, 24, 28, 32, 36 e 40% (m/m)) foi avaliada e as respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 9.

O primeiro sistema aquoso bifásico (3% PEG, 23% fosfato de potássio e 8% NaCl) foi reproduzido, resultando em um fator de purificação na ordem de 4,6-5,2 vezes e recuperações na ordem de 97 a 100%. A fase de topo, contendo a enzima, foi utilizada para verificar a influência da concentração de sulfato de amônio na segunda etapa de purificação por SAB.

**Tabela 9** – Influência da concentração de sulfato de amônio no fator de purificação e na recuperação enzimática durante a segunda etapa de purificação.

| Composição do sistema<br>% (m/m)                                |                 |                 | Fator de purificação      |                        | % Recuperação enzimática |                        |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| Concentração de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Topo (1º etapa) | Tampão tris-HCl | Etapa                     | Global                 | Etapa                    | Global                 |
| 20                                                              | 40              | 40              | 1,0 * <sup>c</sup>        | 3,2 ± 0,2 <sup>b</sup> | 76 ± 4 <sup>c</sup>      | 76 ± 4 <sup>b</sup>    |
| 24                                                              | 38              | 38              | 1,1 ± 0,1 <sup>c</sup>    | 3,4 ± 0,2 <sup>b</sup> | 80 ± 1 <sup>c</sup>      | 81 ± 1 <sup>a, b</sup> |
| 28                                                              | 36              | 36              | 1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>    | 5,6 ± 0,3 <sup>a</sup> | 100 ± 6 <sup>a</sup>     | 90 ± 5 <sup>a</sup>    |
| 32                                                              | 34              | 34              | 1,7 ± 0,1 <sup>a, b</sup> | 5,6 ± 0,1 <sup>a</sup> | 98 ± 3 <sup>a</sup>      | 88 ± 3 <sup>a</sup>    |
| 36                                                              | 32              | 32              | 1,6 ± 0,1 <sup>b</sup>    | 5,3 ± 0,2 <sup>a</sup> | 93 ± 4 <sup>a, b</sup>   | 84 ± 4 <sup>a, b</sup> |
| 40                                                              | 30              | 30              | 1,7 ± 0,1 <sup>a, b</sup> | 5,3 ± 0,3 <sup>a</sup> | 85 ± 6 <sup>b, c</sup>   | 76 ± 6 <sup>b</sup>    |

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível 95% de confiança (teste de Tukey). \* Não houve desvio padrão

Neste segundo SAB, a enzima queratinase não migrou para a fase de fundo, permanecendo na fase rica em PEG – topo. Em concentrações iguais e inferiores a 16% (m/m) de sulfato de amônio não ocorreu à formação de duas fases aquosas.

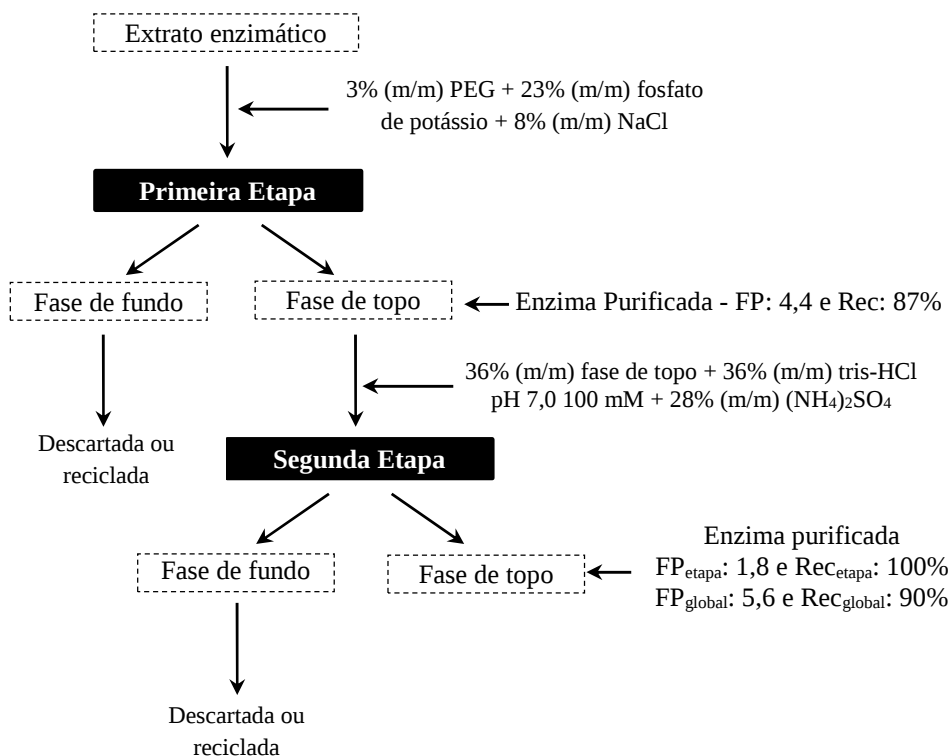
Concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na ordem de 20 e 24% (m/m) não favoreceram a partição da enzima queratinase em relação aos contaminantes, uma vez que os fatores de purificação globais (3,2 e 3,4 vezes) foram inferiores ao da primeira etapa de purificação (4,6), além de apresentarem fatores de purificação da etapa na ordem de uma unidade.

A enzima foi preferencialmente particionada em relação aos demais componentes do extrato enzimático quando concentrações na faixa de 28-36% (m/m) de sulfato de amônio foram utilizadas. Por questões econômicas, o sistema formado por 28% (m/m) de sulfato de amônio foi considerado para partição da enzima, obtendo fatores de purificação na ordem de 1,8 (etapa) e 5,6 (global) vezes e recuperações de 100 (etapa) e 90% (global).

Não são encontrados muito registros que reportem a utilização de duas etapas de SAB para purificação de proteínas. Yang et al. (2010) purificaram esterase por duas etapas de SAB, na primeira etapa do SAB (PEG 1000 Da-fosfato de sódio) a enzima migrou para a fase de topo, enquanto que na segunda etapa (PEG 1000 Da-fosfato de sódio e 6% (m/m) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) a enzima foi particionada para a fase de fundo. Este processo resultou em um fator de purificação de 18,5 vezes e recuperação de 83,2%.

Glicoamilase foi purificada por Minami e Kilikian (1998) utilizando duas etapas de SAB. O sistema inerente a primeira etapa foi composto por PEG 4000 Da, onde a enzima migrou para a fase de fundo. A fase de fundo foi submetida à segunda etapa de purificação por SAB contendo PEG 1500 Da, resultando no aumento do fator de purificação da glicoamilase em três vezes.

Embora a enzima queratinase não tenha particionado para a fase de fundo, houve um aumento no fator de purificação e na recuperação enzimática, portanto a segunda etapa do SAB foi eficiente para promover a purificação global da enzima. O esquema do processo de purificação global da enzima queratinase está apresentado na Figura 5.

**Figura 5** – Diagrama esquemático para a purificação de queratinase de *Bacillus* sp. P45.

A utilização de duas etapas de purificação por SAB proporcionou um incremento no fator de purificação e na recuperação enzimática de aproximadamente 200% e 28%, respectivamente, quando comparado ao sistema inicial (Sistema C, Tabela 2). O presente estudo é o primeiro a reportar a extração e a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por duas etapas de sistemas aquosos bifásicos, reforçando que a utilização deste processo é uma alternativa viável em etapas preliminares de separação, principalmente no que se refere à minimização do tempo de operação e redução no número de etapas. Além disso, é passível de aumento de escala.

#### 4. CONCLUSÃO

A enzima queratinase foi purificada por duas etapas de sistemas aquosos bifásicos. A primeira etapa de purificação foi maximizada onde o sistema formado por 3% de PEG, 23% de fosfato de potássio e 8% de NaCl promoveu a partição da enzima para a fase de topo, obtendo fator de purificação na ordem de 4,4 vezes e 87% de recuperação enzimática. Na segunda etapa de purificação, o sistema foi composto por 36% de topo proveniente da primeira etapa, 36% de

tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 e 28% de sulfato de amônio. A enzima foi particionada para a fase rica em PEG, onde fatores de purificação na ordem de 1,8 (etapa) e 5,6 (global) vezes e recuperações de 100% (etapa) e 90% (global) foram obtidas. O SAB se mostrou uma técnica alternativa frente aos processos convencionais para a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45, principalmente quando um alto grau de pureza da enzima não é requerido.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. **Partitioning of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology**. New York: John Wiley and Sons, p.346, 1986.

ANDERSSON, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Bioconversions in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, n.4, p.242-254, 1990.

ANDREWS, B.A.; NIELSEN, S.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v.6, n.5, p.303-313, 1996.

ANTELO, F.S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J.A.V.; KALIL, S.J. Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.5, p.921-926, 2010.

ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; HACHEM, F.; ANDREW, B.A. Model for predicting the partition behaviour of proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v.668, n.1, p.47-54, 1994.

BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, n.1, p.83-89, 2008.

BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v.47, n.12, p.2455-2462, 2012.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **Journal of Chromatography B**, v.807, n.1, p.33-38, 2004.

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

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, n.2, p.105-116, 2008.

CERVEIRA, G.P.; SALA, L.; BRITES, M.L. **Purificação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 utilizando sistema aquoso bifásico**. 2010. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

CHEN, J.P.; LEE, M.S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n.11, p.1021-1027, 1995.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, n.11, p. 3514-3518, 2005.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, n.3, p.358-363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, n.1, p.45-51, 2011.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.47, p.89-135, 1992.

FAKHFAKH, N.; GARGOURI M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FEKI, A. E.; NASRI M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.4, p.938-949, 2012.

HACHEM, F.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, n.7, p.507-517, 1996.

HE, C.; LI, S.; LIU, H.; LI, K.; LIU F. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Chromatography A**, v.1082, n.2, p.143-149, 2005.

HOTHA, S.; BANIK R.M. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.69, n.1, p.5-10, 1997.

ICHIDA, J.M.; KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C.A.; KEENER, H.M.; ELWELL, D.L.; BURTT-Jr, E.H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, n.2, p.199-208, 2001.

JOHANSSON, G. Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric biphasic systems. **Acta Chemica Scandinavica B**, v.28, n.8, p.873-882, 1974.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B.K. KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, p.3061-3067, 2005.

LAHORE, H.M.F.; MIRANDA, M.V.; FRAILE, E.R.; BONINO, M.J.B.J.; CASONE, O. Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.30, n.7, p.615-621, 1995.

MEHRNOUSH, A.; TAN, C.P.; HAMED, M.; AZIZ, N.A.; LING, T.C. Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) peel. **International Journal of Molecular Science**, v.13, n.3, p.2939-2950, 2012.

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase**. 1997. 190 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MINAMI, N.M.; KILIKIAN, B.V. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. **Journal of Chromatography B**, v.711, n.1-2, p.309-312, 1998.

MIRANDA, M.V.; CASONE O. Partition behaviour of horseradish peroxidase isoenzymes in aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.4, p.275-280, 1994.

MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, n.1-2, p.196-201, 2007.

MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M.H.; MANESH, S.D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, n.2, p.241-247, 2008.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.44, n.4, p.471-476, 2009.

NITSAWANG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.5, p.1103-1107, 2006.

OELMEIER, S.A.; DISMER, F.; HUBBUCH, J. Application of an aqueous two-phase systems high-throughput screening method to evaluate mAb HCP separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.1, p.69-81, 2011.

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

PERIČIN, D.M.; MADAREV-POPOVIĆ, S.Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L.M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.31, n.1, p.43-47, 2009.

PORTO, T.S.; SILVA, G.M.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR., A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, n.4, p.716-721, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.7, p.1909-1920, 2010.

ROSA, P.A.; AZEVEDO A.M.; SOMMERFELD S.; MUTTER A.; AIRES-BARROS M.R.; BÄCKER, W. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach. **Journal of Biotechnology**, v.139, n.4, p.306-313, 2009.

SARANGI, B.K.; PATTANAIK, D.P.; RATHINARAJ, K.; SACHINDRA, N.M.; MADHUSUDAN, M.C.; MAHENDRAKAR, N.S. Purification of alkaline protease from chicken intestine by aqueous two phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Journal of Food Science and Technology**, v.48, n.1, p.36-44, 2011.

SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-poly (acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, v.43, n.9, p.905-911, 2008.

SCHMIDT, A.S.; VENTOM, A.M.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.2, p.131-142, 1994.

SINHA, R.; SINGH, S.P.; AHMED, S.; GARG, S.K. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. **Bioresource Tecnology**, v.55, n.2, p.163-166, 1996.

SIRTORI, L.R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D.M.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n.6, p.357-363, 2006.

TRINDADE, I. P.; DIOGO, M. M.; PRAZERES, D. M.; MARCOS, J. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1082, n.2, p.176-184, 2005.

VEIDE, A.; LINDBÄCK, T.; ENFORS, S-O. Recovery of  $\beta$ -galactosidase from a poly (ethylene glycol) solution by diafiltration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, n.11, p.744-751, 1989.

WU, Y.T.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Recovery of endo-polygalacturonase using polyethylene glycol-salt aqueous two-phase extraction with polymer recycling. **Bioseparation**, v.9, n.4, p.247-254, 2000.

XIE, F.; CHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; XUE, Z.; LUO, Y.; QIAN, S., Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.344-350, 2010.

YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG1000/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aqueous two-phase system by a two-step extraction. **Process Biochemistry**, v.45, n.10, p.1664-1671, 2010.

YOSHIOKA, M.; MIWA, T.; HORII, H.; TAKATA, M.; YOKOYAMA, T.; NISHIZAWA, K.; WATANABE, M.; SHINAGAWA, M.; MURAYAMA, Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.509-515, 2007.

ZHANG, M.; HUB, P.; LIANG, Q.; YANG, H.; LIU, Y.; WANG, G.L. Direct process integration of extraction and expanded bed adsorption in the recovery of crocetin derivatives from *Fructus gardenia*. **Journal of Chromatography B**, v.858, n.1-2, p.220-226, 2007.

**ARTIGO 2:**

**INTEGRAÇÃO DA ULTRAFILTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO AO SISTEMA AQUOSO  
BIFÁSICO NA PURIFICAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE**

## INTEGRAÇÃO DA ULTRAFILTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO AO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO NA PURIFICAÇÃO DA ENZIMA QUERATINASE

### RESUMO

A aplicação da enzima queratinase exige sua purificação por técnicas que sejam eficientes, econômicas e passíveis de ampliação de escala, destacando-se o sistema aquoso bifásico (SAB) e a ultrafiltração (UF). Neste estudo, a ultrafiltração/diafiltração foi integrada ao sistema aquoso bifásico para a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45. Além disso, avaliou-se a hidrólise de diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis pela enzima purificada e bruta. O *design* 1, formado por uma única etapa de SAB e diafiltração, purificou 4,9 vezes a enzima queratinase com recuperação enzimática de 69,0%. Enquanto que o *design* 2, composto por duas etapas de SAB e diafiltração, purificou a enzima 6,1 vezes atingindo recuperação enzimática de 56,3%. Durante o processo de diafiltração foi possível separar o polietilenoglicol da enzima. A enzima purificada pelo *design* 2 apresentou atividade ótima na temperatura de 50°C, e foi capaz de catalisar com maior eficiência a hidrólise de substratos proteicos solúveis e insolúveis quando comparada a enzima bruta, justificando assim a purificação.

**Palavras-chave:** diafiltração, hidrólise, polietilenoglicol, zimograma.

### ABSTRACT

The application of keratinase enzyme requires its purification by techniques that are efficient, economical and able of scaling-up, the aqueous two-phase system (ATPS) and ultrafiltration (UF) stand out. In this study, ultrafiltration/diafiltration was integrated with aqueous two-phase system for the purification of keratinase from *Bacillus* sp. P45. Besides, the hydrolysis of different soluble and insoluble protein substrates by crude and purified enzyme was evaluated. The design 1 formed by the one step of ATPS and diafiltration, promoted a purification factor of 4.9 fold with a recovery of 69.0%. While the design 2, consisting of two steps of ATPS and diafiltration, the enzyme purified keratinase reached a purification factor of 6.1 fold and enzymatic recovery of 56.3%. During the diafiltration, it was possible to separate the polyethylene glycol of the enzyme. The purified enzyme (design 2) showed optimum activity in temperature of 50°C, and was capable most efficiently catalyzing the hydrolysis of soluble and insoluble protein substrates when compared to the crude enzyme, thus justifying its purification.

**Keywords:** diafiltration, hydrolysis, polyethylene glycol, zymogram.

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas catalisam a clivagem das ligações peptídicas nas proteínas, sendo aplicadas principalmente na indústria de alimentos, detergentes e no processamento do couro (RAO et al., 2008). As proteases produzidas por micro-organismos que degradam a queratina são denominadas queratinases (ONIFADE et al., 1998). Estas enzimas podem ser utilizadas na indústria de detergentes (XIE et al., 2010) e farmacêutica (MOHORCIC et al., 2007), na depilação do couro (PRAKASH, JAYALAKSHMI, SREERAMULU, 2010). As queratinases podem converter a queratina presente em resíduos queratinosos, como as penas, produzindo hidrolisados proteicos para suplementação da ração animal (ONIFADE et al., 1998). Além disso as queratinases apresentam potencial na degradação de príons (YOSHIOKA et al., 2007) e na produção de peptídeos de queratina com atividade antioxidante (FAKHFAKH et al. 2012).

As etapas convencionais utilizadas para a purificação dessa enzima (cromatografia de troca iônica e de afinidade) são dispendiosas, trabalhosas e consomem tempo, sendo normalmente adequadas para produzir pequenas quantidades (GALLO et al., 2005; NAJAFI, KEMBHAVI, 2005). Por estes motivos existe uma procura crescente por protocolos de purificação mais eficientes, menos dispendiosos e passíveis de ampliação de escala, destacando-se as técnicas de sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração (UF).

O SAB explora a capacidade exibida por soluções de dois polímeros ou de um polímero e um sal de se separarem em duas fases aquosas sempre que certas concentrações mínimas sejam excedidas (MINAMI, 1997). A enzima de interesse migra para uma das fases, enquanto que parte dos contaminantes migra para a fase oposta, promovendo assim a sua purificação. Após o processo de purificação por SAB, a enzima pode ser separada do sal e/ou do polímero utilizando a ultrafiltração.

A UF é um processo de separação por membranas baseado no princípio da permeação seletiva de solutos em membranas semipermeáveis, poliméricas ou inorgânicas, utilizando como força motriz para a transferência de massa através da membrana a pressão mecânica (HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006). A UF tem sido aplicada para a recuperação de diversos componentes, tais como lisozima a partir da clara do ovo (GHOSH et al., 2000), proteases proveniente da água de lavagem do surimi (DEWITT, MORRISSEY, 2002), proteases e proteínas hidrolisadas de vísceras de peixes (GILDBERG, 1992) e proteínas do plasma de sangue de frangos (TORRES et al., 2002).

Um modo de operação da ultrafiltração é a diafiltração, a qual contribui para uma melhor separação e é frequentemente utilizada para melhorar a pureza do soluto. A alimentação é diluída com adição de solvente (água ou tampão) para reduzir a concentração de componentes permeáveis (PEG e sais) e para removê-los, fazendo estes permearem através da membrana (WANG, ZHANG, OUYANG, 2002). Os processos de separação com membranas proporcionam algumas vantagens como baixo consumo energético, seletividade, sistemas compactos e facilidade no aumento de escala (ZEMAN, ZYDNEY, 1996) e podem ser combinados com outros processos de separação.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo integrar a ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico para purificar a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45, além de avaliar a degradação de diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis pela enzima purificada e bruta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Cultivo submerso**

#### **2.1.1. Micro-organismo**

A bactéria com comprovada ação queratinolítica, *Bacillus* sp. P45, cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, foi utilizada para a produção da enzima queratinase. O micro-organismo possui registro no GenBank com o número de acesso AY962474. Uma caracterização parcial baseada no sequenciamento 16S rDNA mostrou que esta cepa enquadra-se no grupo do *Bacillus subtilis*, micro-organismo reconhecido sob certificação GRAS. A cultura foi mantida a 4°C em ágar BHI (ágar infusão de cérebro e coração) (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009; SIRTORI et al., 2006;).

#### **2.1.2. Preparo do inóculo**

O inóculo foi preparado incubando-se a bactéria em ágar BHI a 30°C por 24 h. A cultura foi raspada da superfície do ágar e adicionada a uma solução estéril de NaCl 0,85% (m/v) até a suspensão atingir densidade óptica de 0,5 a 600 nm (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2011).

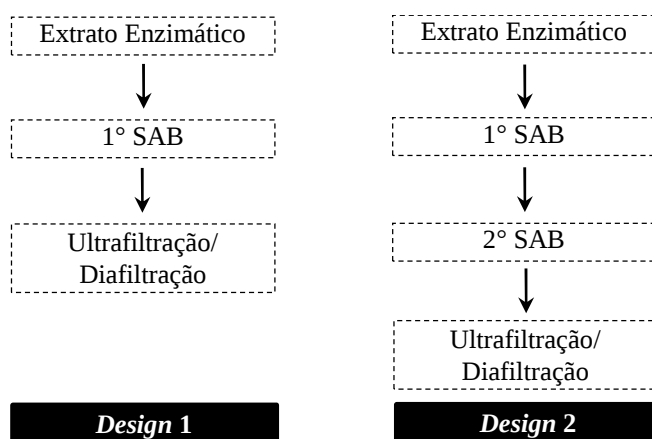
### 2.1.3. Cultivo e extração

A enzima foi produzida por cultivo submerso conforme Daroit, Corrêa e Brandelli (2011), utilizando farinha de penas como substrato. O meio de cultura foi composto por (g.L<sup>-1</sup>): farinha de penas (43) e NH<sub>4</sub>Cl (1,9) preparado em meio mineral (NaCl (0,5); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4)). O pH inicial do meio foi ajustado em 7,0 e o cultivo iniciado com 1% (v/v) de inóculo. As condições de cultivo foram 30°C, 125 rpm por 48 h. Ao término do cultivo, o extrato enzimático com células foi clarificado através de centrifugação (5000 x g, 20 min) e o sobrenadante contendo a enzima utilizado nas etapas de purificação.

## 2.2. Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico

A integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico foi avaliada em duas sequências (2 *designs*) conforme apresentado na Figura 1. Ao final de cada etapa foi avaliado o fator de purificação e a recuperação enzimática.

**Figura 1** – Diagrama esquemático dos *designs* utilizados na integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico.

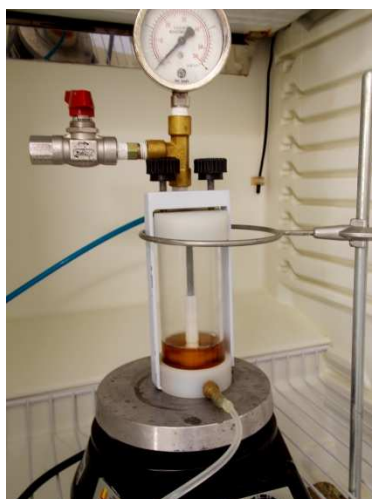


### 2.2.1. Remoção do polietilenoglicol

Para determinar o número de ciclos necessários para a remoção completa/parcial do polietilenoglicol (PEG) foram realizados ensaios na ausência do extrato enzimático. O processo de ultrafiltração foi operado no modo diafiltração em uma unidade de bancada de volume útil de 160 mL (Figura 2). A ultrafiltração/diafiltração foi operada utilizando um módulo de membrana com escoamento tipo convencional. Ao módulo da membrana foram adicionados 10 mL de uma solução de PEG 1500 Da com concentração de 0,51 g.mL<sup>-1</sup> e 20 mL de tampão tris-HCl pH 7.0, representando dois diavolumes. O sistema de diafiltração foi operado no modo

descontínuo utilizando uma membrana com massa molar limite de 10 kDa (Millipore, celulose regenerada). A cada ciclo foram permeados aproximadamente 20 mL, o processo foi interrompido e alimentado com tampão em volume igual ao volume permeado, e assim sucessivamente, até parcial/completa remoção do PEG. O sistema foi operado a pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup> e temperatura de 15°C (SEVERO, OLIVEIRA, MACHADO, 2011). Estes ensaios foram realizados em triplicata e a concentração de PEG determinada na entrada, na fração permeada de cada ciclo, e no retido.

**Figura 2** – Módulo de ultrafiltração/diafiltração utilizado na purificação da enzima queratinase.



### 2.2.2. Sistema aquoso bifásico: primeira etapa

O primeiro sistema aquoso bifásico foi composto (m/m) por 3% PEG 1500 Da, 23% de fosfato de potássio pH 7,0 e 8% de NaCl. Os sistemas foram preparados em tubos graduados, onde foram adicionados o PEG, tampão fosfato de potássio, NaCl e água. Os tubos foram homogeneizados até a dissolução completa do PEG, e o extrato enzimático o qual representa 20% (m/m) do sistema total foi adicionado. O sistema foi centrifugado (5000 x g, 30 min) e deixado em repouso até atingir o equilíbrio entre as fases. Os volumes das fases de topo e de fundo foram medidos, separados (ANTELO et al., 2010) e quantificados quanto à atividade enzimática, concentração de proteínas e a concentração de PEG. A fase de topo foi submetida à etapa seguinte (diafiltração ou segunda etapa de SAB), conforme o *design* de estudo (Figura 1).

Sistemas controle foram preparados como descrito anteriormente, com exceção da adição do extrato enzimático, onde este foi substituído por água.

### 2.2.3. Sistema aquoso bifásico: segunda etapa

O segundo sistema aquoso bifásico foi composto (m/m) por 36% da fase de topo (1º etapa do SAB), 36% de tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 e 28% de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os sistemas foram preparados em tubos graduados, onde foram adicionados a fase de topo, tampão tris-HCl e sulfato de amônio. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados (5000 x g, 30 min) e deixados em repouso até atingir o equilíbrio entre as fases. Os volumes das fases de topo e de fundo foram medidos, separados e quantificados quanto a atividade enzimática, teor de proteínas e concentração de PEG. A fase de topo foi submetida a etapa de diafiltração.

Sistemas controle foram preparados como descrito anteriormente, com adição da fase de topo sem extrato enzimático.

### 2.2.4. Operação da ultrafiltração/diafiltração

O processo de ultrafiltração foi operado como descrito na seção 2.2.1. Ao módulo de ultrafiltração foram adicionados 10 mL de fase de topo contendo a enzima juntamente com 20 mL de tampão tris-HCl pH 7,0 100 mM (2 diavolumes). O sistema de diafiltração consistiu em permear aproximadamente 20 mL, interromper o processo, e alimentar com tampão em volume igual ao volume permeado, e assim sucessivamente, até completar 5 ciclos. A atividade enzimática, concentração de proteínas e de PEG foram determinadas nas frações de entrada, permeado de cada ciclo e retido.

## 2.3. Zimograma

O zimograma foi realizado em gel de poliacrilamida 16% contendo 1 mg.mL<sup>-1</sup> de gelatina à temperatura ambiente, utilizando amostras do extrato enzimático bruto e as enzimas obtidas pelos *designs* 1 e 2, conforme descrito por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009). Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com tampão tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo 2,5% (v/v) de Triton X-100 por 30 min, e então com o mesmo tampão sem detergente por 60 min. Após 12 h de incubação a 30°C no último tampão, o gel foi corado com Azul de Coomassie R-250 e então descorado. As bandas de proteases aparecem como zonas claras em um fundo azul devido à hidrólise da gelatina.

## 2.4. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada para o extrato enzimático e para as frações dos *designs* 1 e 2 de acordo com o método de Laemmli (1970). As amostras foram misturadas em uma razão (1:3) com tampão de amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 200 V e 20 mA e o gel revelado com nitrato de prata. No gel também foi aplicado o marcador de baixa massa molar (GE Healthcare), que apresenta proteínas na faixa de 97 a 14,4 kDa (fosforilase b: 97 kDa; albumina: 66 kDa, ovoalbumina: 45 kDa, anidrase carbônica: 30 kDa, inibidor de tripsina: 20,1 kDa e  $\alpha$ -Lactoalbumina: 14,4 kDa).

## 2.5. Efeito da temperatura na atividade da enzima

A influência da temperatura na reação enzimática foi determinada através da atividade enzimática da queratinase purificada pelo *design* 2 nas temperaturas de 35°, 40°, 45°, 50°, 55° e 60°C, mantendo-se o pH fixo (tampão tris-HCl 100 mM pH 8,0) e utilizando como substrato a azocaseína.

## 2.6. Degradação de substratos proteicos

A aplicação do extrato enzimático bruto e da enzima purificada pelo *design* 2 foi avaliada na degradação de diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis – albumina de soro bovino, caseína, farinha de peixes, farinha de sangue, farinha de penas, penas, penas com tratamento térmico e soro de leite. As penas foram moídas em pequenos fragmentos de aproximadamente 5 mm. O tratamento térmico aplicado as penas foi de 121°C com pressão de 2,1 atm por 30 min.

A reação foi realizada conforme metodologia proposta por Daroit et al. (2010) com pequenas modificações. A reação consistiu na adição de 100  $\mu$ L de enzima (extrato bruto: 196,0 U.mL<sup>-1</sup>; *design* 2: 180,8 U.mL<sup>-1</sup>) em 400  $\mu$ L da suspensão de substrato (5 mg.mL<sup>-1</sup>). A reação foi incubada a 50°C por 1 hora e finalizada pela adição de 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Posteriormente, o meio reacional foi centrifugado (5000 x g, 20 min) e o sobrenadante utilizado para medir a transmitância a 280 nm. Para levar em conta a interferência dos substratos, ensaios controle foram realizados, onde a adição do TCA foi anterior à adição de enzima. Os resultados foram apresentados como porcentagem relativa do substrato que mostrou maior absorvância a 280 nm, considerado como 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## **2.7. Determinações analíticas**

### **2.7.1. Atividade proteolítica**

A atividade queratinolítica foi monitorada utilizando-se o substrato solúvel azocaseína, uma vez que a azoqueratina é insolúvel no meio reacional composto por tampão tris-HCl. Além disso, Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) demonstraram que a atividade proteolítica e queratinolítica do sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. P45 nos substratos de azocaseína e azoqueratina, respectivamente, mostraram-se relacionadas.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando o substrato azocaseína 1% (m/v) em tampão tris-HCl (100 mM, pH 8,0). A mistura reacional composta por 100 µL de tampão tris-HCl (100 mM, pH 8,0), 300 µL de azocaseína e 100 µL de enzima foi mantida em banho com agitação a 40°C por 30 min e finalizada pela adição de 600 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v). A mistura foi centrifugada (5000 x g, 20 minutos) e 800 µL do sobrenadante foi adicionado a 200 µL de hidróxido de sódio 1,8 M. A transmitância foi medida a 420 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0,1 unidade de absorvância, sob as condições do ensaio (DAROIT, CORRÊA, BRANDELLI, 2009).

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com testes controles para cada condição, onde o ácido tricloroacético foi adicionado anteriormente à enzima.

### **2.7.2. Proteínas**

A concentração total de proteínas foi determinada segundo metodologia de Bradford (1976) utilizando azul de Coomassie G-250 e albumina de soro bovino como padrão, com leitura de transmitância a 595 nm. A atividade específica foi expressa em termos de atividade enzimática (U) por massa de proteína (mg).

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para levar em conta a interferência dos componentes do sistema (PEG, fosfato de potássio e cloreto de sódio), testes controles foram realizados nas fases de topo e fundo na ausência do extrato enzimático.

### **2.7.3. Determinação de polietilenoglicol (PEG)**

A determinação quantitativa de polietilenoglicol foi realizada através da metodologia modificada do reagente de Dragendorff descrita por Jia e Tian (2009). O reagente

de Dragendorff gera um complexo amarelo-laranja, o qual é detectado espectrofotometricamente.

A reação foi composta por 5 mL da amostra, 4 mL de ácido clorídrico 0,05 M e 1 mL do reagente de Dragendorff. Após 15 min, a transmitância da mistura reacional foi determinada espectrofotometricamente a 510 nm, sendo a concentração calculada através de uma curva padrão utilizando PEG 1500 Da como padrão.

## 2.8. Determinação da eficiência do processo

A eficiência do processo de purificação da enzima queratinase foi avaliada pelo fator de purificação, recuperação enzimática e fatores de retenção, conforme descrito abaixo.

### 2.8.1. Fator de purificação e recuperação enzimática

O fator de purificação (*FP*) e a recuperação enzimática (% Rec) foram calculados conforme as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$FP = \frac{A_{e.s.}}{A_{e.e.}} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde  $A_{e.s.}$  é a atividade específica da fração de saída ( $\text{U.mg}^{-1}$ ) e  $A_{e.e.}$  é a atividade específica da fração de entrada ( $\text{U.mg}^{-1}$ ).

$$\%Rec = \frac{A_s \cdot V_s}{A_e \cdot V_e} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde  $A_s$  é a atividade da fração de saída ( $\text{U.mL}^{-1}$ );  $A_e$  é a atividade da fração de entrada ( $\text{U.mL}^{-1}$ );  $V_s$  é o volume da fração de saída (mL) e  $V_e$  é o volume da fração de entrada (mL).

### 2.8.2. Fluxo

O fluxo foi definido como o volume que permeia a membrana por unidade de área e tempo e calculado conforme a Equação 3.

$$Fluxo = \left( \frac{V_p}{A \cdot t} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:  $V_p$  é o volume permeado (L),  $A$  é a área da membrana ( $\text{m}^2$ ) e  $t$  é o tempo (h).

### 2.8.3. Fator de retenção do polietilenoglicol e atividade enzimática

O grau de retenção de um componente (PEG e atividade enzimática) pela membrana foi avaliado pelo fator de retenção (*FR*), definido pelas Equações 4 e 5.

$$FR_{(PEG)} = \left(1 - \frac{m_P}{m_E}\right) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:  $m_P$  é a massa do PEG na fração permeada (g) e  $m_E$  é a massa do PEG na fração de entrada (g).

$$FR_{(Atividade)} = \left(1 - \frac{A_P}{A_E}\right) \quad (\text{Eq. 5})$$

onde:  $A_P$  é a atividade enzimática total fração permeada (U) e  $A_E$  é a atividade enzimática total na fração de entrada (U).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico

No processo de purificação da enzima queratinase utilizando duas etapas de sistema aquoso bifásico, a enzima permaneceu na fase de topo – rica em polietilenoglicol (PEG), não particionando para a fase de fundo em ambas etapas. Portanto, a separação do polietilenoglicol da enzima pode ser realizada através da ultrafiltração operada no modo diafiltração. Para integrar a ultrafiltração/diafiltração com sucesso ao SAB é necessário conhecer a concentração de PEG das fases de topo dos SAB utilizados no processo de purificação, a qual está apresentada na Tabela 1.

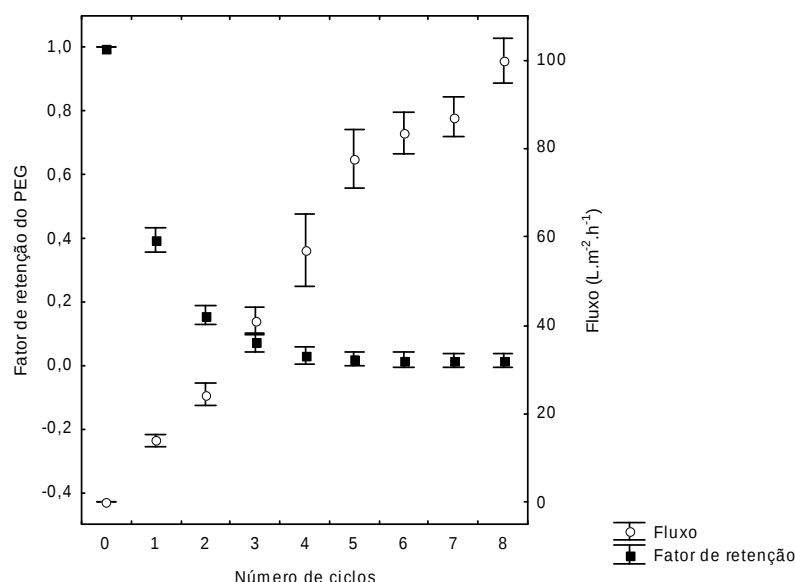
**Tabela 1** – Concentração de PEG nas fases de topo das duas etapas de purificação por sistema aquoso bifásico.

| SAB            | % Composição do sistema (m/m)      | PEG (g.mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------|------------------------------------|---------------------------|
| Primeira Etapa | 3% PEG                             | 0,37 ± 0,01               |
|                | 23% Fosfato de potássio<br>8% NaCl |                           |
| Segunda etapa  | 36% Topo – 1º Etapa                | 0,51 ± 0,01               |
|                | 36% Tris-HCl pH 7,0                |                           |
|                | 28% Sulfato de smônio              |                           |

A fase de topo proveniente da segunda etapa do SAB possui uma concentração de PEG maior do que a fase de topo da primeira etapa. Portanto, para determinar o número de ciclos necessários para a separação parcial/total do PEG foram realizados ensaios de diafiltração na ausência do extrato enzimático com uma solução de PEG com concentração igual à fase de

topo da segunda etapa de purificação ( $0,52 \pm 0,004 \text{ g.mL}^{-1}$ ). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.

**Figura 3** – Fator de retenção do PEG e fluxo médio do permeado em função do número de ciclos durante o processo de diafiltração na ausência do extrato enzimático.



A remoção do PEG ocorreu durante os cinco primeiros ciclos, onde a membrana permeou aproximadamente 98% do polietilenoglicol presente na solução inicial. A partir do quinto ciclo, o processo de diafiltração entrou em equilíbrio onde a remoção do PEG é praticamente nula.

O comportamento do fluxo médio da fração permeada (Figura 3) apresenta dois regimes: um regime inicial onde o fluxo aumenta rapidamente conforme a permeação de PEG, e um regime final, onde a permeação do PEG é baixa e o fluxo aumenta lentamente. À medida que o PEG permeia pela membrana, a concentração deste componente na fração retida próximo à superfície da membrana diminui, e como consequência ocorre o aumento do fluxo, sendo este aumento de 7,1 vezes, considerando todo processo. O aumento do fluxo durante a diafiltração do PEG foi observado por Lentsch, Aimar e Orosco (1993).

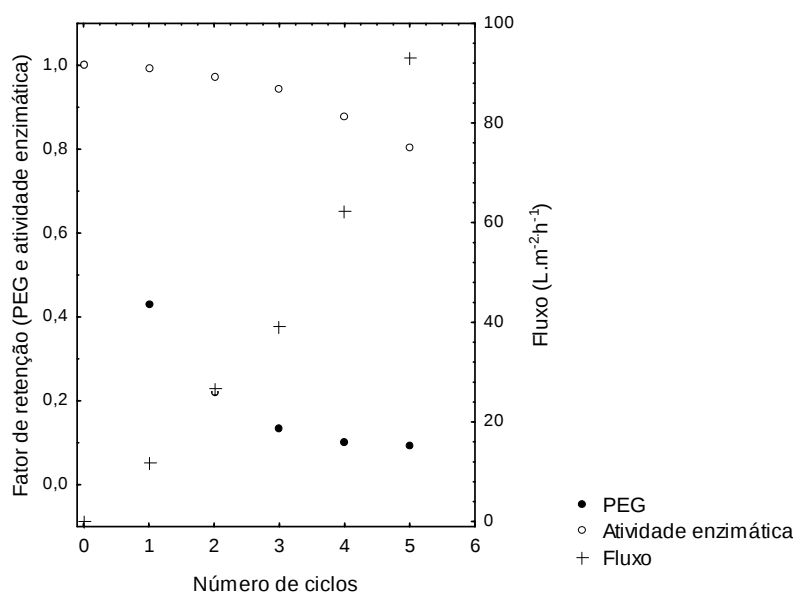
Os resultados obtidos evidenciam que a diafiltração é um processo eficiente para a remoção do PEG 1500 Da, o qual permeia em uma membrana com massa molar limite de 10 kDa. Assim, ficou estabelecido que o processo de diafiltração fosse operado ao longo de cinco ciclos e cada ciclo com adição de dois diavolumes de tampão tris-HCl.

No *design* 1 a enzima queratinase foi purificada pela primeira etapa do SAB e submetida à diafiltração. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. A enzima purificada em uma única etapa do sistema aquoso bifásico apresentou fator de purificação de 3,6 vezes e recuperação de 92,8%. O processo de diafiltração promoveu a purificação da enzima, onde o fator de purificação foi de 1,4 vezes e a recuperação enzimática de 74,0%.

**Tabela 2** – Fator de purificação e recuperação enzimática para o *design* 1.

| Etapa                | Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> ) | PEG (g.mL <sup>-1</sup> ) | Fator de Purificação |        | % Recuperação enzimática |        |
|----------------------|--------------------------------------------|---------------------------|----------------------|--------|--------------------------|--------|
|                      |                                            |                           | Etapa                | Global | Etapa                    | Global |
| Extrato enzimático   | 415,1                                      | -                         | 1                    | -      | 100                      | -      |
| SAB: 1ª etapa        | 1496,5                                     | 0,40                      | 3,6                  | -      | 92,8                     | -      |
| Diafiltração: retido | 2022,4                                     | 0,01                      | 1,4                  | 4,9    | 74,0                     | 69,0   |

**Figura 4** – Fluxo médio do permeado e fatores de retenção de PEG e atividade enzimática no processo de diafiltração para o *design* 1.



A Figura 4 apresenta o fator de retenção do PEG e da atividade enzimática durante a diafiltração no *design* 1. A utilização de ciclos consecutivos durante a diafiltração permeou parte da enzima através da membrana, sendo o fator de retenção após cinco ciclos igual a 0,80. A atividade enzimática foi determinada em cada fração permeada, portanto a passagem da enzima ao longo dos ciclos da diafiltração pode explicar a recuperação enzimática obtida (74%).

Somando-se a isso, o fabricante indica que o fator de retenção da membrana é igual a 95%, assim enzimas proteolíticas com massa molar próximas a massa molar limite da membrana (10 kDa) permearam ao longo da diafiltração, uma vez que a atividade enzimática é sobre o substrato azocaseína, o qual detecta proteases.

O fator de retenção do PEG ao final do processo de diafiltração foi igual a 0,10, permanecendo 10% da massa inicial de PEG na fração retida. A retenção do PEG pode ter sido causada pela incrustação da membrana (*fouling*) e polarização de concentração. As incrustações ocorrem devido a diversos fenômenos, tais como: **(i)** adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana e/ou no interior de seus poros devido às interações físico-químicas com o material da membrana; **(ii)** entupimento de poros por moléculas ou partículas em suspensão e **(iii)** depósito de material em suspensão na superfície da membrana com a formação de uma torta de filtração. A polarização de concentração é caracterizada pela concentração do soluto próximo a superfície da membrana ser maior do que no centro da solução, provocando uma resistência a transferência de massa. O fenômeno de polarização de concentração é reversível, enquanto que a incrustação é considerada total ou parcialmente irreversível (HABERT, BORGES, NOBREGA, 2006).

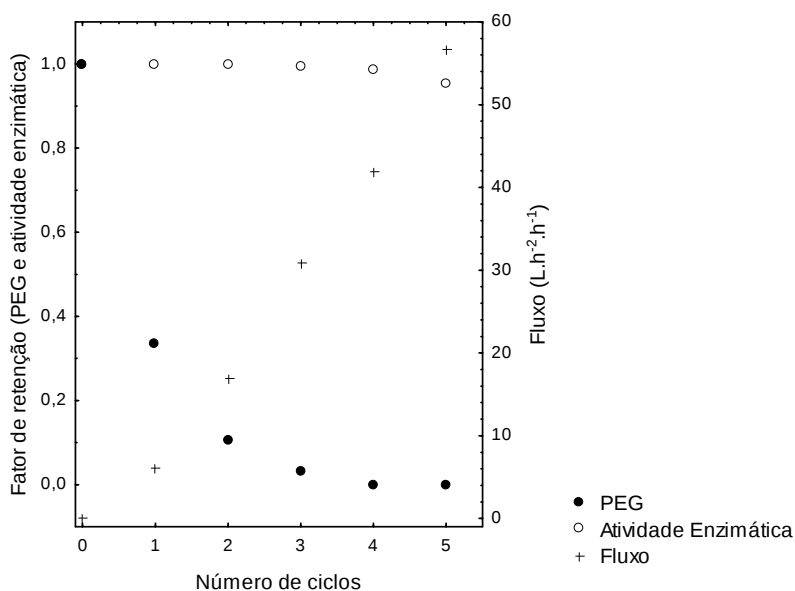
A diafiltração é uma operação de ‘lavagem’ da fase de topo, a qual contém PEG, enzimas, proteínas e sais. Os consecutivos ciclos ou lavagens permitiram que o fluxo médio do permeado aumentasse (Figura 4) de  $11,8 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  (primeiro ciclo) para  $93,0 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  (quinto ciclo) ao longo da diafiltração. O processo de diafiltração permite a diminuição da concentração dos componentes na fração retida, reduzindo o fenômeno de polarização de concentração na membrana devido às consecutivas lavagens, conduzindo a maiores fluxos.

A integração da primeira etapa do SAB com o processo de diafiltração promoveu a purificação da enzima queratinase em 4,9 vezes com 69% de recuperação enzimática. Além disso, foi separado 90% do PEG.

No *design* 2, a enzima foi submetida a duas etapas de SAB seguida pela diafiltração, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3. Na primeira etapa de purificação, a enzima apresentou fator de purificação de 3,9 vezes e recuperação enzimática de 87,9%. A fase de topo, inerente à segunda etapa de purificação por SAB, apresentou fator de purificação de 1,4 e recuperação enzimática de 75,9% e a fração retida do processo de diafiltração apresentou fator de purificação de 1,4 vezes e recuperação enzimática de 90,8%.

**Tabela 3** – Fator de purificação e recuperação enzimática para o *design 2*.

| Etapa                | Atividade específica (U.mg <sup>-1</sup> ) | PEG (g.mL <sup>-1</sup> ) | Fator de purificação |        | % Recuperação enzimática |        |
|----------------------|--------------------------------------------|---------------------------|----------------------|--------|--------------------------|--------|
|                      |                                            |                           | Etapa                | Global | Etapa                    | Global |
| Extrato enzimático   | 425,9                                      | -                         | 1                    | -      | 100                      | -      |
| SAB: 1ª etapa        | 1681,9                                     | 0,37                      | 3,9                  | -      | 87,9                     | -      |
| SAB: 2ª etapa        | 1847,7                                     | 0,54                      | 1,4                  | 4,3    | 75,9                     | 62,0   |
| Diafiltração: retido | 2582,7                                     | 0,00                      | 1,4                  | 6,1    | 90,8                     | 56,3   |

**Figura 5** – Fatores de retenção de PEG e de atividade enzimática durante o processo de diafiltração para o *design 2*.

No *design 2*, o PEG foi totalmente removido, sendo o fator de retenção igual a zero (Figura 5). O fator de retenção da atividade enzimática, no quinto ciclo, foi igual a 0,95, demonstrando que apenas 5% da enzima permeou pela membrana. Durante o processo de diafiltração o fluxo aumentou cerca de 9,3 vezes, sendo no primeiro ciclo igual a 6,12 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> e no quinto ciclo igual a 56,7 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.

Comparando os fluxos médios da fração permeada do quinto ciclo na presença do extrato enzimático (56,7 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, Figura 5) com a fração permeada na ausência do extrato enzimático (77,6 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, Figura 3), nota-se que quando o extrato enzimático está presente o fluxo é menor. Este decréscimo no fluxo é esperado, devido a presença de impurezas no extrato enzimático, as quais provocam os fenômenos de polarização de concentração e incrustações na membrana.

A concentração inicial de PEG na diafiltração altera o fluxo da fração permeada, sendo o fluxo inversamente proporcional à concentração. Isso pode ser verificado quando comparamos os *designs* 1 e 2, um aumento de 35% na concentração do PEG conduziu a uma redução no fluxo de 39%. Veide, Lindbäck e Enfors (1989) observaram comportamento similar do fluxo em função do aumento da concentração de PEG.

Lentsch, Aimar e Orozco (1993) compararam o desempenho da diafiltração de uma solução de PEG 20 kDa e de uma mistura com albumina de soro bovino (BSA) (10 g.L<sup>-1</sup> de PEG e 10 g.L<sup>-1</sup> de BSA) utilizando uma membrana de 100 kDa. Na ausência de BSA, a diafiltração permitiu a remoção do PEG com constante eficiência durante o processo, sendo o fator de retenção próximo a 0%. Porém, quando a diafiltração foi realizada com uma mistura de BSA e PEG ocorreu uma redução do fluxo de permeado devido ao *fouling* da membrana, o que limitou a remoção do PEG, sendo o coeficiente de retenção próximo a 80%. Os autores concluíram que não é conveniente remover o PEG 20 kDa a partir da solução de BSA utilizando uma membrana de 100 kDa.

A recuperação de  $\beta$ -galactosidase de uma solução contendo PEG 4000 foi estudada por Veide, Lindbäck e Enfors (1989) através da diafiltração no modo contínuo. Para que o PEG fosse removido eficientemente da enzima, a solução inicial foi diluída 10 vezes, sendo o coeficiente de retenção do PEG e da  $\beta$ -galactosidase de 0,04 e 0,9, respectivamente.

Em geral, todas as etapas de purificação implicam em perdas enzimáticas, podendo ser grandes ou pequenas. Ao longo de um *design* que envolve muitas etapas, a tendência é que a recuperação global se torne cada vez menor. O *design* 2 globalmente apresenta um ganho de 24% no fator de purificação e uma perda de 18% na recuperação quando comparado ao *design* 1. A perda na recuperação enzimática é justificada por apresentar uma etapa de purificação a mais.

No presente estudo, foi possível separar o PEG da enzima queratinase, atingindo fatores de retenção de polietilenoglicol na ordem de 0,10 (*design* 1) e 0,0 (*design* 2). Uma vantagem da separação do PEG, é que este pode ser recuperado do processo final e reutilizado. Os métodos utilizados para recuperar o PEG normalmente envolvem desproteinização, dessalinização e extração do PEG com um solvente orgânico seguido de evaporação (HATTI-KAUL, 2001). Outro método utilizado foi desenvolvido e patenteado por Nagaraj et al. (2005), em que o PEG é separado da solução através da exposição a um campo com ondas de micro-ondas, seguido de secagem (100-105°C) e por fim recuperado (até 95%).

Existem poucos relatos na literatura que utilizam a integração do SAB à ultrafiltração/diafiltração, sendo esses referentes a enzimas como amiloglicosidase (TANUJA et al., 2000), lactoperoxidase (NANDINI, RASTOGI, 2011) e peroxidase (SRINIVAS, BARHATE, RAGHAVARAO, 2002) e ao biocorante C-ficocianina (PATIL, RAGHAVARAO, 2007). As enzimas foram purificadas por duas etapas de SAB, na primeira etapa todas as enzimas migraram para a fase de topo e na segunda etapa foram particionadas para a fase de fundo, sendo esta fase (rica em sal) submetida à ultrafiltração. Esses trabalhos não estudaram a remoção do PEG, com exceção de Patil e Raghavarao (2007) que utilizam a ultrafiltração-centrifugação (massa de corte da membrana 30 kDa e 10000 rpm) para a remoção do PEG da C-ficocianina. A integração do SAB à ultrafiltração apresentou fatores de purificação que variam de 3,1 a 5,9 vezes com recuperações enzimáticas de 76 a 150%, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

A enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, seguido de filtração em gel e cromatografia de troca iônica. A recuperação global deste processo foi de 18% com fator de purificação de 20,1 vezes (DAROIT et al., 2010). Este protocolo de purificação resulta em um produto altamente purificado, o qual é interessante quando se deseja conhecer as propriedades bioquímicas e catalíticas da enzima. Em contrapartida, volumes pequenos de enzima purificada são obtidos. Neste sentido, quando um alto grau de pureza do bioproduto não é requerido e se deseja obter volumes maiores do bioproduto em questão, pode-se aplicar a purificação da enzima por sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração/diafiltração.

Assim, foi possível purificar a enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 por duas etapas de SAB integrado à ultrafiltração/diafiltração, além de separar a enzima do PEG, obtendo fator de purificação de 6,1 vezes e recuperação enzimática de 56,3%.

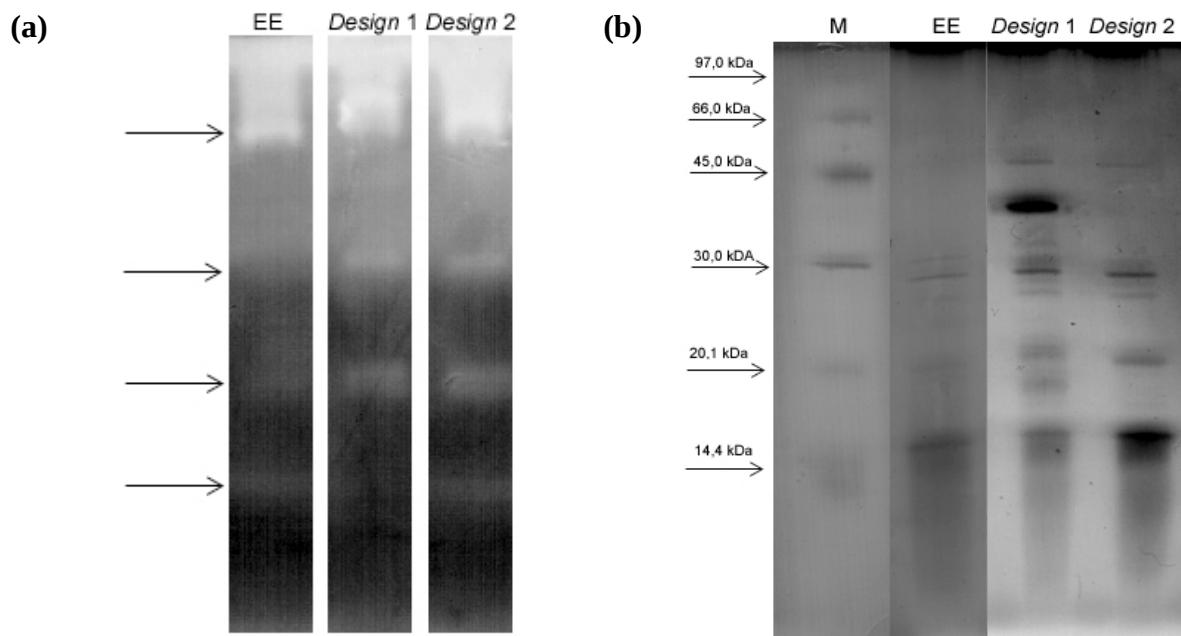
### **3.2. Zimograma e eletroforese**

Com o objetivo de avaliar as enzimas com atividade presente em cada uma das frações do extrato enzimático bruto e dos *designs* 1 e 2 foi realizado a zimografia em um gel contendo gelatina. Simultaneamente foi avaliado o perfil eletroforético das frações. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.

No zimograma é possível verificar que existem pelo menos 4 enzimas que apresentam atividade gelanolítica no extrato bruto, *designs* 1 e 2. No *design* 1, a banda de menor massa molar é menos intensa quando comparada as demais frações. No extrato bruto, as

enzimas com massa molar intermediária apresentaram uma atividade gelanólítica menos intensa quando comparada às frações purificadas.

**Figura 6 – (a) Zimograma e (b) eletroforese das frações extrato enzimático bruto (EE), *designs* 1 e 2 e marcador (M).**



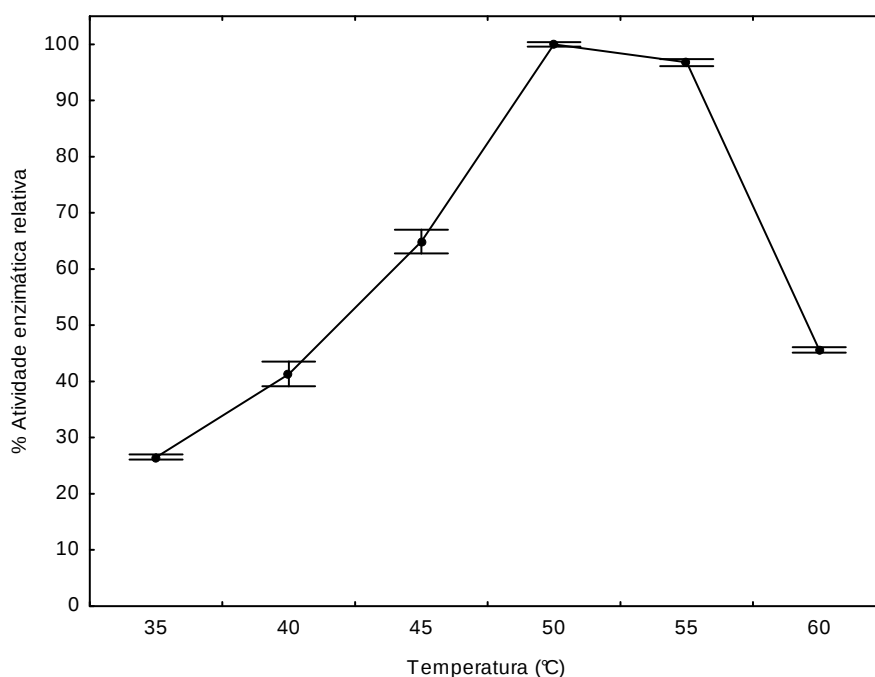
No perfil eletroforético é possível verificar que pelo menos 3 proteínas são comuns ao extrato bruto, *designs* 1 e 2, sendo elas de aproximadamente 28 kDa, 20 kDa e 15 kDa, e no *design* 1 a presença adicional de uma proteína de aproximadamente 38 kDa.

Daroit et al. (2010) purificaram queratinase de *Bacillus* sp. P45 com massa molar de aproximadamente 26 kDa, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, onde o perfil eletroforético mostra uma protease de aproximadamente 28 kDa em todas as frações – extrato bruto e *designs* 1 e 2.

### 3.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima

Para verificar a aplicação da enzima purificada (*design* 2) na degradação de diferentes substratos enzimáticos foi avaliada a temperatura ótima de atuação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7.

**Figura 7** – Atividade enzimática relativa (%) da enzima purificada (*design 2*) em função da temperatura.



A temperatura ótima de atividade enzimática foi de 50°C, sendo a atividade nesta temperatura igual a 2319 U.mL<sup>-1</sup>. A temperatura ótima de queratinases de *Bacillus* varia entre 50-65°C (DAROIT et al. 2010; CHENG et al., 1995; KOJIMA et al., 2006; PILLAI, ARCHANA, 2008). A queratinase de 26 kDa de *Bacillus* sp. P45 apresentou atividade ótima na temperatura de 55°C (DAROIT et al. 2010), reforçando assim os resultados obtidos no presente estudo.

### 3.4. Hidrólise de substratos proteicos

A enzima purificada pelo *design 2* foi escolhida com base no fator de purificação e no perfil eletroforético para a hidrólise de diferentes substratos proteicos. Para verificar se a enzima purificada atuaria de maneira diferente na hidrólise de substratos proteicos, a mesma foi comparada ao extrato bruto e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Hidrólise de diferentes substratos proteicos catalisados pelo extrato enzimático e pela enzima purificada (*design 2*).

| Substrato                    | Atividade relativa (%)        |                            |
|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|                              | Extrato enzimático bruto      | Design 2                   |
| Albumina de soro bovino      | 23,9 ± 0,9 <sup>b, C</sup>    | 49,3 ± 6,3 <sup>a, B</sup> |
| Caseína                      | 93,6 ± 3,2 <sup>b, A</sup>    | 100 ± 1,9 <sup>a, A</sup>  |
| Farinha de peixes            | 10,2 ± 3,2 <sup>a, D, E</sup> | 15,5 ± 4,4 <sup>a, D</sup> |
| Farinha de penas             | 30,6 ± 0,5 <sup>b, B</sup>    | 35,5 ± 0,5 <sup>a, C</sup> |
| Farinha de sangue            | 0,0 ± 0,0 <sup>b, H</sup>     | 13,0 ± 1,5 <sup>a, D</sup> |
| Penas                        | 7,3 ± 0,1 <sup>b, E</sup>     | 11,3 ± 1,4 <sup>a, D</sup> |
| Penas com tratamento térmico | 11,8 ± 1,6 <sup>b, D, E</sup> | 16,9 ± 0,1 <sup>a, D</sup> |
| Soro de leite em pó          | 15,3 ± 3,3 <sup>a, D</sup>    | 12,9 ± 1,8 <sup>a, D</sup> |

Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente ao nível 95% de confiança (teste t). Letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente ao nível 95% de confiança (teste Tukey).

A queratinase bruta e purificada de *Bacillus* sp. P45 foi capaz de catalisar a reação de hidrólise de diferentes substratos, tendo preferência sobre a caseína. A hidrólise de substratos solúveis como a caseína é tipicamente reportada como sendo mais efetiva do que a hidrólise dos substratos insolúveis, como a queratina presente nas penas (DAROIT et al., 2010; GRADIŠAR et al., 2000; HAN et al., 2012; SYED et al., 2009).

A hidrólise dos diferentes substratos pela enzima purificada, com exceção dos substratos farinha de peixe e soro de leite em pó, foi maior quando comparado à enzima bruta, demonstrando assim sua eficiente capacidade catalítica, e justificando sua purificação.

O extrato enzimático e a enzima purificada pelo *design 2* hidrolisaram com maior eficiência a farinha de penas do que as penas. A farinha é obtida através da cocção a alta pressão e moagem das penas, o que resulta na descaracterização das penas e desestabilização da estrutura da queratina devido à quebra das pontes dissulfeto, facilitando a atuação da enzima.

A queratinase de 26 kDa purificada por Daroit et al. (2010) foi capaz de hidrolisar diversos substratos proteicos, como a caseína, farinha de penas e de peixes.

A hidrólise nos substratos queratinosos não ocorreu de forma extensa. O mecanismo de degradação da queratina por estas enzimas não é bem elucidado, mas acredita-se que a atividade queratinolítica não se deve apenas à presença de uma enzima, e sim a um

sistema sinérgico com proteases e dissulfeto redutases ou ainda um agente redutor. Assim, o mecanismo queratinolítico compreenderia duas etapas: a sulfitólise ou redução das pontes dissulfeto e a proteólise (GUPTA E RAMNANI, 2006; YAMAMURA et al., 2002). Pode-se especular que a sulfitólise requer a presença de células vivas (BÖCKLE E MÜLLER, 1997; RAMNANI, SINGH E GUPTA, 2005).

Portanto, a queratinase purificada por duas técnicas passíveis de ampliação de escala – sistema aquoso bifásico integrado à ultrafiltração/diafiltração, pode ser utilizada para catalisar a reação de hidrólise de substratos proteicos com igual ou superior eficiência quando comparada ao seu extrato bruto.

#### 4. CONCLUSÃO

A integração da ultrafiltração/diafiltração ao sistema aquoso bifásico permitiu a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45. No *design* 1, formado por uma primeira etapa de SAB e diafiltração, a enzima queratinase foi purificada 4,9 vezes com recuperação enzimática de 69,0%. Enquanto que o *design* 2, composto por duas etapas de SAB e diafiltração, purificou a enzima queratinase 6,1 vezes com recuperação enzimática de 56,3%. A diafiltração foi eficiente para separar o polietilenoglicol. A enzima purificada pelo *design* 2 apresentou atividade ótima na temperatura de 50°C, e foi capaz de catalisar com igual e maior eficiência a hidrólise de substratos proteicos solúveis e insolúveis quando comparada à enzima bruta, justificando assim sua purificação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTELO, F.S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J.A.V.; KALIL, S.J. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.5, p.921-926, 2010.

BÖCKLE, B.; MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.790-792, 1997.

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

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

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, n.3, p.358-363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, n.1, p.45-51, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.28, n.5-6, p.370-379, 2010.

DEWITT, C.A.M.; MORRISSEY, M.T. Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. **Bioresource Technology**, v.81, n.3, p.241-247, 2002.

FAKHFAKH, N.; GARGOURI M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FEKI, A.E.; NASRI M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.4, p.938-949, 2012.

GALLO, G.; ANGELIS, M.; MCSWEENEY, P.L.H.; CORBOD, M.R.; GOBBETTI, M. Partial purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.535-544, 2005.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v.167, n.1, p.47-53, 2000.

GILDBERG, A. Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. **Bioresource Technology**, v.39, n.3, p.271-276, 1992.

GRADIŠAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n.2, p.196-200, 2000.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, n.1, p.21-33, 2006.

HABERT A. C., BORGES C. P., NOBREGA, R. **Processo de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 180 p., 2006.

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, n.9, p.2211-2221, 2012.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems. **Molecular Biotechnology**, v.19, n.3, p.269-277, 2001.

JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**, v.250, n.1-3, p.87-93, 2009.

KOJIMA, M.; KANAI, M.; TOMINAGA, M.; KITAZUME, S.; INOUE, A.; HORIKOSHI, K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v.10, n.3, p.229-235, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LENTSCH, S.; AIMAR, P.; OROZCO, J.L. Enhanced separation of albumin-poly (ethylene glycol) by combination of ultrafiltration and electrophoresis. **Journal of Membrane Science**, v.80, n.1, p.221-232, 1993.

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase**. 190 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, n.1-2, p.196-201, 2007.

NAGARAJ, N.; SAMPANGI, C.; KARUMANCHI, S.M.S.R. **Process for separation and recovery of polyethylene glycol (PEG) from spent aqueous two-phase systems**. US Patent 6863828, 2003.

NAJAFI, M.F.; KEMBAVI A. One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, n.2, p.535-539, 2005.

NANDINI, K.E.; RASTOGI N.K. Integrated downstream processing of lactoperoxidase from milk whey involving aqueous two-phase extraction and ultrasound-assisted ultrafiltration. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.162, n.1, p.173-185, 2011.

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

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, n.2, p.156-164, 2007.

PILLAI, P.; ARCHAN, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, n.4, p.643-650, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.7, p.1909-1920, 2010.

RAMNANI, P.; SINGH, R.; GUPTA, R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.51, n.3, p.191-196, 2005.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

SEVERO, E.E.; OLIVEIRA, J.M.G.; MACHADO, J.R. **Separação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 utilizando ultrafiltração**. 2011. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SIRTORI, L.R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D.M.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n.6, p.357-363, 2006.

SRINIVAS, N.D.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v.54, n.1, p.1-6, 2002.

SYED, D.G.; LEE, J.C.; LI, W.; KIM, C.; AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v.100, n.5, p.1868-1871, 2009.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N.D.; GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.23, n.1, p.63-68, 2000.

TORRES, M.R.; MARÍN, F.R.; RAMOS, A.J.; SORIANO, E. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration. **Journal of Food Engineering**, v.54, n.3, p.215-219, 2002.

VEIDE, A.; LINDBÄCK, T.; ENFORS, S-O. Recovery of  $\beta$ -galactosidase from a poly (ethylene glycol) solution by diafiltration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, n.11, p.744-751, 1989.

WANG, X.L.; ZHANG, C.; OUYANG P. The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. **Journal of Membrane Science**, v.204, n.1-2, p.271-281, 2002.

XIE, F.; CHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; XUE, Z.; LUO, Y.; QIAN, S., Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. Strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.344-350, 2010.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.294, n.5, p.1138-1143, 2002.

YOSHIOKA, M.; MIWA, T.; HORII, H.; TAKATA, M.; YOKOYAMA, T.; NISHIZAWA, K.; WATANABE, M.; SHINAGAWA, M.; MURAYAMA, Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.509-915, 2007.

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL**

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

Foi possível purificar a enzima queratinase por duas etapas de sistemas aquosos bifásicos integrado à ultrafiltração/diafiltração. A primeira etapa de purificação por SAB foi maximizada onde o sistema formado por 3% de PEG, 23% de fosfato de potássio e 8% de NaCl promoveu a partição da enzima para a fase de topo, obtendo fator de purificação na ordem de 4,4 vezes e 87% de recuperação enzimática.

Na segunda etapa de purificação por SAB, o sistema foi composto por 36% de topo proveniente da primeira etapa, 36% de tampão tris-HCl 100 mM pH 7,0 e 28% de sulfato de amônio, a enzima foi particionada para a fase rica em PEG, onde fatores de purificação na ordem de 1,8 (etapa) e 5,6 (global) vezes e recuperações de 100% (etapa) e 90% (global) foram obtidas. Assim, duas etapas de purificação por SAB promoveu um incremento no fator de purificação mantendo o rendimento enzimático.

A integração das duas etapas de purificação por sistema aquoso bifásico à ultrafiltração/diafiltração (*design 2*) permitiu a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45 onde fatores de purificação na ordem de 6,1 vezes e recuperação enzimática de 56,3% foram obtidos. Somando-se a isso, a diafiltração foi eficiente para a separação do polietilenoglicol da enzima.

A enzima purificada foi capaz de degradar diferentes substratos proteicos solúveis e insolúveis. A hidrólise da enzima purificada na maior parte dos substratos foi superior à enzima bruta, justificando assim a purificação. A queratinase de *Bacillus* sp. P45 pode ser aplicada para a obtenção de hidrolisados proteicos e estes serem aplicados em produtos comerciais.

O sistema aquoso bifásico e a ultrafiltração/diafiltração se mostraram uma técnica alternativa frente aos processos convencionais para a purificação da enzima queratinase de *Bacillus* sp. P45, principalmente quando um alto grau de pureza da enzima não é requerido, além de serem passíveis para purificação em larga escala.

## 5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar a ultrafiltração/diafiltração no modo contínuo para a purificação da queratinase e a remoção do PEG;
- Avaliar o *fouling* do processo de ultrafiltração/diafiltração;
- Ampliar a escala do processo de ultrafiltração/diafiltração na purificação da enzima queratinase;
- Investigar pH e temperatura ótimos da enzima purificada na degradação de cada substrato específico;
- Caracterizar a enzima purificada.
- Investigar a aplicação da enzima purificada na síntese de peptídeos.

**CAPÍTULO V**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.A. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. **Advances in Protein Chemistry**, v.24, p.309-341, 1970.
- ALBERTSSON, P.A. **Partitioning of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology**. New York: John Wiley and Sons, p.346, 1986.
- ALBERTSSON, P.A.; TJERNELD, F. Phase diagrams. **Methods in Enzymology**, v.228, p.3-13, 1994.
- ANDERSSON, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Bioconversions in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.12, n.4, p.242-254, 1990.
- ANDREWS, B.A.; NIELSEN, S.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of monoclonal antibodies in aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, v.6, n.5, p.303-313, 1996.
- ANTELO, F.S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J.A.V.; KALIL, S.J. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.5, p.921-926, 2010.
- ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; HACHEM, F.; ANDREW, B.A. Model for predicting the partition behaviour of proteins in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v.668, n.1, p.47-54, 1994.
- ASPELUND, M.T.; GLATZ, C.E. Clarification of aqueous corn extracts by tangential flow microfiltration. **Journal of Membrane Science**, v.365, n.1, p.123-129, 2010.
- AZEVEDO, A.M.; ROSA, P.A.; FERREIRA, I.F.; AIRES-BARROS, M.R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.4, p.240-247, 2009.
- BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, n.1, p.83-89, 2008.
- BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v.47, n.12, p.2455-2462, 2012.
- BAKER, R.W. **Membrane technology and applications**. California: John Wiley and Sons Ltd, p.538, 2004.
- BALAJI, S.; KUMAR, M.S.; KARTHIKEYAN R.; KUMAR R.; KIRUBANANDAN S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL P.K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.11, p.2741-2745, 2008.
- BÁLINT, B.; BAGI, X.; TOTH, A.; RÁKHELY, G.; PEREI, K.; KOVÁCS, K.L. Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, n.4, p.404-410, 2005.
- BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Structural Biology**, v.134, n.2-3, p.95-102, 2001.
- BELHOCINE, D.; GRIB, H.; ABDESSMED, D.; COMEAU, Y.; MAMERI, N. Optimization of plasma proteins concentration by ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v.142, n.2, p.159-171, 1998.
- BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **Journal of Chromatography B**, v.807, n.1, p.33-38, 2004.

BERNAL, C.; CAIRÓ, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, n.1-2, p.49-54, 2006.

BÖCKLE, B.; GALUNSKI, B.; MÜLLER, R. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530. **Applied of Environment Microbiology**, v.61, n.10, p.3705-3710, 1995.

BÖCKLE, B.; MÜLLER, R. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.2, p.790-792, 1997.

BOYER, P.D. **The enzymes**. New York: Academic Press, 1971.

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

BRANDELLI, A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food and Bioprocess Technology**, v.1, n.2, p.105-116, 2008.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D.J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v.85, n.6, p.1735-1750, 2010.

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.

CAO, L.; TAN, H.; LIU, Y.; XUE, X.; ZHOU, S. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n.3, p.389-397, 2008.

CAO, Z.J.; ZHANG, Q.; WEI, D.K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X.Q.; ZHOU, M.H. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.36, n.2, p.181-188, 2009.

CDR. Wisconsin Center for Dairy Research. **Membranes 101**. Disponível em: <[http://www.cdr.wisc.edu/programs/dairyingredients/pdf/membranes\\_101.pdf](http://www.cdr.wisc.edu/programs/dairyingredients/pdf/membranes_101.pdf)>. Acesso em: 07 fev. 2013.

CERVEIRA, G.P.; SALA, L.; BRITES, M.L. **Purificação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 utilizando sistema aquoso bifásico**. 2010. 41 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2010.

CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; LUMYONG, S. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**, v.28, p.241-245, 2002.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnology Advances**, v.24, n.5, p.482-492, 2006.

CHEN, J.P.; LEE, M.S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, n.11, p.1021-1027, 1995.

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

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from

cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v.40, n.11, p.3514-3518, 2005.

COHLBERG, J.A. Textbook error: the structure of alpha-keratin. **Trends in Biochemical Sciences**, v.18, n.10, p.360-362, 1993.

COSTA, S.A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I.C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v.743, n.1-2, p.339-348, 2000.

DA SILVA, L.H.M.; LOH, W. Calorimetric investigation of the formation of aqueous two phase system in ternary mixture of water, poly(ethylene oxide) and electrolytes (or dextran). **The Journal Physical Chemistry B**, v.104, n.43, p.10069-10073, 2000.

DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.73, n.2, p.242-244, 1997.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, n.3, p.358-363, 2009.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, n.1, p.45-51, 2011.

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.28, n.5-6, p.370-379, 2010.

DEWITT, C.A.M.; MORRISSEY, M.T. Parameters for the recovery of proteases from surimi wash water. **Bioresource Technology**, v.81, n.3, p.241-247, 2002.

DIAMOND, A.D.; HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.47, p.89-135, 1992.

FAKHFAKH, N.; GARGOURI M.; DAHMEN, I.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FEKI, A. E.; NASRI M. Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.4, p.938-949, 2012.

FOLEY, G. Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration. **Desalination**, v.196, n.1-3, p.160-163, 2006.

FORCINITI, D.; HALL, C.K.; KULA, M.R. Protein partitioning at the isoelectric point: influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. **Biotechnology and Bioengineering**, v.38, n.9, p.986-994, 1991.

FRASER, R.B.D.; MACRAE, T.P.; ROGERS, G.E. **Keratins – their composition, structure and biosynthesis**. Illinois: Charles C. Thomas, p.304, 1972.

FRIEDRICH, A.B; ANTRANIKIAN, G. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.8, p.2875-2882, 1996.

FRIEDRICH, J.; GRADIŠAR, H.; VRCCCL, M.; POGACNIK, A. In vitro degradation of porcine skin epiderms by a fungal keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, n.4, p.455-460, 2005.

GALLO, G.; ANGELIS, M.; MCSWEENEY, P.L.H.; CORBOD, M. R.; GOBBETTI, M. Partial purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.535-544, 2005.

GHOSH, R.; CUI, F.F. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. **Journal of Membrane Science**, v.167, n.1, p.47-53, 2000.

GHOSH, R.; CUI, Z.F. Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: effect of pH and membrane pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v.139, n.1, p.17-28, 1998.

GILDBERG, A. Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. **Bioresource Technology**, v.39, n.3, p.271-276, 1992.

GRADIŠAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, n.2, p.196-200, 2000.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, n.1, p.381-395, 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, n.1, p.21-33, 2006.

HABERT A. C., BORGES C. P., NOBREGA, R. **Processo de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 180 p., 2006.

HACHEM, F.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Hydrophobic partitioning of proteins in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, n.7, p.507-517, 1996.

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, n.9, p.2211-2221, 2012.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems. **Molecular Biotechnology**, v.19, n.3, p.269-277, 2001.

HE, C.; LI, S.; LIU, H.; LI, K.; LIU F. Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. **Journal of Chromatography A**, v.1082, n.2, p.143-149, 2005.

HOLLAND, B.; KACKMAR, J.; CORREDIG, M. Isolation of a whey fraction rich in  $\alpha$ -lactalbumin from skim milk using tangential flow ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.10, p.5604-5607, 2012.

HOTHA, S.; BANIK R.M. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.69, n.1, p.5-10, 1997.

ICHIDA, J.M.; KRIZOVA, L.; LEFEVRE, C.A.; KEENER, H.M.; ELWELL, D.L.; BURTT JR, E.H. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. **Journal of Microbiological Methods**, v.47, n.2, p.199-208, 2001.

JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**, v.250, n.1-3, p.87-93, 2009.

JOHANSSON, G. Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric biphasic systems. **Acta Chemica Scandinavica B**, v.28, n.8, p.873-882, 1974.

JONES, L.N.; SIMON M.; WATTS, N.R.; BOOY, F.P.; STEVEN, A.C.; PARRY, D.A. Intermediate filament structure: hard  $\alpha$ -keratin. **Biophysical Chemistry**, v.68, n.1-3, p.83-93, 1997.

KALISZ, M.H. Microbial proteinases. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v.36, p.1-65, 1988.

KHARDENAVIS, A.A.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. Processing of poultry feathers by alkaline keratin hydrolyzing enzyme from *Serratia* sp. HPC 1383. **Waste Management**, v.29, n.4, p 1409-1415, 2009.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; SIMPSON, B.K. KISHIMURA, H. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, p.3061-3067, 2005.

KOJIMA, M.; KANAI, M.; TOMINAGA, M.; KITAZUME, S.; INOUE, A.; HORIKOSHI, K. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. **Extremophiles**, v.10, n.3, p.229-235, 2006.

KONWARH, R.; KARAK, N.; RAI, S.K.; MUKHERJEE, A.K. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. **Nanotechnology**, v.20, n.22, p.1-10, 2009.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste management**, v.31, n.8, p.1689-1701, 2011.

KRONER, K.H.; HUSTEDT, H.; KULA, M.R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. **Process Biochemistry**, v.19, n.5, p.170-179, 1984.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v.17, n.7, p.561-594, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAHORE, H.M.F.; MIRANDA, M.V.; FRAILE, E.R.; BONINO, M.J.B.J.; CASCONI, O. Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.30, n.7, p.615-621, 1995.

LANGEVELD, J.P.; WANG, J.J.; VAN DE WIEL, D.F.; SHIH, G.C.; GARSSSEN, G.J.; BOSSERS, A.; SHIH, J.C. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, n.11, p.1782-1789, 2003.

LENTSCH, S.; AIMAR, P.; OROZCO, J.L. Enhanced separation of albumin-poly (ethylene glycol) by combination of ultrafiltration and electrophoresis. **Journal of Membrane Science**, v.80, n.1, p.221-232, 1993.

LI, Z.; YOURAVONG, W.; H-KITTIKUN, A. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. **Bioresource Technology**, v.97, n.18, p.2364-2370, 2006.

LIN, X.; LEE, C-G.; CASALE, E.S.; SHIH, J.C.H. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.58, n.10, p.3271-3275, 1992.

MARCHISIO, V.F.; FUSCONI, A.; QUERIO, F.L. *Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus? **Mycoses**, v.43, n.7-8, p.281-292, 2000.

MAURER, K. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, n.4, p.330-334, 2004.

MEHRNOUSH, A.; TAN, C.P.; HAMED, M.; AZIZ, N.A.; LING, T.C. Optimisation of freeze drying conditions for purified serine protease from mango (*Mangifera indica* Cv. Chokanan) peel. **Food Chemistry**, v.128, n.1, p.158-164, 2011.

MILLIPORE. Merck Millipore. **Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration**. 2003. Disponível em: <<http://www.millipore.com>>. Acesso em: 7 fev. 2013

MINAMI, N.M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da amiloglicosidase**. 1997. 190 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MINAMI, N.M.; KILIKIAN, B.V. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. **Journal of Chromatography B**, v.711, n.1-2, p.309-312, 1998.

MIRANDA, M.V.; CASCONI, O. Partition behaviour of horseradish peroxidase isoenzymes in aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.4, p.275-280, 1994.

MOHORCIC, M.; TORKAR, A.; FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, n.1-2, p.196-201, 2007.

MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M.H.; MANESH, S.D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, n.2, p.241-247, 2008.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

NAGARAJ, N.; SAMPANGI, C.; KARUMANCHI, S.M.S.R. **Process for separation and recovery of polyethylene glycol (PEG) from spent aqueous two-phase systems**. US Patent 6863828, 2003.

NAJAFI, M.F.; KEMBAVI A. One step purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from marine *Vibrio* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, n.2, p.535-539, 2005.

NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.44, n.4, p.471-476, 2009.

NANDINI, K.E.; RASTOGI N.K. Integrated downstream processing of lactoperoxidase from milk whey involving aqueous two-phase extraction and ultrasound-assisted ultrafiltration. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v.162, n.1, p.173-185, 2011.

NG, P.; LUNDBLAD, J.; GAUTAM, M. Optimization of solute separation by diafiltration. **Separation Science**, v.11, n.5, p.499-502, 1976.

NITSAWANG, S.; HATTI-KAUL, R.; KANASAWUD, P. Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.5, p.1103-1107, 2006.

OELMEIER, S.A.; DISMER, F.; HUBBUCH, J. Application of an aqueous two-phase systems high-throughput screening method to evaluate mAb HCP separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.1, p.69-81, 2011.

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

PÅHLMAN, S.; ROSENGREN, J.; HJERTEN, S. Hydrophobic interaction chromatography on uncharged sepharose derivatives: effect of neutral salts on the adsorption of proteins. **Journal of Chromatography A**, v.131, p.99-108, 1977.

PAPADOPOULOS, M.C.; BOUSHY, A.R.; ROODBEEN, A.E.; KETELAARS, E.H. Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. **Animal Feed Science and Technology**, v.14, n.3, p.279-290, 1986.

PARRY, D.A.D.; NORTH, A.C.T. Hard  $\alpha$ -keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, v.122, n.1-2, p.67-75, 1998.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, n.2, p.156-164, 2007.

PERIĆIN, D.M.; MADAREV-POPOVIĆ, S.Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L.M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.31, n.1, p.43-47, 2009.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, p.440, 2005.

PILLAI, P.; ARCHAN, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, n.4, p.643-650, 2008.

PORTO, T.S.; MONTEIRO, T.I.R.; MOREIRA, K.A.; LIMA-FILHO, J.L.; SILVA, M.P.C.; PORTO A.L.F.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Liquid-liquid extraction of an extracellular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and reversed micelles systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, n.5, p.655-659, 2005.

PORTO, T.S.; SILVA, G.M.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR., A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, n.4, p.716-721, 2008.

PRAKASH, P.; JAYALAKSHMI, S.K.; SREERAMULU, K. Production of keratinase by free and immobilized cells of *Bacillus halodurans* strain PPKS-2: partial characterization and its application in feather degradation and dehairing of the goat skin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, n.7, p.1909-1920, 2010.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RASTOGI, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of enzymes/proteins. **Advances in Applied Microbiology**, v.41, p.97-171, 1995.

RAI, S.K.; KONWARH, R.; MUKHERJEE, A.K. Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline  $\beta$ -keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, n.3, p.218-225, 2009.

RAMNANI, P.; SINGH, R.; GUPTA, R. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.51, n.3, p.191-196, 2005.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.5, p.255-258, 2002.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.3, p.395-399, 2006.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H. EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v.128, n.3, p.693-703, 2007.

ROSA, P.A.; AZEVEDO A.M.; SOMMERFELD S.; MUTTER A.; AIRES-BARROS M.R.; BÄCKER, W. Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach. **Journal of Biotechnology**, v.139, n.4, p.306-313, 2009.

SANTOS, R.M.D.B.; FIRMINO, A.A.; SÁ, C.M.; FELIX, C.R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Current Microbiology**, v.33, n.6, p.364-370, 1996.

SARANGI, B.K.; PATTANAIK, D.P.; RATHINARAJ, K.; SACHINDRA, N.M.; MADHUSUDAN, M.C.; MAHENDRAKAR, N.S. Purification of alkaline protease from chicken intestine by aqueous two phase system of polyethylene glycol and sodium citrate. **Journal of Food Science and Technology**, v.48, n.1, p.36-44, 2011.

SARAVANAN, S.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol)-poly (acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, v.43, n.9, p.905-911, 2008.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.145, n.1, p.1-22, 2009.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.1, p.1-17, 2004.

SCHMIDT, A.S.; VENTOM, A.M.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.2, p.131-142, 1994.

SELBER, K.; TJERNELD, F.; COLLÉN, A.; HYYTIÄ, T.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; BAILEY, M.; FAGERSTRÖM, R.; KAN, J.; LAAN, J.; PENTTILÄ, M.; KULA, M.R. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. **Process Biochemistry**, v.39, n.7, p.889-896, 2004.

SEVERO, E.E.; OLIVEIRA, J.M.G.; MACHADO, J.R. **Separação de uma protease queratinolítica de *Bacillus* sp. P45 utilizando ultrafiltração**. 2011. 46 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SHIAH, C.D. **Topical hair coloring formulation in the form of suspension, lotion and cream**. US Patent 4173453, 1979.

SINGH, A.N.; SHUKLA, A.K.; JAGANNADHAM, M.V.; DUBEY, V.K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. **Process Biochemistry**, v.45, n.3, p.399-406, 2010.

SINHA, J.; DEY, P.K.; PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.54, n.4, p. 476-486, 2000.

SINHA, R.; SINGH, S.P.; AHMED, S.; GARG, S.K. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. **Bioresource Tecnology**, v.55, n.2, p.163-166, 1996.

SIRTORI, L.R.; CLADERA-OLIVERA, F.; LORENZINI, D.M.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by *Bacillus* sp. strain P45, a bacterium from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.52, n.6, p.357-363, 2006.

SRINIVAS, N.D.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. **Journal of Food Engineering**, v.54, n.1, p.1-6, 2002.

SYED, D.G.; LEE, J.C.; LI, W.; KIM, C.; AGASAR, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. **Bioresource Technology**, v.100, n.5, p.1868-1871, 2009.

SYNOWIECKI, J. Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.42, p.7020-7025, 2010.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N.D.; GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.23, n.1, p.63-68, 2000.

THYS, R.C.S.; BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.6, p.1259-68, 2006.

TORRES, M.R.; MARÍN, F.R.; RAMOS, A.J.; SORIANO, E. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration **Journal of Food Engineering**, v.54, n.3, p.215-219, 2002.

TRINDADE, I. P.; DIOGO, M. M.; PRAZERES, D. M.; MARCOS, J. C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1082, n.2, p.176-184, 2005.

VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Membrane separations in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, n.2, p.208-221, 2001.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GOUSTEROVA, A.; NESHEV, G. Ecologically safe method for improved feather wastes biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.63, n.8, p.1008-1012, 2009.

VEIDE, A.; LINDBÄCK, T.; ENFORS, S-O. Recovery of  $\beta$ -galactosidase from a poly (ethylene glycol) solution by diafiltration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, n.11, p.744-751, 1989.

VERMA, J.; MODI, D.R.; SHARMA, R.; SAXENA, S. Vital role of alkaline protease in bio-industries: a review. **Plant Archives**, v.11, n.11, p.1083-1092, 2011.

WANG, J.; BORWORNPINYO, R.; ODETALLAH, N.; SHIH, J.C.H. Enzymatic degradation of a prion-like protein, Sup35NM-His6. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, n.5-6, p.758-765, 2005.

WANG, X.L.; ZHANG, C.; OUYANG P. The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. **Journal of Membrane Science**, v.204, n.1-2, p.271-281, 2002.

WILLIAMS, C.M.; RICHTER, C.S.; MACKENZIE JR., J.M.; SHIH, J.C.H. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p.1509-1515, 1990.

WU, Y.T.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Recovery of endopolygalacturonase using polyethylene glycol-salt aqueous two-phase extraction with polymer recycling. **Bioseparation**, v.9, n.4, p.247-254, 2000.

XIE, F.; CHAO, Y.; YANG, X.; YANG, J.; XUE, Z.; LUO, Y.; QIAN, S., Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.1, p.344-350, 2010.

YAMAMURA, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; YOKOYAMA, K.; TAMIYA, E. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.294, n.5, p.1138-1143, 2002.

YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG1000/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aqueous two-phase system by a two-step extraction. **Process Biochemistry**, v.45, n.10, p.1664-1671, 2010.

YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEENEZHAD, A.R.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A.B. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v.47, n.1-2, p.52-57, 2005.

YOSHIOKA, M.; MIWA, T.; HORII, H.; TAKATA, M.; YOKOYAMA, T.; NISHIZAWA, K.; WATANABE, M.; SHINAGAWA, M.; MURAYAMA, Y. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.509-915, 2007.

ZAGHLOUL, T.I.; AL-BAHRA, M.; AL-AZMEH, H. Isolation, identification and keratinolytic activity of a several feather-degrading bacterial isolates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, n.1, p.207-213, 1998.

ZAGHLOUL, T.I.; EMBABY, A.M.; ELMAHDY, A.R. Key determinants affecting sheep wool biodegradation directed by a keratinase-producing *Bacillus subtilis* recombinant strain. **Biodegradation**, v.22, n.1, p.111-128, 2011.

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

ZHANG, M.; HUB, P.; LIANG, Q.; YANG, H.; LIU, Y.; WANG, G.L. Direct process integration of extraction and expanded bed adsorption in the recovery of crocetin derivatives from *Fructus gardenia*. **Journal of Chromatography B**, v.858, n.1-2, p.220-226, 2007.