
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS INTEGRAL

CAROLINA FERRAREZI DA FONSECA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
QUERATINASE POR *Bacillus amyloliquefaciens***

CAROLINA FERRAREZI DA FONSECA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUERATINASE POR *Bacillus
amyloliquefaciens*

Orientador: Jonas Contiero

Co-orientador: Mariana Cortezi

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2010

547.75 Fonseca, Carolina Ferrarezi
F676o Otimização da produção de queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens* / Carolina Ferrarezi Fonseca. - Rio Claro : [s.n.], 2010
69 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero

Co-Orientador: Mariana Cortezi

1. Proteínas. 2. Fermentações Industriais. 3. Enzimas. 4. Penas de frango. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu tudo o que eu preciso para seguir uma linda vida com muita determinação, vontade e felicidade.

Aos meus pais, Elaine e Pedro, que sentiram muito minha falta durante esses quatro anos de graduação. Só eu sei o quanto foi difícil ficar longe de vocês, os melhores pais do mundo. Agradeço todos os dias por tê-los em minha vida. Não há nada de mais especial na vida de uma pessoa do que ter uma família como a minha. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, acreditando em mim e me ajudando a seguir em frente! Sou tudo o que sou e amo tanto minha vida graças à educação que vocês me deram e ao amor que vocês tem por mim e que tenho por vocês! Sem meus pais tão amados a vida não teria sentido! Tenho muito orgulho de ser filha de vocês! Chega de saudades papai e mamãe! Amo muito vocês.

Ao meu irmão, Pedrinho. Sei o quanto você sentiu minha falta durante esse tempo, e o quanto eu também senti por não poder estar ao seu lado todos os dias nos momentos em que você muito precisou. Mas ainda teremos muitos dias juntos para podermos conversar até altas horas da madrugada e darmos muitas risadas! Você será sempre meu companheiro e o irmão que eu muito desejei ter em minha vida, para compartilhar cada alegria e acabar com cada momento triste. Não poderia ter irmão melhor! Valeu a pena cada segundo que desejei que você chegasse em minha vida! Te amo muito meu eterno Baby.

Ao meu namorado, Guilherme. Você sempre esteve ao meu lado para me ajudar, animar e dar um sentido e uma felicidade especial na minha vida. A sua companhia me ajudou e me ajuda muito a seguir em frente com todos meus sonhos. Ter você me faz entender que esses quatro anos não aconteceram por mero acaso. A faculdade acabou, mas nossa vida juntos está só começando! Obrigada por ficar ao meu lado sempre! Esse tempo só foi tão feliz graças à você. Amo saber que te terei comigo para sempre e amo ter no meu coração todos os momentos felizes que vivemos juntos na faculdade. Você é muito especial para mim amor! Te amo demais! “Se eu sei que no final fica tudo bem...a gente se ajeita (...)”. Com você, tudo fica bem.

À minha avozinha que eu tanto amo e que infelizmente não posso ter ao meu lado sempre e à toda minha família.

Ao meu orientador, Jonas Contiero, que acreditou em mim em um momento difícil e me apoiou (espero ter agido de acordo com suas expectativas) e à minha co-orientadora Mariana, que me ajudou à passar por tantas mudanças ao longo do ano de 2010.

Aos amigos que passaram pela minha vida esses anos, em especial Vivi e Hanson: a distância e o tempo não são obstáculos para amizades verdadeiras. Ao meu professor Guilherme, que sempre me ajudou e apoiou muito, meu sincero obrigada! E ao Sam, que eu sempre adorei!

Agradeço também à FAPESP, pelo financiamento da minha pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Objetivo	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Queratina	7
2.2 Queratinases	8
2.3 Penas de frangos	11
2.4 Micro-organismos queratinolíticos e produção de queratinase ...	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Reativação das cepas	18
3.2 Obtenção do inóculo	18
3.3 Determinação do crescimento celular	19
3.4 Planejamento Experimental	19
3.5 Estudo da otimização das condições de cultivo para a produção de queratinase	23
3.6 Determinações analíticas	
3.6.1 Avaliação da porcentagem da degradação das penas	24
3.6.2 Determinação da atividade queratinolítica	24
3.6.3 Determinação da atividade proteolítica	25
3.6.4 Determinação da concentração de proteínas	25
3.6.5 Determinação de aminoácidos do caldo fermentado	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

A carne de frango é um dos principais produtos de exportação brasileira. De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de carne de Frango (Abef), no último relatório disponibilizado, em 2008, o Brasil foi o terceiro maior produtor de carne de frango, com 10,9 milhões de toneladas, apresentando um crescimento de 6,2% no período, sendo precedido apenas pela China, com 11,9 milhões de toneladas e Estados Unidos, em primeiro lugar com 16,6 milhões de toneladas, estes com crescimentos de 5,4 e 2,1%, respectivamente. Também no ano de 2008, o Brasil totalizou embarques de 3,6 milhões de toneladas de carne de frango, registrando um crescimento de 10,9% em relação a 2007, superando os 8,6% inicialmente projetados para o período. A América do Sul, no geral, obteve os maiores aumentos percentuais registrados no mesmo ano, somando embarques de 329 mil toneladas, um crescimento de 90% em comparação a 2007 e receita cambial de US\$ 557 milhões, representando aumento de 157%.

Já os valores de exportação mundial para o período de 2008 apresentou um crescimento de 13,7%, sendo que, em relação ao volume individual, o Brasil lidera o ranking com 3,6 milhões de toneladas exportadas, totalizando um crescimento de 10,9%, enquanto os Estados Unidos e a União Européia ficaram em segundo e terceiro lugares, respectivamente, com volumes de 3,2 e 0,7 milhões de toneladas e crescimento significativo de 17,5% e 16,5%.

Ademais, de acordo com o estudo intitulado “Projeções do Agronegócio Brasil - 2008/2009 a 2018/2019”, divulgado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2018/2019 a exportação de carne de frango brasileira deverá representar 89,7% do comércio mundial. Apesar de o Brasil apresentar nos próximos anos forte aumento das exportações, o mercado interno será um forte fator de crescimento, sendo que, do aumento previsto na produção de carnes, de 12,6 milhões de toneladas para o período entre 2007/2008 a 2018/2019, 50% deverão ser destinados ao mercado interno e o restante dirigido às exportações. Também de acordo com o estudo, o consumo de carne de frango para o mesmo período terá um aumento de 2,57% ao ano, aumento de produção de 4,22% ao ano e aumento de exportação de 5,62% ao ano. Estes resultados indicam que o Brasil continuará a manter sua posição de maior exportador mundial de carne de frango (Projeções do

Agronegócio Brasil 2008/2009 a 2018/2019 - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Assessoria de Gestão Estratégica, 2009).

No entanto, a grande demanda do consumo de carne de frango gera resíduos que acarretam em grande impacto ambiental. Uma vez que em frangos maduros, as penas constituem cerca de 5% a 7% do seu peso vivo, em todo o mundo, milhões de toneladas de penas são geradas anualmente como resíduos de indústrias de processamento de frango (NAGAL e JAIN, 2010).

As penas são constituídas por aproximadamente 90% de proteína, sendo que seu principal componente é a queratina, uma proteína fibrosa e insolúvel com cadeias fortemente ligadas por pontes dissulfeto (NAGAL e JAIN, 2010). Essas pontes que ligam suas cadeias adjacentes são responsáveis pela estabilidade e resistência à degradação da queratina (SAFRANECK e GOOS, 1982). Considerando seu grande conteúdo protéico, esses resíduos possuem um grande potencial como fonte de proteínas e aminoácidos para enriquecimento de rações animais, além de possibilitarem muitas outras aplicações (NAGAL e JAIN, 2010).

Apesar de a queratina ser uma molécula resistente e de difícil degradação, esta proteína pode ser eficientemente degradada por proteases específicas denominadas queratinases (ONIFADE et al., 1998). A hidrólise de penas por micro-organismos que possuem atividade queratinolítica representam um método alternativo e eficiente no melhoramento do valor nutricional da farinha de penas, comparado aos métodos tradicionais de produção (NAGAL e JAIN, 2010). O método tradicional de produção de farinha de penas é um processo caro que requer um grande gasto energético uma vez que as penas são cozidas sob alta pressão no vapor e tratadas quimicamente antes do uso (EI-REFAI et al., 2005).

As queratinases também possuem outras aplicações biotecnológicas importantes, como digestão aeróbica de resíduos de frango para geração de gás natural, em indústrias têxteis na degradação de lã, na limpeza de obstruções durante o tratamento de águas residuais (NAGAL e JAIN, 2010), também como fertilizantes e como detergentes na hidrólise de substratos sólidos, entre outras (SARAVANAVHAVAN et al., 2004; THANIKAIVELAN et al., 2004; THYS et al., 2004).

Devido a essa ampla possibilidade de aplicação das queratinases, um grande número de micro-organismos queratinolíticos tem sido estudados, dentre estes algumas espécies de *Bacillus* (WILLIAMS et al., 1991; ATALO e GASHE 1993; CORTEZI et al. 2008), actinomicetos (YOUNG e SMITH, 1975; BOCKLE et al., 1995) e fungos (KUSHWAHA, 1983; SANTOS, et al., 1996).

Muitos autores reportaram em seus artigos as condições ótimas de cultivo para a produção da enzima queratinase e, uma vez que todo processo fermentativo é significativamente influenciado por vários parâmetros físicos e químicos, torna-se importante determinar as condições ótimas de cultivo para cada micro-organismo. A pesquisa convencional consiste em investigar um parâmetro do processo separadamente, enquanto os outros são mantidos constantes, o que torna a pesquisa demorada, consumindo tempo e não levando em consideração as interações entre os diferentes fatores.

Assim, o estudo estatístico fornece uma alternativa eficiente e econômica, permitindo o estudo das interações entre as variáveis do processo e ao mesmo tempo permite prever os valores ótimos destas variáveis. Diversos pesquisadores da área de fermentação têm aplicado estas técnicas para otimização das condições de cultivo, determinação de valores ótimos dos parâmetros do processo e taxas de alimentação.

Neste projeto o estudo estatístico foi realizado para definir os melhores valores de temperatura, concentração de substrato e agitação para a produção máxima de queratinase e conseqüente degradação das penas.

1.1 Objetivo

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo definir os melhores valores de temperatura, concentração de substrato e agitação para a produção máxima de queratinase e conseqüente degradação de penas de frango por *Bacillus amyloliquefaciens*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queratina

A queratina é uma proteína de estrutura secundária, fibrosa, insolúvel, composta por uma longa cadeia de polipeptídios (NAGAL e JAIN 2010). A composição e configuração molecular de seus aminoácidos garantem sua estabilidade estrutural e rigidez. As cadeias moleculares da queratina podem se apresentar nas formas de α -hélice (α -queratina) ou folha- β (β -queratina), superenoveladas em uma cadeia polipeptídica (PARRY e NORTH 1998). Esta característica resulta em estabilidade mecânica e resistência às enzimas proteolíticas comuns, tais como pepsina, tripsina e papaína (ONIFADE et al., 1998). As ligações cruzadas das cadeias protéicas de cisteína (dissulfeto), além das pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, conferem uma maior estabilidade e resistência à degradação proteolítica (LIN et al., 1992; ANBU et al., 2005).

Devido à sua rigidez e resistência mecânica, as principais funções da queratina são estruturais e protetoras, sendo a principal constituinte de unhas, chifres, cascos, cabelo, lã e pele de mamíferos, bico e penas de aves, além de outras estruturas epidérmicas. Estas estruturas foram essenciais nos processos adaptativos aos ambientes naturais, atuando como barreira mecânica, estrutural e térmica (BUSSON et al., 1999).

A cadeia da queratina de cabelos e da epiderme estão fortemente empacotadas em estruturas α -hélice. No entanto, a queratina de cabelos é diferente daquela da epiderme, uma vez que esta possui na cadeia polipeptídica grande quantidade de cisteína, conferindo-lhe maior resistência e estabilidade. Em penas, as cadeias polipeptídicas possuem conformação β , que é mais facilmente hidrolisada (RAMNANI e GUPTA 2004).

A estrutura primária da molécula da β queratina consiste em uma longa seqüência de polipeptídios que alternam resíduos de glicina, alanina e serina, sempre apresentando uma glicina entre um resíduo e outro. Como resultado, as glicinas situam-se na porção superior do plano da folha pregueada enquanto outros resíduos ficam abaixo do plano. Pares de folhas β pregueadas então se empacotam perfeitamente, não havendo formação de pontes dissulfeto neste estágio, sendo a

estabilização permitida por pontes de hidrogênio. A associação linear de monômeros forma então os microfilamentos e a associação destes, estabilizada por pontes dissulfeto, formará as fibras de β -queratina (GARRET e GRISHAM, 1995).

As α -queratinas são resistentes e fazem parte de uma família de proteínas denominadas proteínas de filamento intermediário, caracterizadas por apresentarem funções estruturais (NELSON e COX, 2002). Estão presentes em células epiteliais, cabelos, unhas e lã de mamíferos (SAID e PIETRO, 2004). Já as β -queratinas são ricas em aminoácidos como glicina, alanina, serina e lisina (CHITTE et al., 1999), estão presentes em aves, principalmente em suas penas e répteis, e são mais facilmente hidrolisadas do que as α -queratinas (RAMNANI e GUPTA, 2004).

2.2 Queratinases

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como proteases, promovem clivagens das ligações peptídicas de proteínas e peptídeos, sendo, portanto, pertencentes à classe das hidrolases (NEURATH, 1989). Dessa forma, elas realizam uma modificação irreversível ou a destruição de seus substratos, o que pode ter uma importância biológica, tanto em patologia e fisiologia humana como em processos biotecnológicos (BARRET et al., 2001).

As queratinases constituem um grupo de proteínas cujo mecanismo de ação catalítica não é completamente compreendido, porém são importantes na hidrólise de penas, cabelos, pêlos, colágeno, no tratamento de águas residuárias, desobstrução de sistemas de esgoto durante o tratamento de águas residuárias (CHITTE et al., 1999), além de poderem ser aplicadas em indústrias de nutrição animal, têxteis, de couro, na medicina e em cosmético (FARAG e HASSAN, 2004).

Como mencionado, uma vez que degradam uma série de substratos, as enzimas queratinolíticas podem ser utilizadas em uma grande quantidade de processos biotecnológicos, a fim de desenvolver processos menos poluentes ao meio ambiente, envolvendo a degradação da queratina proveniente de resíduos das indústrias de processamento de frango e de couro (SHIH, 1993; ONIFADE et al., 1998). Assim, após a hidrólise, as penas podem ser convertidas em fertilizantes, filmes e rações animais, além de poderem ser utilizadas na produção de

aminoácidos raros, como serina, cisteína e prolina (PAPADOPOLOUS et al., 1986; YAMAUCHI et al., 1996).

As propriedades das queratinases dependem do micro-organismo produtor, sendo em sua maioria descritas na literatura como serina-proteases (BOCKLE et al., 1995; BRESSOLIER et al., 1999; GRADISAR et al., 2000; RIESSEN e ANTRANIKIAN, 2001), e ocasionalmente descritas como serina-protease com cisteína-protease (SANGALI e BRANDELLI, 2000b) e metalo-protease (LEE et al., 2002; CORTEZI et al. 2008). As temperaturas ótimas e valores de pH são descritos entre 40°C-80°C e 6-10, respectivamente (LIN et al., 1992; BOCKLE et al., 1995; CHENG et al., 1995; FRIEDRICH e ANTRANIKIAN, 1996; BRESSOLIER et al., 1999).

Muitas queratinases são ativas extracelularmente, sendo exportadas do local de síntese dentro da célula para agirem no meio externo. Entretanto, há relatos na literatura de atividade associada à célula, como no caso das proteases de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (ONIFADE et al., 1998).

Apesar da falta de um completo conhecimento do mecanismo de ação das queratinases, evidências apontam para a provável existência de queratinólise mecânica, sulfitólise e proteólise em fungos e actinomicetos. Nesses micro-organismos, a queratinólise se inicia com o crescimento do micélio, gerando pressão e penetração, o que expõe outros locais à ação das enzimas. Em seguida, ocorre liberação de sulfito devido à quebra das pontes dissulfeto e finalmente proteólise (ONIFADE et al., 1998). Já o mecanismo de ação das proteases queratinolíticas bacterianas permanece desconhecido ou pouco compreendido (KIM et al., 2001; NAM et al., 2002).

Essas enzimas produzidas por bactérias despertam um interesse particular devido à sua ação em substratos insolúveis que contém queratina e por geralmente atuarem sobre uma grande variedade de substratos protéicos (BRANDELLI e RIFFEL, 2005).

A produção de queratinase por micro-organismos é influenciada por uma série de fatores, como temperatura, pH e a natureza da fonte de carbono e nitrogênio presente no meio. Esses fatores são variáveis de acordo com as espécies de micro-organismos utilizadas (SINGH et al., 1975). A síntese das proteases

extracelulares é conduzida em parte pela concentração de nutrientes individuais (NORTH, 1982). A indução pelo substrato é o maior mecanismo regulatório, e a biossíntese da queratinase não é completamente reprimida se houver adição de outra fonte de carbono e nitrogênio (IGNATOVA et al., 1999). A repressão catabólica e o fim da inibição pelo produto aparentemente são os dois maiores mecanismos regulatórios que atuam sobre a síntese da queratinase extracelular (ANBU et al., 2006).

A maioria das queratinases requer a presença de queratina como indutor, porém, existem queratinases que atuam sobre vários substratos, como a sintetizada por *Bacillus licheniformis*, agindo sobre soroalbumina bovina, colágeno, elastina e queratina de penas, até as que hidrolisam apenas queratina (LIN et al., 1992; CHITTE et al., 1999).

Williams et al., (1990) constataram um aumento de compostos solúveis de sulfidril durante a degradação das penas por *Bacillus licheniformis* PWD-1 e verificaram que a bactéria possuía uma protease capaz de reduzir as ligações dissulfeto da queratina. A mesma observação foi feita em *Streptomyces pactum* cultivado em penas e em *Streptomyces fradiae* cultivado em lã (YAMURA et al., 2002).

Bockle e Muller (1995) fizeram uma distinção entre a desintegração inicial do complexo queratinoso dos órgãos, tais como penas de galinhas, até pequenas subestruturas e a dissolução completa da queratina. Segundo o autor, a desintegração inicial pode ser causada por proteases agindo na matriz da queratina, ao passo que o ataque à estrutura quase cristalina dessa proteína necessita de um mecanismo degradativo adicional. Em seus estudos, os autores verificaram que a redução das ligações dissulfeto é dependente da presença de células metabolicamente ativas. Células com baixo potencial de membrana podem exercer um papel importante na degradação da queratina pela redução nas ligações dissulfeto na queratina ou pela produção de agentes redutores solúveis que reagem na superfície da mesma, tornando a cadeia protéica disponível para a clivagem por proteases. Apesar de não terem observado nenhum contato permanente entre o micélio e as partículas de queratina, o que tornaria a redução direta na superfície do

substrato improvável, os autores não excluem a possibilidade de a redução ocorrer por um contato ligeiro entre o micélio e o substrato.

A clivagem enzimática das ligações peptídicas da queratina torna-se difícil devido a interação restrita entre a enzima e o substrato na superfície das partículas da queratina. A habilidade particular das proteases queratinolíticas pode ser devido a uma especificidade por substratos compactos e um sítio ativo mais exposto. Estudos moleculares com quitinases, celulases e xilanases, os quais também agem em substratos compactos, têm mostrado a existência de domínios hidrofóbicos que podem facilitar a interação com diferentes substratos de alta massa molar (BOCKLE et al. 1995). Bockle et. al., (1995) concluíram que as pontes de cisteína, presentes na estrutura da queratina, previnem a degradação proteolítica da maioria das áreas compactas dos tecidos queratinosos, assim, uma clivagem adicional dessas ligações dissulfeto parece ser indispensável para tornar essas proteínas disponíveis para as enzimas hidrolíticas.

2.3 Penas de frangos

As penas são compostas por mais de 90% de proteína e são produzidas em grande quantidade em todo mundo como resíduos da indústria de processamento de frangos. O acúmulo destas resulta em poluição ambiental além de desperdício de proteínas (ONIFADE et al., 1998; GOUSTEROVA et al., 2005).

Conforme mencionado, as penas são constituídas por 90% de queratina, grande parte β -queratina dura (SUH e LEE 2001; ZERDANI et al., 2004; THYS et al., 2004; LIN et al., 1999; RAMNANI e GUPTA 2004; ICHIDA et. al., 2001), 1,2% por gordura e 1,3% por cinzas, o que serviria como fonte rica de nutrientes para micro-organismos decompositores (ZERDANI et al., 2004).

Sabe-se que na produção de enzimas industriais, 30 a 40% do custo de produção são devido ao substrato de crescimento do micro-organismo produtor. Dessa forma, o uso de penas, substrato facilmente disponível e de baixo custo, poderia resultar em uma redução substancial no custo da produção enzimática (GESSESSE et al., 2003), logo, a utilização das penas de aves domésticas como substrato para a fermentação por micro-organismos que degradam queratina

oferece uma possível tecnologia microbiana para a obtenção de enzimas proteolíticas (BERNAL et al., 2003).

Nos meios de cultura, as penas funcionam como fonte de carbono, enxofre e energia para o crescimento do micro-organismo. As penas, se adicionadas ao meio de cultivo podem ser tanto inteiras (RIFFEL et al., 2003; SANGALI e BRANDELLI, 2000; RIFFEL e BRANDELLI, 2002; THYS et al., 2004; BOCKLE et al., 1995; RAMNANI e GUPTA, 2004) como moídas até um pó fino (WILLIAMS et al., 1990; KIM et al., 2001; LIN et al., 1992; CHENG et al., 1995; SUH e LEE 2001; SZABO et al., 2000; NITISINPRASERT et al., 1999) sendo que, neste caso, o ato de moê-las resulta na clivagem das ligações dissulfeto, o que torna a proteína mais susceptível à digestão proteolítica por proteases tais como tripsina e proteinase K (LONGSHAW et al., 2002).

Szabo et al., (2000), entretanto, comparando a cepa de *Streptomyces graminofaciens* a outras utilizadas anteriormente observaram que a queratinase dessa bactéria parece ser mais eficiente na digestão de penas não-moídas.

Como mencionado anteriormente, as penas apresentam um grande valor nutricional, e considerando o alto custo termoenergético do processo convencional para produção de farinha de penas, aliado a baixa digestibilidade desse produto e conseqüente valor nutricional, ocasionados pelo processo de cocção sob pressão, tem-se buscado alternativas para utilização desse subproduto. Uma destas alternativas é a degradação de penas por micro-organismos queratinolíticos, visando aumentar o valor nutricional das farinhas devido maior disponibilidade de aminoácidos.

Em seus estudos, Nam et al., (2002) verificaram após a degradação de penas por bactérias anaeróbias termofílicas *Fervidobacterium islandicum* AW-1 a presença de aminoácidos livres tais como histidina, cisteína e lisina, bem como outros nutricionalmente essenciais como triptofano e metionina, estes considerados raros na queratina de penas. Assim, os autores deduziram que estes aminoácidos tenham sido provavelmente produzidos como metabólitos pela bactéria.

Szabo et al., (2000) pesquisando a cepa termotolerante de *Streptomyces graminofaciens* constataram uma porcentagem maior de aminoácidos como arginina e treonina.

Dessa forma, a proteólise da queratina por micro-organismos com atividade queratinolítica representa um método alternativo para melhorar o valor nutricional deste subproduto, pelo enriquecimento protéico das penas pela própria biomassa microbiana, além de evitar a destruição de certos aminoácidos essenciais (MANCZINGER et al., 2003; SAID e PIETRO, 2004; WILLIAMS et al., 1991).

No artigo publicado por Farag e Hassan, (2004), os autores sugeriram a utilização de um biorreator com queratinase imobilizada capaz de converter penas moídas em peptídeos e aminoácidos, os quais poderiam ser separados por cromatografia de troca iônica ou filtração em gel. Na literatura há relatos de trabalhos realizados com queratinases imobilizadas (LIN et al., 1996; WANG et al., 2003), em que, geralmente a imobilização provoca uma estabilidade da queratinase ao calor, aumenta sua estabilidade a variações de pH. No entanto, Wang et al., (2003) constataram taxas de reação mais baixas do que a obtida a enzima livre.

2.4 Micro-organismos queratinolíticos e produção de queratinase

O processo tradicional para produção de farinha de penas resulta em um produto de baixo valor nutricional devido à destruição de aminoácidos (SANGALI e BRANDELLI, 2000). A proteólise da queratina por micro-organismos com atividade queratinolítica representa um método alternativo para aproveitamento deste subproduto produzido pelas indústrias de processamento de frango, resultando em um produto com maior valor nutricional devido ao seu processo ser menos agressivo (MANCZINGER et al., 2003).

Diversos micro-organismos podem sintetizar a enzima queratinase, portanto, o isolamento de micro-organismos que produzam enzimas queratinolíticas mais resistentes, específicas e termoestáveis a fim de serem aplicadas na indústria tem sido realizado com o interesse de diminuir possíveis impactos ambientais (RIESSEN e ANTRANIKIAN, 2001).

Embora essa proteína possa ser produzida a partir de fungos e bactérias, o interesse por queratinases bacterianas tem sido intensa, como serina proteases produzidas por *Bacillus licheniformes* PWD-1 (LIN et al., 1997), *Streptomyces fraidaae* (ELMAYERGI e SMITH, 1971), e recentemente uma espécie de Flavobactérias (RIFFEL e BRANDELLI, 2002).

Riessen e Antranikian (2001) e Nam et al., (2002) estudaram bactérias anaeróbicas termofílicas que apresentaram atividade queratinolítica. Ambos os trabalhos utilizaram bactérias isoladas de fontes de água geotermiais, sendo que a apresentada no artigo de RIESSSEN e ANTRANIKIAN (2001) foi à primeira do gênero *Thermoanaerobacter* a ser descrita com potencialidade queratinolítica.

Em experimentos com placas de Agar contendo queratina insolúvel, Friedrich et al., (1999) estudaram várias espécies de fungos produtores de queratinases. Nesses experimentos foi observado que os produtores mais ativos foram fungos dos gêneros *Fusários*, *Acremonium* e *Geotrichum*. Quando em cultura submersa, *Aspergillus flavus* foi o melhor produtor de queratinase extracelular, seguido por *Alternaria radicina*, *Trichurus spiralis* e *Stachybotus atra*.

Kim et al., (2001) isolaram bactérias a partir de resíduos de processamento de aves domésticas, sendo que *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis* e *Bacillus cereus* foram os micro-organismos que degradaram penas de forma mais eficaz.

Riffel e Brandelli (2002) isolaram e caracterizaram a partir de resíduos de um abatedouro de frango uma *Flavobacteria* sp., sendo que a mesma apresentou alta atividade queratinolítica após cultivo em meio seletivo de farinha de penas. Segundo os autores a atividade proteolítica foi máxima na faixa de temperatura de 30°C a 37°C, sendo que, o aumento do pH durante o cultivo foi indicativo do potencial enzimático do micro-organismo.

Lucas et al., (2003) observaram a diversidade de bactérias queratinolíticas ativas encontradas em solos de regiões temperadas. Os autores isolaram 33 micro-organismos capazes de crescer em penas como única fonte de nutriente, estes foram agrupados filogeneticamente em 13 grupos, sendo quatro gram positivos, dois pertencentes ao grupo *Cytophaga flavobacterium* e o restante ao grupo Proteobactérias. Com isso, demonstrou-se que a diversidade de micro-organismos queratinolíticos é grande, já que nenhum dos isolados ativos havia sido associados à queratinólise.

Letourneau et al., (1998) isolaram a partir de penas degradadas naturalmente, um *Streptomyces* sp. produtor de uma elevada atividade queratinolítica quando cultivado em meio de farinha de penas. A máxima

degradação da queratina utilizando o sobrenadante obtido a partir de culturas em bateladas do micro-organismo foi observada a 70°C e pH 10.

Bactérias dos gêneros *Lysobacter* e *Kocuria* também foram estudadas (ALLPRESS et al., 2002, BERNAL et al., 2003), além destas Sangalli e Brandelli (2000) isolaram bactérias dos gêneros *Vibrio* e *Chryseobacterium* a partir de resíduos do processamento de aves.

A cepa de *Microbacterium* foi isolada de uma indústria de processamento de frangos nos estudos realizados por Thys et al., (2004), esta apresentou alta atividade queratinolítica quando cultivada em meio de cultura contendo penas inteiras como substrato. A bactéria apresentou crescimento ótimo e produção da enzima em pH 7.0 e 30°C. Os autores observaram que a atividade da enzima aumentou com o tempo de fermentação, sendo que com 36 horas ocorreu maior atividade (40 U/mL), quando glicose ou lactose foram adicionadas ao meio de cultura, não foi constatado atividade enzimática.

Anbu et al., (2006) estudando a cepa de *Scopulariopsis brevicaulis* observaram que a maior atividade queratinolítica foi obtida quando cultivaram o micro-organismo em pH 7.5 e 30°C, sendo que houve um aumento da produção da enzima quando o meio de cultura foi suplementado com glicose (1%), nitrato de sódio (2%), penas (1,5%) e CaCl₂ (1mM), obtendo assim, uma atividade de 6,2 U/mL.

Cortezi et al., (2008) isolaram e estudaram uma bactéria com grande capacidade em degradar penas de frango inteiras, a mesma foi identificada como sendo *Bacillus amyloliquefaciens*. Fermentações realizadas em shaker mostraram que maior atividade da enzima e conseqüente degradação das penas foi obtida quando a cepa foi cultivada sob as condições de 40°C, 150 rpm, 1% de penas, 2% de inóculo em meio de cultura descrito por Willians et al., (1990). Análises do hidrolisado de penas revelou a presença dos aminoácidos cistéina, prolina, serina, metionina, sugerindo desta forma sua utilização em rações animais.

Casarin et al., (2008) pesquisaram a produção da enzima queratinase por *Chryseobacterium* sp. em diferentes substratos (caseína, peptona, extrato de levedura, gelatina, soja, peixe, penas e queijo). Uma vez que ocorreu maior produção de queratinase nos meios de cultura contendo penas como substrato, os

autores avaliaram a influência da temperatura, pH inicial e concentração de penas na produção da enzima. Os autores relataram que a temperatura apresentou um forte efeito na produção da queratinase, além da interação entre temperatura e concentração de penas e temperatura e pH inicial. Após um planejamento fatorial com superfície de resposta, os mesmos verificaram que a maior produção de queratinase ocorreu nas condições de 23°C, pH inicial 9.0 e 30g/L de penas.

Cheng-gang et al., (2008) isolaram uma bactéria a partir de resíduos de penas de frango identificada como *Bacillus subtilis*. Posteriormente identificaram mutantes denominados KD-N2 que produziam 2,5 vezes mais atividade queratinolítica que a cepa não mutante. A cepa mutante foi estudada em diferentes fontes de carbono: cabelo, seda e penas de frango, verificando que as penas constituíam o melhor substrato para produção de queratinase e por isso as utilizaram em seus estudos. As condições ideais encontradas para produção de queratinase foram pH inicial 7,5, inóculo de 2% (v/v), tempo do inóculo de 16 horas e temperatura de cultivo 23°C.

Zhang-Jun Cao et al., (2008), utilizando uma cepa de *Stenotrophomonas maltophilia*, determinaram que a temperatura em que ocorreu o máximo de crescimento microbiano e atividade de degradação de penas foi à 40°C e pH inicial entre 7.5-8.0. A melhor temperatura e pH para produção da enzima queratinase foi respectivamente 40°C e 7,8.

A Tabela abaixo (Tabela 1) apresenta alguns dos micro-organismos produtores de queratinases e suas condições de cultivo.

TABELA 1 - Micro-organismos produtores de queratinases e condições de cultivo

Micro-organismo	pH de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Fonte de C, N e S	Tempo de produção da enzima	Referência
<i>Streptomyces fradiae</i>	-	26°C	Penas moídas	6 dias	Young e Smith, 1975
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> SD8	8,0	55°C	Glicose/pena	24h	Chitte et al., 1999
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	7,5	30°C	Penas	30h	Bressolier et al., 1999
<i>Streptomyces pactum</i> DSM 40530	7,5	28°C	Penas	4 dias	Bockle et al., 1995

TABELA 1 (Continuação) - Micro-organismos produtores de queratinases e condições de cultivo

Micro-organismo	pH de cultivo	Temperatura de cultivo (°C)	Fonte de C, N e S	Tempo de produção da enzima	Referência
<i>Microbacterium</i> sp.	5,0 a 9,0	25-45°C	Penas	72h	Thys et al., 2004
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,5 a 7,5	42°C	Penas moídas	48h	Santos et al., 2004
<i>Streptomyces</i> sp.	7,5 a 8,5	35°C	Penas inteiras e farinha de penas	5 dias	Oliveira et al., 2006
<i>Microsporium gypseum</i>	6,5	28°C	Pêlos de porcos	15 dias	Kunert, 1992
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	7,8	30°C	Penas	5 semanas	Anbu et al., 2005
<i>Bacillus subtilis</i> KD-N2	7,5	23°C	Penas	72h	Cheng-gang et al., 2008
<i>Chryseobacterium</i> sp.	9,0	23°C	Penas	60h	Casarin et al., 2008
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	7,6	40°C	Glicose/pena	48h	Szabo et al., 2000
<i>Chryseobacterium</i> sp KR6	6,0-8,0	30°C	Farinha de penas	24h	Brandelli e Riffel, 2005
<i>Bacillus</i> sp. FK46	7,5	37°C	Penas	5 dias	Suntornsk e Suntornsk, 2003
<i>Bacillus pumillus</i>	7,5	37°C	Penas	24h	El-Refai et al., 2005
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	7,5	40°C	Penas	24 h	Cortezi et al., 2008
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,5	50°C	Penas	4 dias	Lin et al., 1992
<i>Bacillus pseudofirmus</i> e <i>Nesterenkonia halobia</i>	-	37°C	Penas/caseína	48-60h	Gessesse et al., 2003
<i>Bacillus subtilis</i> S14	7,5	24°C	Pêlos bovinos	9h	Macedo et al., 1990
<i>Aspergillus oryzae</i>	6,0	30°C	Penas	5 dias	Farag e Hassan, 2003
<i>Flavobacterium</i> sp.	-	30°C	Penas	8 dias	Riffel e Brandelli, 2002

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reativação das cepas

A cepa *Bacillus amyloliquefaciens*, foi cultivada em meio de cultura proposto por Willians et al., (1990) contendo 1% de farinha de penas comercial. O cultivo foi realizado sob as condições de 30°C, 150 rpm, pH inicial 7,5 durante 24 horas, realizando-se repiques sucessivos durante 72 horas.

Posteriormente as cepas foram cultivadas sob as mesmas condições, porém com a substituição da farinha de penas por penas inteiras, realizando-se repiques sucessivos durante 72 horas. Ao final deste período foi realizado um plaqueamento com a finalidade de verificar a pureza da cultura, além de teste de Gram. A cultura foi estocada em glicerol (20%)1:1 a -10°C.

Na Tabela 2 está representada a composição do meio descrito por Willians et al., (1990).

TABELA 2 - Meio de cultura proposto por Willians et al.,(1990).

Composição	g/L
NH ₂ Cl	0,50
NaCl	0,50
MgCl ₂	0,10
K ₂ HP0 ₄	0,30
KH ₂ PO ₄	0,40
Extrato de levedura	0,01
Agar	15,0

3.2 Obtenção do inóculo

Para a obtenção do inóculo, utilizou-se 50 mL de caldo nutriente no qual foram adicionadas duas alçadas de uma cultura pura (24 horas) presente em placa de petri contendo meio descrito por Willians et. al., (1999) e acrescida de farinha de penas. O caldo nutriente foi incubado a 35°C, 150 rpm por 17 horas. Nessas condições, o caldo apresentou uma turbidez adequada para comparação com a escala de McFarland (entre 12 a 15 x 10⁻⁸). Em seguida, 2% do caldo nutriente foi transferido para um frasco contendo 100 mL do meio proposto por

Willians et al., (1990) contendo penas inteiras e incubado de acordo com as condições estudadas e descritas no item 4.5.

3.3 Determinação do crescimento celular

O crescimento bacteriano foi monitorado pela medida das unidades formadoras de colônias (UFC/mL), como descrito por Silva et al., (2001).

Alíquotas de 1mL do meio foram retiradas para diluição em solução salina 0,85%, onde foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-8} para plaqueamento em ágar nutriente. O plaqueamento foi realizado em triplicata, sendo incubadas por 24 horas a 35°C. A contagem foi realizada entre 25 a 250 colônias. Os valores foram expressos em UFC/mL (unidades formadoras de colônia).

3.4 Planejamento Experimental

O planejamento experimental representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios estatísticos, determinando a influência de duas ou mais variáveis nos resultados do processo. Os objetivos do planejamento experimental são determinar as variáveis mais influentes nos resultados, atribuir valores às variáveis influentes otimizando os resultados e minimizar a influência de variáveis incontroláveis. Dessa forma, pode-se reduzir o número de ensaios, estudar simultaneamente diversas variáveis, determinar a confiabilidade dos resultados, realizar a pesquisa em etapas e representar o processo por meio de expressões matemáticas.

Um experimento fatorial com k variáveis, cada um deles com 2 níveis, é denominado de experimento fatorial 2k. O processo experimental dessa técnica consiste em realizar testes com cada uma das combinações da matriz experimental, para em seguida, determinar e interpretar os efeitos principais e de interação dos fatores investigados e assim, poder identificar as melhores condições experimentais do processo de fabricação. Assim, as principais vantagens da técnica fatorial 2k é a possibilidade de indicar as principais tendências e determinar uma direção promissora para as próximas experimentações, além de ser possível quantificar o erro experimental (MONTGOMERY 2001).

No presente trabalho, para otimizar a produção de queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens*, utilizou-se um planejamento composto central rotacional (PCCR). As variáveis independentes testadas foram a temperatura, concentração de substrato e agitação. A produção média da enzima (resposta) foi a variável dependente. A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK), a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das três variáveis estudadas.

Portanto, foi realizado um PCCR composto por um planejamento fatorial a dois níveis, com três variáveis acrescido de três réplicas no ponto central e 6 experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 17 experimentos, conforme apresentado na Figura 1.

-1	-1	-1	}	Planejamento Fatorial 2^k
-1	-1	+1		
-1	+1	-1		
-1	+1	+1		
+1	-1	-1		
+1	-1	+1		
+1	+1	-1		
+1	+1	+1		
$-\alpha$	0	0	}	Pontos Axiais 2.K
$+\alpha$	0	0		
0	$-\alpha$	0		
0	$+\alpha$	0		
0	0	$-\alpha$		
0	0	$+\alpha$		
0	0	0	}	Pontos Centrais
0	0	0		

FIGURA 1: Esquema do planejamento composto central rotacional.

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada) na matriz de planejamento (Tabela 3), utilizando a equação geral de codificação (Equação 1).

TABELA 3 - Matriz de planejamento experimental (PCCR) com três variáveis

Experimentos	Variáveis		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	$-\alpha$	0	0
10	α	0	0
11	0	$-\alpha$	0
12	0	α	0
13	0	0	$-\alpha$
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

X_1 – Temperatura (°C); X_2 – Agitação (rpm); X_3 – Concentração de substrato (%
penas)

$$\text{Equação geral: } X_n = [(X - X_0)] / (X_{+1} - X_{-1}) / 2 \quad (1)$$

Onde X_n é o valor codificado da variável independente, X é o valor real da variável independente a ser calculada, X_0 é o valor real da variável independente no ponto central e X_{+1} é o valor real da variável no nível superior, X_{-1} é o valor da variável no nível inferior.

A Tabela 4 apresenta as concentrações empregadas em cada um dos 17 experimentos do PCCR.

TABELA 4 - Valores das variáveis das fermentações (ponto central, níveis -1 e +1 e pontos axiais) usados no planejamento composto central rotacional (PCCR)

Variáveis	Níveis				
	- α	- 1	0	+1	+ α
X_1	26,6	30	35	40	43,4
X_2	66	100	150	200	234
X_3	0,32	1	2	3	3,68

X_1 = temperatura (°C); X_2 = agitação (rpm); X_3 = concentração de substrato (% de penas).

Determinada a matriz dos planejamentos e as condições de cada experimento, partiu-se para a etapa de realização dos experimentos, buscando a máxima fidelidade nas condições impostas pela matriz do planejamento. Após a coleta das amostras, foram realizados os ensaios de atividade enzimática em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

Os valores utilizados para otimização foram os melhores valores obtidos para atividade queratinolítica e atividade proteolítica, ambos obtidos após 48 horas do início da fermentação e para concentração de proteínas, os valores obtidos em 72 horas de fermentação.

A atividade queratinolítica e a atividade proteolítica, são as variáveis dependentes ou respostas (Y). A Equação (2) apresenta de forma completa a equação empírica de 2ª ordem proposta, que representaria cada uma das respostas estudadas.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i * x_i + \sum \beta_{ii} * x_{ii}^2 + \sum \beta_{ij} * x_{ij} \quad (2)$$

Foi realizado para cada resposta uma análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados. A partir da Equação 2 utilizada para o planejamento foi executada a estatística da estimativa dos parâmetros por meio dos valores de t de *Student*, onde as variáveis com nível de significância superior a 5% foram eliminados, definindo para cada uma das respostas estudadas uma equação que representa os efeitos das variáveis do processo. Os valores não eliminados

foram utilizados no cálculo da significância dos parâmetros, definido como a relação entre o valor do parâmetro estimado e o seu desvio padrão.

O valor de F de Fisher e o coeficiente de correlação quadrático (R^2) também foram utilizados para determinar a significância do modelo. O F de Fisher é determinado pela razão entre o quadrado médio da equação ajustada (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR), mostrado na Equação 3. Este valor é usado para a realização de um teste de hipótese para a verificação da adequação aos dados experimentais. Quanto maior o valor de F, melhor será o ajuste do modelo em questão.

$$F = QME/QMR \quad (3)$$

O quadrado médio da equação (QME) e o quadrado médio do resíduo (QMR) são dados pelas Equações 4 e 5, respectivamente:

$$QME = \frac{\text{Soma dos quadrados dos valores preditos}}{\text{Número de graus de liberdade da equação}} \quad (4)$$

$$QMR = \frac{\text{Soma dos quadrados do resíduo}}{\text{Número de graus de liberdade do resíduo}} \quad (5)$$

3.5 Estudo da otimização das condições de cultivo para a produção de queratinase

A Tabela 5 apresenta as concentrações empregadas em cada um dos 17 experimentos do PCCR. Todos os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura proposto por Willians et al., (1990) acrescida de penas inteiras, o pH inicial para todas as fermentações foi 7,5.

TABELA 5 - Matriz do planejamento experimental e valores reais utilizados nos experimentos

Experimentos	Variáveis Codificadas			Valores reais		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁ (Temperatura- °C)	Y ₂ (Agitação- rpm)	Y ₃ (% de penas)
1	-1	-1	-1	30	100	1
2	-1	-1	1	30	100	3
3	-1	1	-1	30	200	1
4	-1	1	1	30	200	3
5	1	-1	-1	40	100	1
6	1	-1	1	40	100	3
7	1	1	-1	40	200	1
8	1	1	1	40	200	3
9	- α	0	0	26,6	150	2
10	α	0	0	43,4	150	2
11	0	- α	0	35	66	2
12	0	α	0	35	234	2
13	0	0	- α	35	150	0,32
14	0	0	α	35	150	3,68
15	0	0	0	35	150	2
16	0	0	0	35	150	2
17	0	0	0	35	150	2

3.6 Determinações Analíticas

3.6.1 Avaliação da porcentagem de degradação das penas

Para determinação da porcentagem de degradação de penas, foi utilizada a metodologia descrita por Suntornsuk e Suntornsuk (2003). Ao final da fermentação o caldo foi filtrado em papel de filtro, seco em estufa a 105°C “overnight” (16 horas) e pesado. A porcentagem de degradação das penas foi calculada através da diferença no peso seco residual entre um controle (meio com penas sem inóculo) e a amostra tratada.

3.6.2 Determinação da atividade queratinolítica

Para a determinação da atividade queratinolítica foi adotada metodologia modificada descrita por Bressollier et al., (1999). A mistura de reação continha 800µl da solução enzimática, 3,2 ml de tampão Tris HCl 50mM pH 8,5 acrescida de 0,013g de azoqueratina comercial (Sigma). A mistura foi incubada durante 1 hora, em agitação de 100rpm e 50°C. Ao final do período de incubação foi adicionado 800µl de solução de TCA (ácido tricloroacético) 10%. A solução foi filtrada em peneira

TYLER 200 (0,074mm) e posteriormente determinava-se a absorbância do sobrenadante à 595nm, como branco foi utilizado 1,2 ml de TCA 10%, 2 mL de solução enzimática, 4,8ml de tampão Tris-HCl pH 8,5, acrescida de 0,013g de azoqueratina.

Determinou-se que uma unidade de atividade queratinolítica corresponde à quantidade da enzima que causa um aumento na absorbância de 0,01 nas condições citadas

3.6.3 Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica foi adotado a metodologia modificada de Mc Donald e Chen (1965), em que 1 ml da enzima era adicionada a 4 ml de uma solução contendo caseína 1% em tampão McIvaine pH 8,0. Esta solução era incubada durante 20 minutos a 50°C sob agitação de 100rpm. Após a incubação, era retirado 1 ml desta amostra e 1 ml de TCA 10%. A amostra ficava em repouso por 12 horas a 4°C. Após este período, a amostra era centrifugada e o sobrenadante era adicionado a 5 ml de uma solução que continha 100 ml de Na₂CO₃ 2%, 10 ml de NaOH 10%, 1 ml de tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆) 2,7% e 1 ml de CuSO₄ 1%. Após 10 minutos era adicionado 0,5ml de Folin Ciocauteau (1:1), a leitura foi realizada a 700nm.

A unidade de atividade proteolítica era determinada como a quantidade de protease que libera o equivalente de cor a 1µg de tirosina/minuto. Para realização do branco seguiu-se o mesmo procedimento, sendo que a enzima era inativada por fervura durante 5 minutos.

3.6.4 Determinação da concentração de proteínas

Para determinação da concentração de proteína foi utilizada a metodologia de Lowry e Cols (1951). Para realização desta análise, 1 ml da enzima era adicionada a 5 ml de uma solução contendo 50 ml de Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1N, 9,5ml de CuSO₄ 1% em água e 0,5ml de tartarato de sódio e potássio 1%. Esta solução ficava em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse

período era adicionado 0,5ml de Folin Cicauteau (1:1) à amostra. Após 30 minutos foi realizada leitura à 660nm. A concentração da proteína foi expressa em mg/mL.

3.6.5 Determinação de aminoácidos presentes no caldo fermentado

A presença de aminoácidos no caldo de cultura foi realizada por cromatografia em camada delgada. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel e como fase móvel a mistura n – butanol / ácido acético / água (4:5:1). O agente revelador utilizado foi a ninidrina 0,2% (p/v) em acetona com adição de 5 gotas de piridina. As amostras consistiram de caldo de fermentação centrifugados, além dos padrões de aminoácidos serina, prolina, tirosina, metionina, cisteína e leucina. A amostra utilizada foi obtida a partir de uma cultura de 72 horas, pH 7,5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com a matriz obtida, seguindo as condições determinadas a fim de obter os valores de atividade proteolítica, atividade queratinolítica, concentração de proteínas, porcentagem de degradação de penas e crescimento microbiano.

Na Figura 2 pode-se observar a concentração de proteínas (mg/ml) obtida em cada uma das 17 fermentações realizadas. Essas concentrações são apresentadas em função do tempo de cultivo. Os resultados obtidos mostram que a concentração de proteína (mg/ml) no caldo fermentado aumentou com o decorrer do tempo de fermentação em 15 das 17 fermentações realizadas.

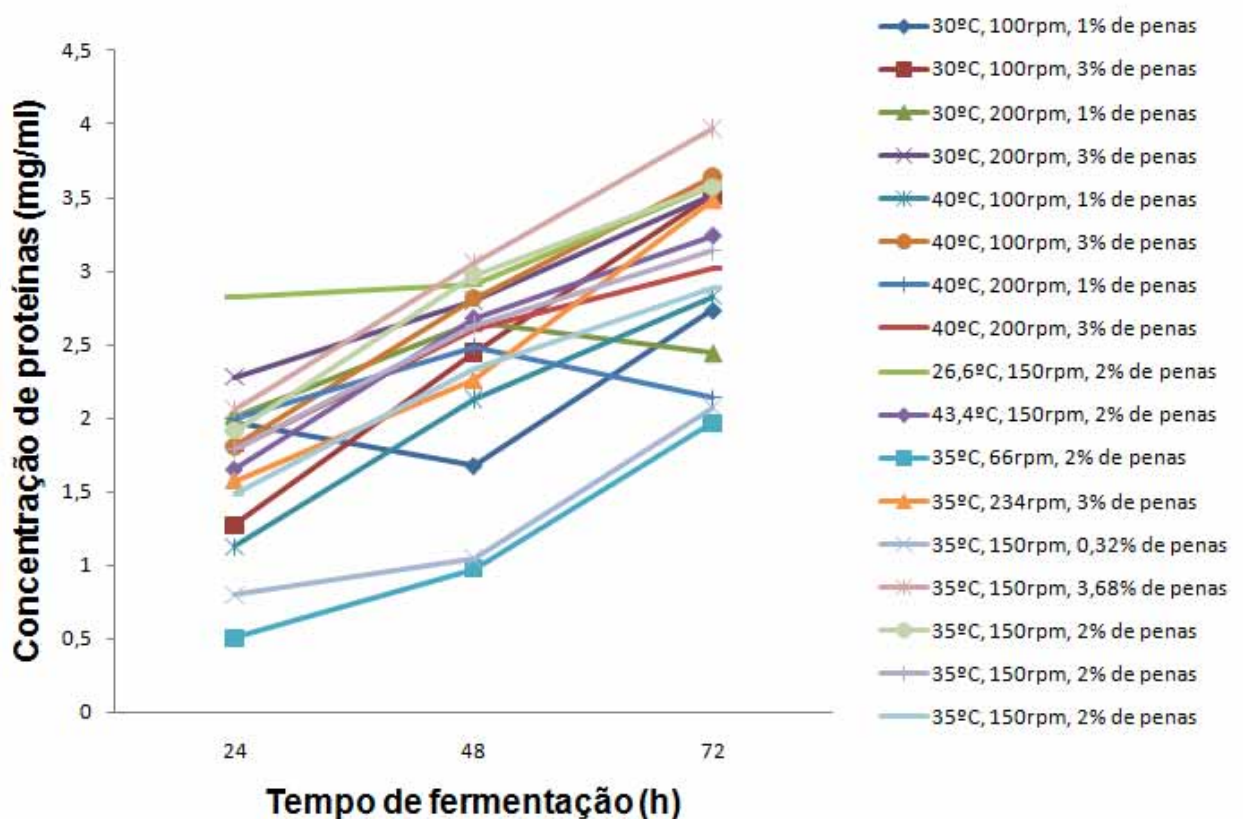


FIGURA 2: Média da concentração de proteínas (mg/ml) em função do tempo de cultivo.

O aumento da concentração de proteínas concomitante ao tempo de fermentação é uma consequência do aumento da concentração de proteínas solúveis no meio decultivo devido a degradação das penas (SZABÓ et al., 2000), ou

seja, uma maior degradação do substrato leva a uma maior concentração de proteínas solúveis no meio de cultivo, conforme apresentado na Figura 2.

Na Figura 2 também pode-se observar que após 72 horas de fermentação a condição de cultivo que proporcionou a maior concentração de proteínas no caldo fermentado foi quando o micro-organismo foi cultivado à 35°C, 150 rpm e 3,68% de penas, enquanto a fermentação na qual o micro-organismo foi cultivado a 35°C, 150 rpm e com a menor concentração de penas no meio de cultivo (0,32%) foi a que apresentou menor concentração de proteínas solúveis.

A Figura 3 apresenta a concentração de proteínas (mg/ml) no caldo fermentado após 72 horas de cultivo. Comparando-se as fermentações em que foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e agitação e que diferiram apenas na concentração de substrato (30°C, 100rpm e 30°C, 200rpm; 40°C, 100 rpm e 40°C, 200 rpm), verificou-se que aquelas em que foi utilizado 3% de penas apresentaram maiores concentrações são de proteína (mg/ml), demonstrando que maior concentração de substrato proporcionou aumento na concentração final de proteínas do caldo fermentado.

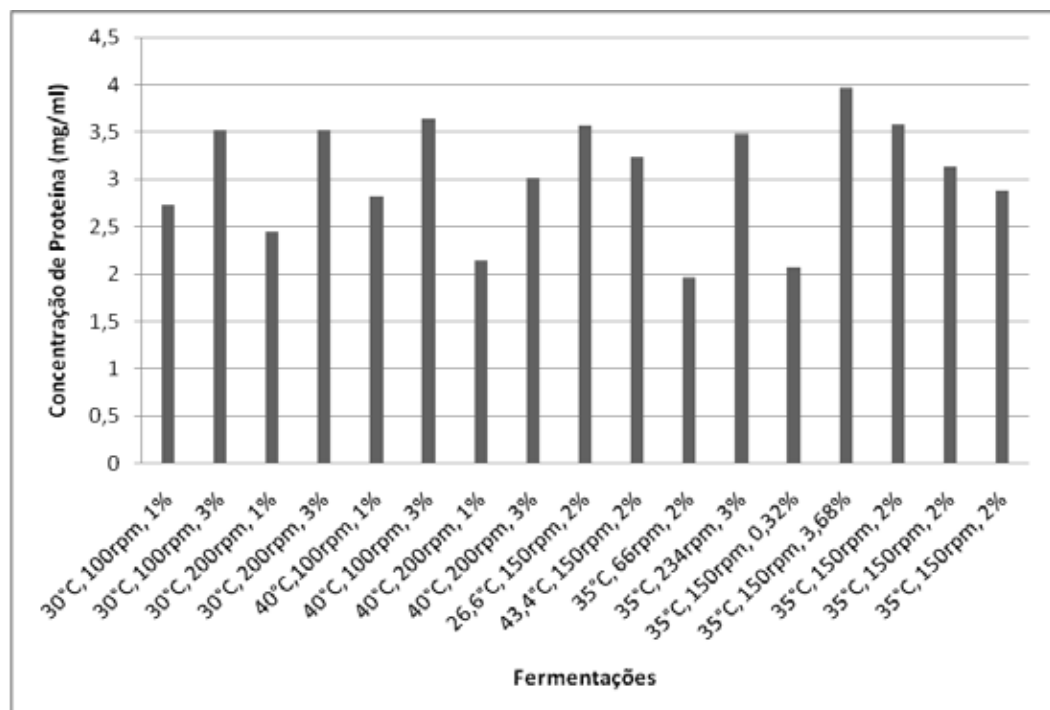


FIGURA 3: Concentração de proteína (mg/ml) obtida ao final de 72 horas de fermentação, em função das condições de cultivo.

A Figura 4 apresenta a porcentagem de degradação de penas em função das condições de cultivo realizadas. Pode-se observar que as condições que resultaram em maior degradação foi quando utilizou-se 30°C, 200 rpm e 3% de penas, obtendo-se 78,97% de degradação, seguida pelo cultivo realizado sob as condições de 35°C, 150rpm, 3,68% de penas, que resultou em 78,22% de degradação. Menor degradação foi observada quando a fermentação foi realizada à 35°C, 66rpm e 2% de penas (23,70% de degradação), seguida pela fermentação realizada sob as condições de 35°C, 150rpm e 0,32% de penas (34,40% de degradação).

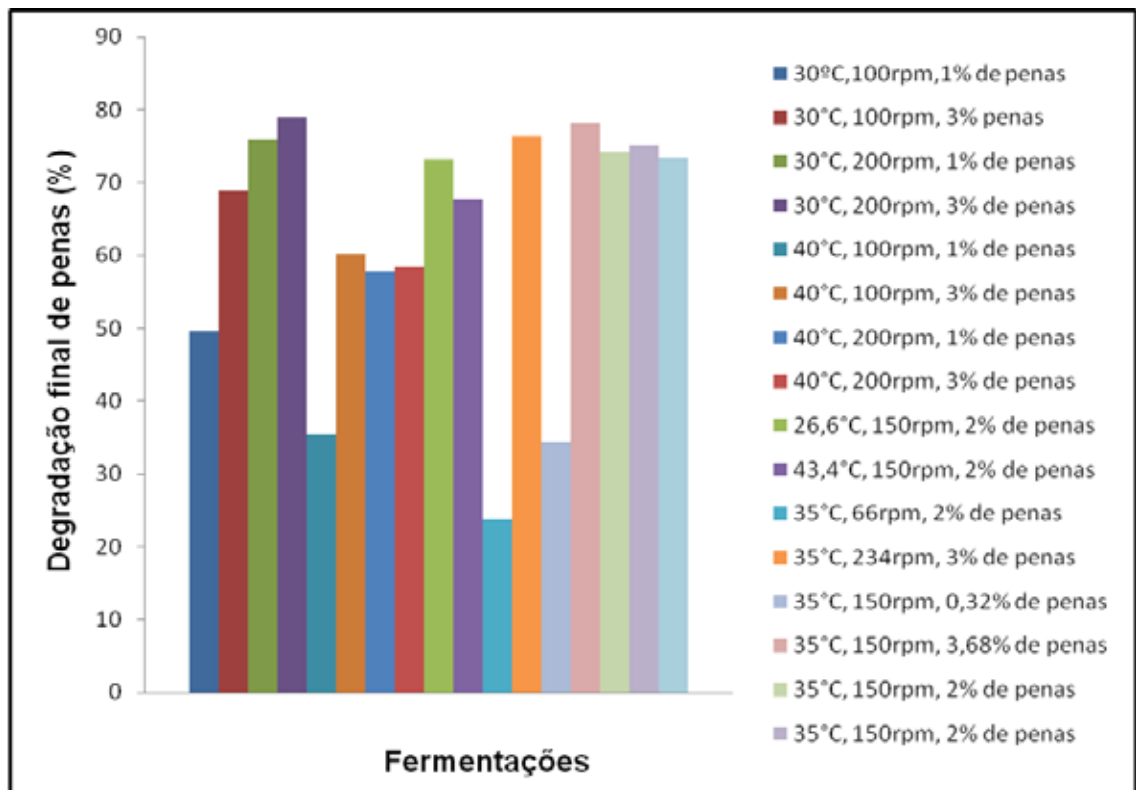


FIGURA 4: Porcentagem de degradação de penas obtida ao final de 72 horas de fermentação.

Como esperado, a fermentação realizada sob as condições de 35°C, 66 rpm e 2% de penas foi a que apresentou menor atividade queratinolítica (106,25 U/ml). Ressalta-se que as fermentações que resultaram em maior porcentagem de degradação de penas também apresentaram maior atividade queratinolítica.

A degradação de penas por bactérias do gênero *Bacillus* tem sido verificada em uma série de trabalhos. Suntorsuk e Suntorsuk (2003), utilizando *Bacillus* sp. FK

46 mostraram que a quantidade de proteína bruta da pena é de 89,2%, sendo que após degradadas pelo micro-organismo, a quantidade de proteína bruta foi de 67,4%. A explicação do autor é que a enzima produzida pelo micro-organismo hidrolisa a proteína, que é utilizada como nutriente para a bactéria. Além disso os autores verificaram que a estrutura da pena foi alterada pela atividade da bactéria, o que poderia acarretar em liberação de resíduos da pena degradada, os quais são proteínas que poderiam ser digeridas mais facilmente e que, por isso, poderiam ser utilizadas para ração animal.

Dessa forma, é importante verificar que uma maior degradação de penas pode ser resultado de uma maior atividade queratinolítica dependente das condições de fermentação utilizadas.

Na Figura 5, pode-se observar que a fermentação que proporcionou maior crescimento microbiano foi a realizada à 30°C, 200 rpm e 3% de penas (7,29 UFC/mL), seguida pelo cultivo realizado à 35°C, 150rpm, 3,68% de penas (7,28 UFC/ mL). Já as condições que resultaram em baixo crescimento microbiano foram 35°C, 66 rpm, 2% de penas (6,53 UFC/mL), seguida pela fermentação realizada à 35°C, 150 rpm 0,32% de penas (6,57 UFC/mL). Esses resultados sugerem que o aumento do crescimento microbiano provavelmente proporcione uma maior produção da enzima queratinase, que aumentará a degradação das penas, uma vez que estas são responsáveis pela hidrólise de queratinas.

Wang e Shih (1999) estudando *Bacillus subtilis* verificaram a produção de queratinase e crescimento microbiano em função da concentração de penas (0,5 e 1,5%) adicionadas ao meio de cultivo, assim, os autores verificaram que o aumento da concentração de substrato resultou em aumento do crescimento microbiano, o que foi acompanhado por um aumento na produção da enzima queratinase. Dessa forma, um aumento na concentração de substrato proporcionaria uma maior disponibilidade de fonte proteica para o crescimento microbiano.

Cortezi et al., (2009) estudando uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, isolada de uma indústria de processamento de frangos, verificaram que esta apresentou alta eficiência para ser utilizada em processos biotecnológicos. A produção da enzima e o crescimento microbiano foram influenciadas pelas condições de cultivo, sendo que maior atividade queratinolítica foi obtida quando o

micro-organismo foi cultivado a 40°C, 150 rpm, 1% de penas e pH inicial 7,5. Os resultados mostraram que a liberação de aminoácidos no caldo de cultura, evidenciado por cromatografia em camada delgada, permite seu uso em ração animal.

Segundo alguns autores, as fermentações que produziram maior atividade queratinolítica foram também as que apresentaram maior crescimento bacteriano, (CHENG et al., 1995; MACFARLANE e MACFARLANE, 1992), indicando assim que as proteases tem importância do ponto de vista nutricional para as linhagens descritas e de *Bacillus amyloliquefaciens*, viabilizando seu crescimento através da hidrólise proteica.

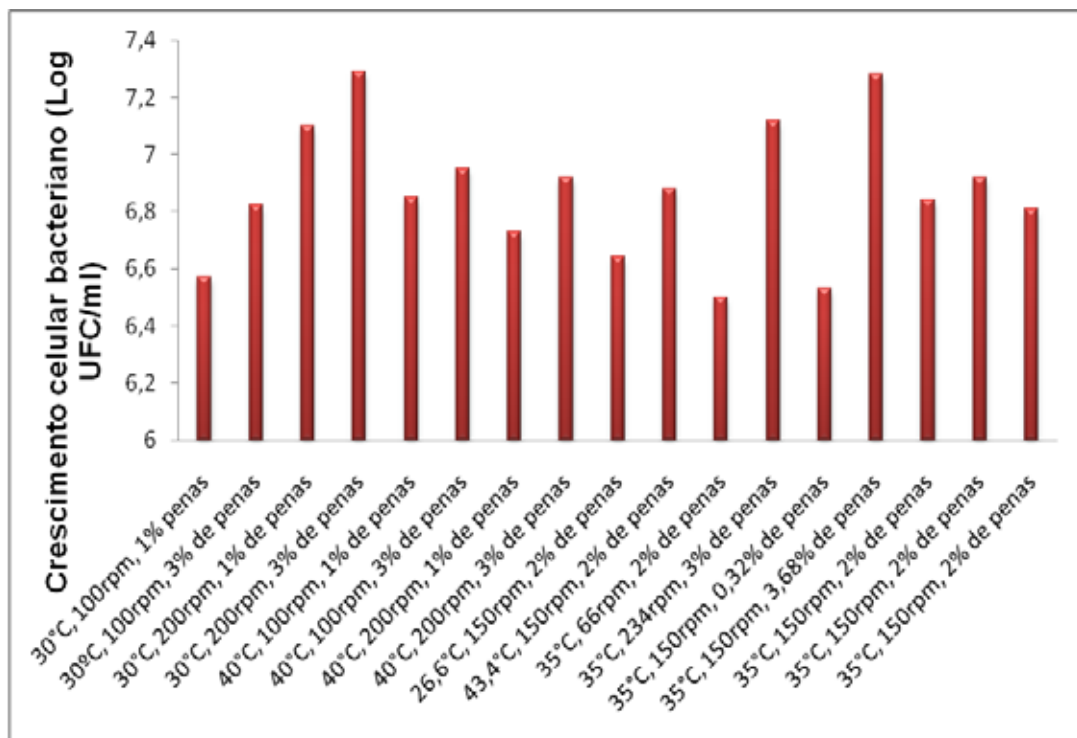


FIGURA 5: Crescimento bacteriano ao final de 72 horas de fermentação em função das condições de cultivo.

Ao final da realização de todas as 17 fermentações, foi realizada a otimização da atividade proteolítica tendo como objetivo determinar os melhores valores de temperatura (°C), agitação (rpm) e concentração de substrato (porcentagem de penas) para a obtenção da maior atividade proteolítica ($\mu\text{g/ml/min}$). As amostras foram coletadas com 24, 48 e 72 horas de fermentação, sendo que os

melhores resultados obtidos (48 horas) foram inseridos na matriz do planejamento experimental (Tabela 6) e assim determinou-se os valores preditos e observados, como pode-se observar no gráfico a seguir (Figura 6).

TABELA 6 - Matriz de planejamento experimental (PCCR) com três variáveis e a variável dependente (atividade proteolítica)

Experimentos	Variáveis			Atividade proteolítica
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	328,366
2	-1	-1	1	362,507
3	-1	1	-1	711,177
4	-1	1	1	690,647
5	1	-1	-1	256,897
6	1	-1	1	671,131
7	1	1	-1	157,037
8	1	1	1	179,543
9	- α	0	0	390,410
10	α	0	0	351,788
11	0	- α	0	355,944
12	0	α	0	362,837
13	0	0	- α	369,224
14	0	0	α	708,896
15	0	0	0	678,482
16	0	0	0	692,928
17	0	0	0	647,308

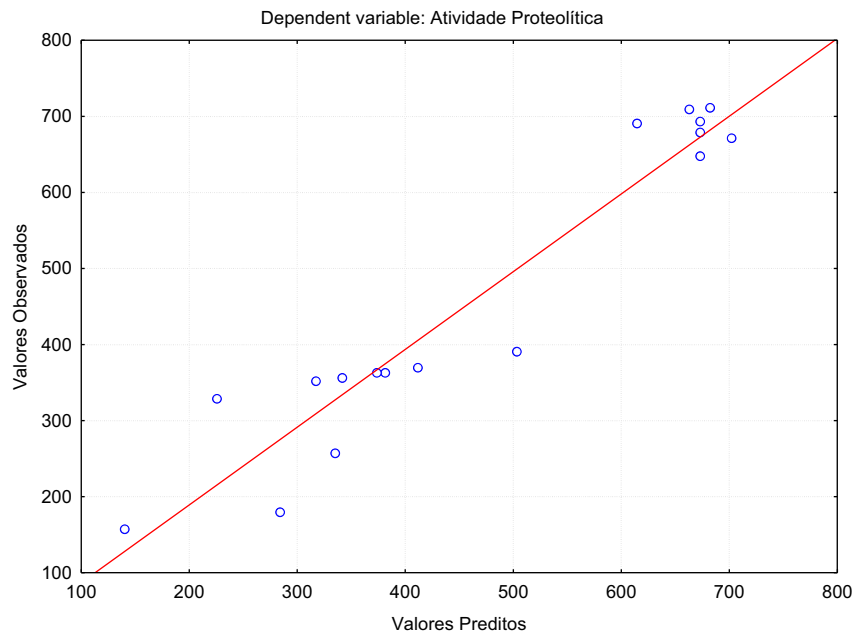


FIGURA 6: Valores preditos em função dos observados relativos à atividade proteolítica

Os valores observados (experimentais) apresentados na Figura 6 estão distribuídos próximos aos valores preditos, o que aumenta a significância do modelo proposto. A seguir, foram determinados os valores de p (nível de significância), observados na Tabela 7, e a equação geral (6):

TABELA 7 - Coeficientes estimados pela regressão linear múltipla (Significância dos coeficientes de regressão) para atividade proteolítica

N = 17	B	Std.Err. of B	T (7)	Nível de significância (p)
Intercepto	672,158	49,161	13,672	0,000
X₁	-65,392	23,086	-2,832	0,025
X₂	9,593	23,086	0,415	0,025
X₃	74,806	23,086	3,240	0,014
X₁X₂	-162,800	30,164	5,397	0,001
X₁X₃	52,891	30,164	1,753	0,122
X₂X₃	-55,800	30,164	-1,849	0,106
X₁X₁	-104,125	25,410	-4,097	0,004
X₂X₂	-108,256	25,410	-4,260	0,003
X₃X₃	-44,742	25,410	-1,760	0,121

$$Y = 672,158 - 65,392X_1 + 9,593X_2 + 74,806X_3 - 162,8X_1X_2 + 52,891X_1X_3 - 55,8X_2X_3 - 104,125X_1X_1 - 108,256X_2X_2 - 44,742X_3X_3 \quad (6)$$

Em que Y, representando a atividade proteolítica ($\mu\text{g/ml/min}$), é a resposta e X_1 , X_2 , X_3 são os valores codificados de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), agitação (rpm) e concentração de substrato (% de penas), respectivamente.

A Tabela 7 apresenta os coeficientes estimados pela regressão linear múltipla após a eliminação dos parâmetros com nível de significância do teste t Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes e, assim, tendo sido despresados o valor isolado de agitação (X_2), os termos quadráticos de concentração de substrato (X_3) e a interação de temperatura/concentração de substrato (X_1X_3) e agitação/concentração de substrato (X_2X_3) e, após a retirada dos parâmetros não significativos, foi determinada a equação ajustada (7):

TABELA 8 - Coeficientes estimados pela regressão linear múltipla (Significância dos coeficientes de regressão) para atividade proteolítica após eliminação dos parâmetros não significativos ($p < 0,05$)

N = 17	B	Std.Err.B	T(11)	Nível de Significância (p)
Intercepto	614,978	45,572	13,494	0,000
X_1	-65,392	28,505	-2,294	0,042
X_3	74,806	28,505	2,624	0,023
X_1X_2	-162,800	37,244	-4,371	0,001
X_1X_1	-90,908	29,974	-3,032	0,011
X_2X_2	-95,039	29,974	-3,170	0,008

$$Y = 614,978 - 65,392 X_1 + 74,806 X_3 - 162,800 X_1X_2 - 90,908 X_1X_1 - 95,0309 X_2X_2 \quad (7)$$

Analisando a Equação 8, verifica-se que os fatores que mais influenciaram a atividade proteolítica foram as interação X_1X_2 (temperatura e agitação), as variável

quadrática X_2X_2 (agitação) e X_1X_1 (temperatura). Na Equação 7, também pode-se observar que se aumentarmos o valor da variável X_1 (temperatura) o valor da atividade proteolítica diminui, enquanto se aumentarmos o valor de X_3 (concentração de substrato) o valor da atividade proteolítica aumenta.

O coeficiente de correlação calculado (R^2) foi de 0,8101 para atividade proteolítica, indicando que esse modelo estatístico pode explicar 81,01% da variabilidade da resposta. O valor do coeficiente de determinação ajustado ($Adj R^2$) foi de 0,724, também considerado alto, o que valida a significância do modelo. Neste trabalho, o valor do R^2 ajustado foi de 0,7238, menor do que o R^2 , que foi de 0,8101 (TATIENI et al., 2007).

Além disso, o Teste de F de Fisher mostrou um valor de F calculado $F_C(5,11) = 9,3875$, quase 3 vezes superior ao F tabelado $F_T(5,11) = 3,20$ o que demonstra significância do modelo de regressão (MYERS e MONTGOMERY, 2002). Esta comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade (H_0) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero, enquanto a hipótese alternativa H_1 diz afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar H_0 no nível de significância de 5%, ou seja, desde que apresente uma confiança de 95% que o modelo é significativo. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas nesse planejamento experimental.

A significância de cada coeficiente foi determinado pelo teste t-student e valor de p, que estão listados na Tabela 7. Quanto menor o valor de p e maior a magnitude do valor de t, mais significativo é o coeficiente correspondente (MYERS e MONTGOMERY 2002).

Dessa forma, para a obtenção dos gráficos de superfície de resposta e gráficos de superfície de contorno, foi utilizada a Equação ajustada (7).

As Figuras 7 (superfície de resposta) e 8 (superfície de contorno) apresentam a variação da atividade proteolítica em função da temperatura e agitação.

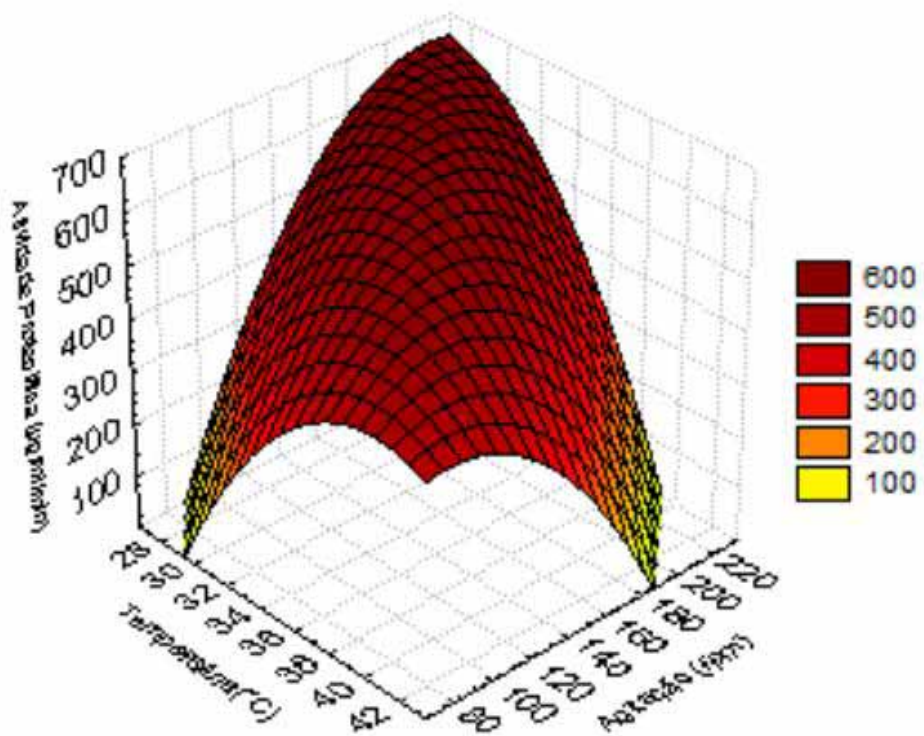


FIGURA 7: Gráfico de superfície de resposta para atividade proteolítica observada em função da temperatura e agitação.

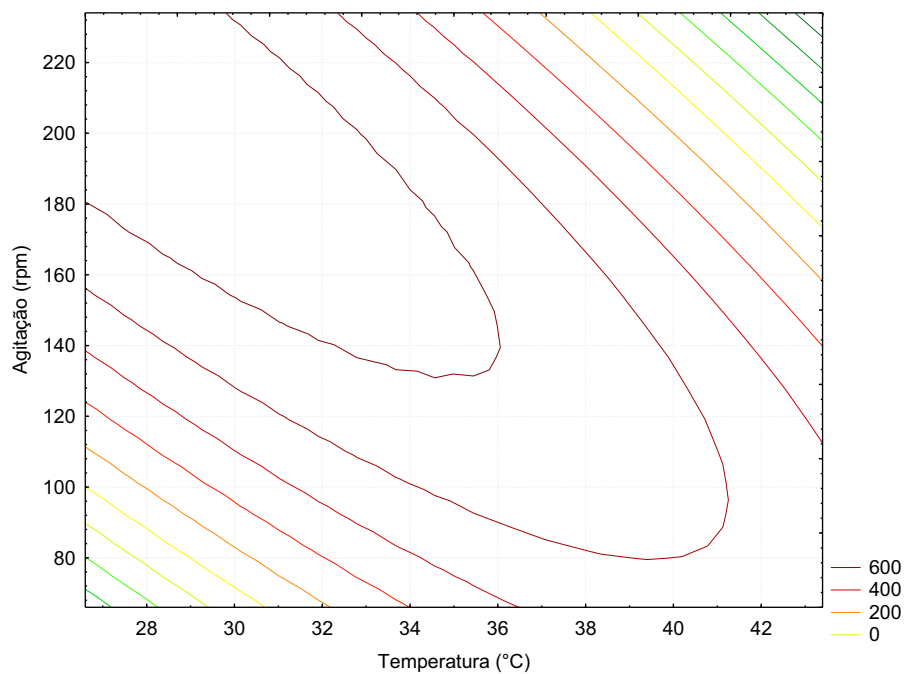


FIGURA 8: Curva de superfície de contorno para atividade proteolítica observada em função da temperatura e agitação.

De acordo com as Figuras 7 e 8 pode-se observar que maior atividade proteolítica (600 $\mu\text{g/ml/min}$) foi obtida quando a fermentação foi realizada sob temperaturas entre 34°C e 38°C e, para essas temperaturas, agitações entre 120 e 220 rpm. É demonstrado que, tanto uma redução na temperatura (abaixo de 34°C) com baixas agitações (de 66 rpm à 100 rpm) quanto um aumento na temperatura (a partir de 42°C) com um aumento na agitação (de 180 à 234 rpm) reduziram a atividade proteolítica para 100 $\mu\text{g/ml/min}$.

As Figuras 9 e 10 apresentam a variação da atividade proteolítica em função da temperatura e concentração de substrato.

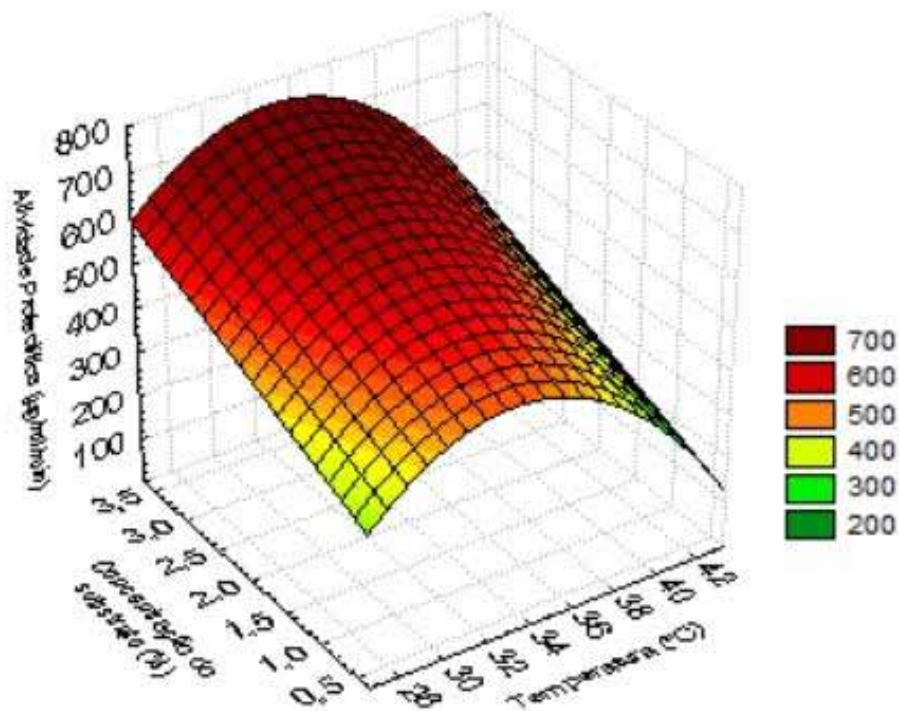


FIGURA 9: Gráfico de superfície de resposta para atividade proteolítica observada em função da temperatura e concentração de substrato.

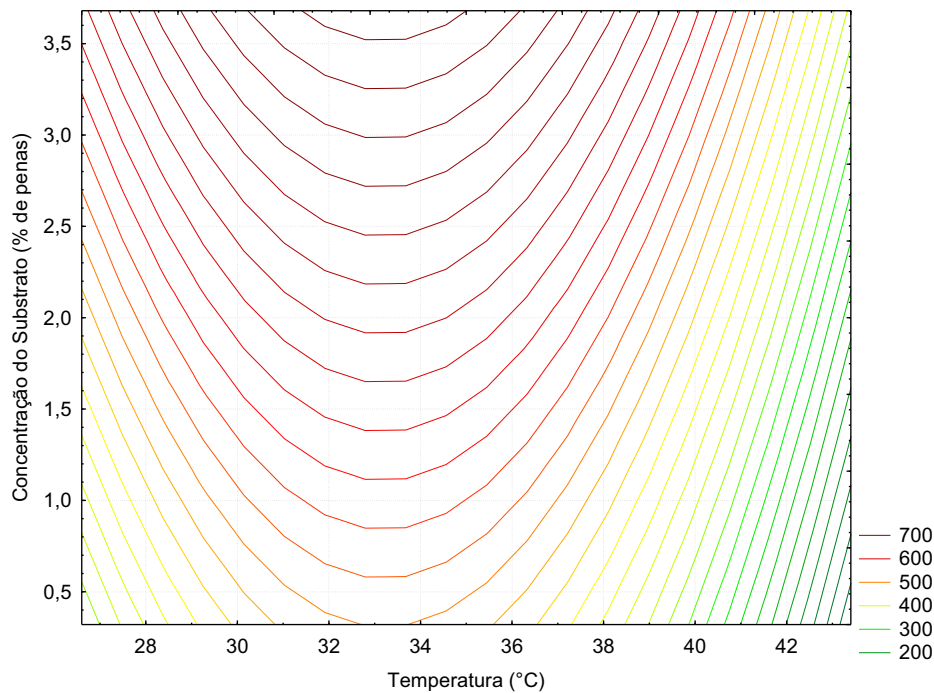


FIGURA 10: Curva de superfície de contorno para atividade proteolítica observada em função da temperatura e concentração de substrato

De acordo com as Figuras 9 e 10, as temperaturas de cultivo que resultaram em maior atividade proteolítica foram 32°C a 38°C e concentração de substrato de 3 à 3,68%, atingindo assim, uma atividade de 700 µg/ml/min. Menor atividade proteolítica foi obtida quando utilizada temperatura superior a 42°C, sendo esta variável a que mais interferiu na atividade proteolítica. No entanto, observa-se que em temperaturas elevadas e com uma concentração de substrato entre 0,32% à 1% os valores de atividade situaram-se entre 200 µg/ml/min, enquanto sob a mesma temperatura, com concentração de substrato superior (3,0% à 3,5%) os valores de atividade ficaram entre 300 e 400 µg/ml/min. Houve também uma tendência de redução da atividade proteolítica quando a fermentação foi realizada em temperaturas abaixo de 30°C e concentrações de substrato inferiores à 1,5%, chegando a 200 µg/ml/min quando utilizada temperatura de aproximadamente 27°C e uma concentração de 0,5% de penas.

Ao contrário do observado para atividade queratinolítica, em que vários trabalhos mostram que a maior atividade é obtida quando a fermentação é realizada

sob baixas temperaturas (entre 23°C e 28°C) ou sob altas temperaturas (acima de 42°C), variando principalmente com a concentração de substrato e tipo de micro-organismo estudado, neste trabalho, os valores máximos de atividade proteolítica geralmente ocorreram próximos à temperatura ambiente, entre 30°C e 37°C.

Os trabalhos realizados por Atalo e Gashe (1993), Willians et al., (1990) e Riffel et al., (2002), mostraram que a atividade proteolítica de bactérias geralmente é máxima entre 30°C a 37°C, próximo à temperatura ambiente, enquanto a atividade de degradação das penas (atividade queratinolítica) ocorre em temperaturas mais elevadas.

O mesmo também foi descrito no trabalho de Riffel e Brandelli (2002), estudando uma *Flavobacteria* sp. isolada de um abatedouro de frangos, os autores verificaram que a máxima atividade proteolítica ocorreu na faixa de temperatura entre 30°C a 37°C.

Esses resultados sugerem que a atividade proteolítica difere da atividade queratinolítica para diferentes micro-organismos, e que maior atividade proteolítica geralmente apresenta valores ótimos em temperaturas intermediárias, enquanto temperaturas intermediárias provocam redução na atividade queratinolítica.

As Figuras 11 e 12 apresentam os valores de atividade proteolítica obtidos em função da agitação e concentração de substrato utilizados.

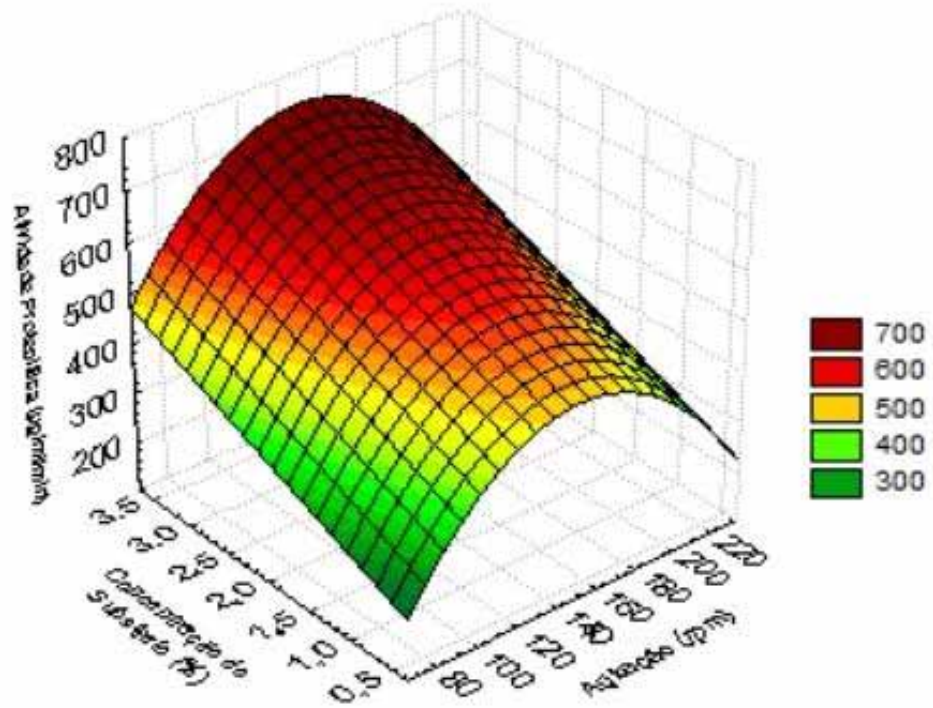


FIGURA 11: Gráfico de superfície de resposta para atividade proteolítica observada em função da agitação e concentração de substrato.

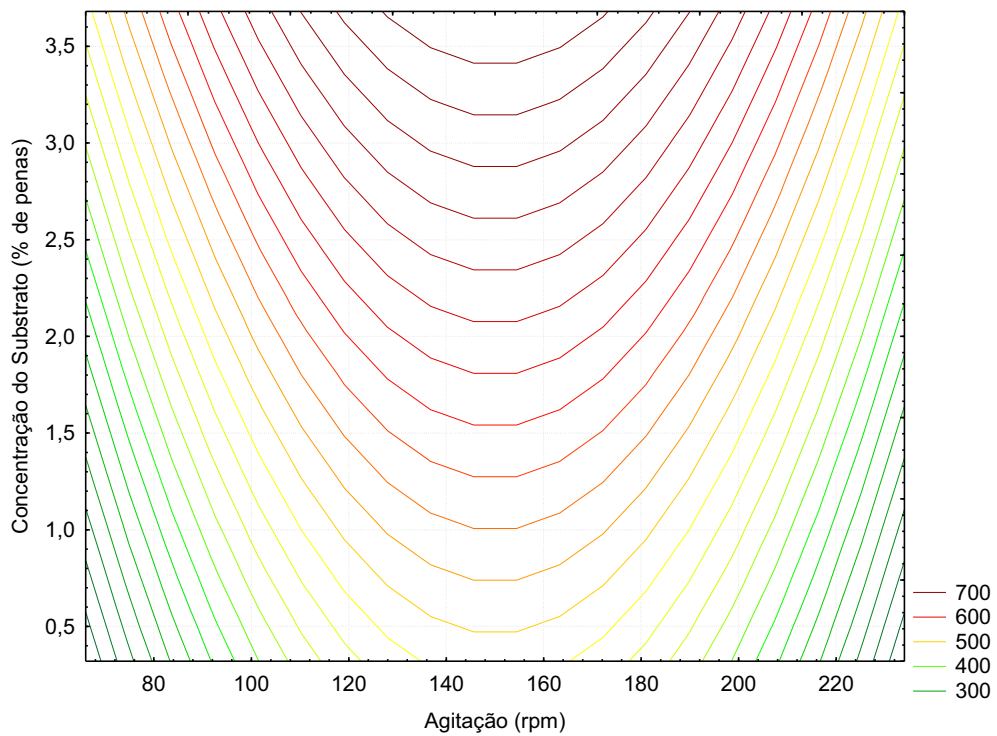


FIGURA 12: Curva de superfície de contorno para atividade proteolítica observada em função da agitação e concentração de substrato.

De acordo com as Figuras 11 e 12 os melhores valores de atividade proteolítica foram obtidos quando o cultivo foi realizado com uma agitação de 140 a 180 rpm e concentração de substrato variando entre 3 e 3,5% de penas, obtendo-se assim 700 $\mu\text{g/ml/min}$. Quando utilizada baixas agitações (inferiores de 140rpm) e baixa concentração de penas (inferiores à 2,5 % de penas) houve baixa atividade proteolítica (menores que 400 $\mu\text{g/ml/min}$). Valores baixos de atividade também foram obtidos quando agitações superiores a 200 rpm e concentração de substrato inferiores à 2,5% de penas foram utilizados, obtendo atividade proteolítica inferior à 400 $\mu\text{g/ml/min}$. Quando utilizada uma concentração de substrato maior que 3% com agitações superiores a 200rpm os valores de atividade proteolítica apresentaram-se maiores, entre 500 e 600 $\mu\text{g/ml/min}$.

Para os resultados de atividade queratinolítica foi adotado o mesmo procedimento experimental de otimização da determinação da atividade proteolítica. Nesse contexto, a atividade queratinolítica é a variável dependente. Os valores utilizados foram os que se apresentaram maiores, ou seja, após 48 horas de fermentação. Os resultados obtidos foram adicionados na matriz, de acordo com o apresentado na Tabela 9 e assim determinou-se os valores preditos e observados, como pode-se observar na Figura 13.

TABELA 9 - Matriz de planejamento experimental (PCCR) com três variáveis e a variável dependente (atividade queratinolítica)

Experimentos	Variáveis			Atividade queratinolítica
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	277
2	-1	-1	1	154,5
3	-1	1	-1	258
4	-1	1	1	249,75
5	1	-1	-1	150
6	1	-1	1	138,5
7	1	1	-1	130,25
8	1	1	1	209,25
9	$-\alpha$	0	0	365,25
10	α	0	0	183
11	0	$-\alpha$	0	128,25

TABELA 9 (Continuação) - Matriz de planejamento experimental (PCCR) com três variáveis e a variável dependente (atividade queratinolítica)

Experimentos	Variáveis			Atividade queratinolítica
	X_1	X_2	X_3	
12	0	α	0	290,25
13	0	0	$-\alpha$	123
14	0	0	α	144,75
16	0	0	0	147,75
17	0	0	0	144,89

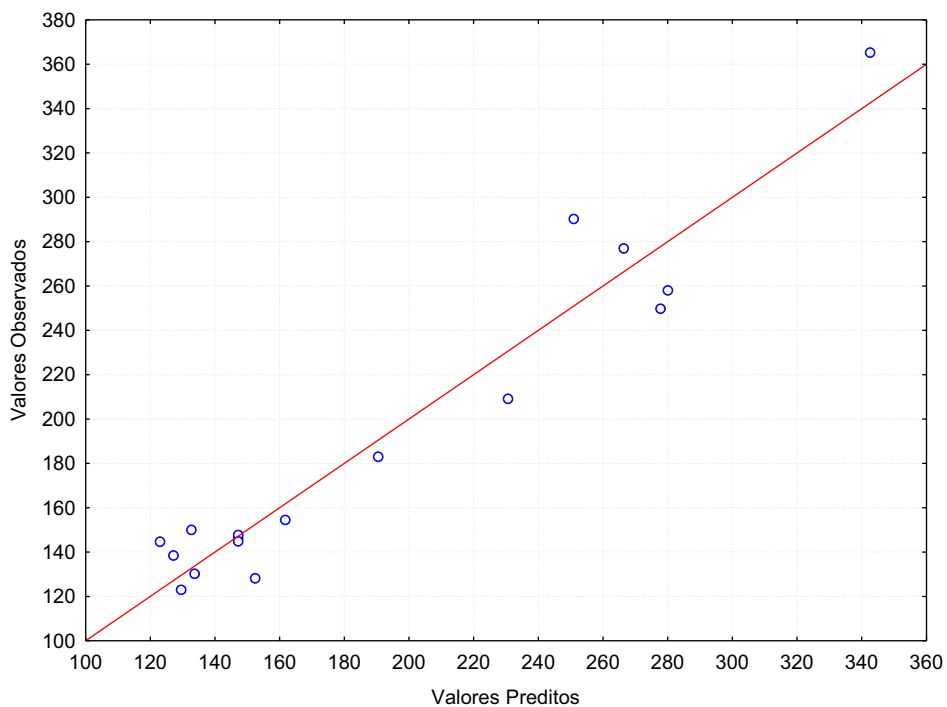


FIGURA 13: Valores preditos em função dos observados relativos à atividade queratinolítica.

Os valores observados (experimentais) apresentados na Figura 6 estão distribuídos próximos aos valores preditos, o que aumenta a significância do modelo proposto.

A seguir, foram determinados os valores de p (Tabela 10) e a Equação geral (8):

TABELA 10 - Coeficientes estimados pela regressão linear múltipla (Significância dos coeficientes de regressão) para atividade queratinolítica

N = 17	B	Std.Err.B	T(7)	Nível de significância (p)
Intercepto	147,163	16,235	9,064	0,000
X₁	-45,234	7,624	-5,932	0,000
X₂	29,267	7,624	3,838	0,006
X₃	-1,952	7,624	-0,256	0,805
X₁X₂	-3,156	9,961	0,316	0,760
X₁X₃	24,781	9,961	2,487	0,041
X₂X₃	25,593	9,961	2,569	0,037
X₁X₁	42,208	8,391	5,029	0,001
X₂X₂	19,271	8,391	2,296	0,055
X₃X₃	-7,377	8,391	-0,879	0,408

$$Y = 147,1635 - 45,2342 X_1 + 29,2342 X_2 - 1,9529 X_3 - 3,1563 X_1X_2 + 24,7813 X_1X_3 + 25,5937 X_2X_3 + 42,2081 X_1X_1 + 19,2714 X_2X_2 - 7,3777 X_3X_3 \quad (8)$$

Onde Y, representando a atividade queratinolítica (U/ml), é a resposta e X₁, X₂, X₃ são os valores codificados de temperatura (°C), agitação (rpm) e concentração de substrato (% de penas).

A Tabela 11 apresenta os coeficientes estimados pela regressão linear múltipla após a eliminação dos parâmetros com nível de significância do teste t Student superiores a 5%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes e, assim, tendo sido desprezados o valor isolado de concentração de substrato (X₃), os termos quadráticos de concentração de substrato (X₃) e a interação de temperatura/agitação (X₁X₂) e, após a retirada dos parâmetros não significativos, foi determinada a equação ajustada (9):

TABELA 11 - Coeficientes estimados pela regressão linear múltipla para atividade queratinolítica após eliminação dos parâmetros não significativos ($p < 0,05$).

N=17	B	Std.Err.B	T(10)	Nível de significância (p)
Intercepto	137,735	10,860	12,682	0,000
X₁	-45,234	6,793	-6,658	0,000
X₂	29,267	6,793	4,308	0,001
X₁X₃	24,781	8,875	2,791	0,019
X₂X₃	25,593	8,875	2,883	0,016
X₁X₁	44,387	7,143	6,213	0,000
X₂X₂	21,450	7,143	3,002	0,013

$$Y = 137,7350 - 45,2342 X_1 + 29,2674 X_2 + 24,7813 X_1 X_3 + 25,5937 X_2 X_3 + 44,3876 X_1 X_1 + 21,4508 X_2 X_2 \quad (9)$$

Analisando a Equação ajustada (9), verifica-se que as variáveis que mais influenciaram na atividade queratinolítica foi a isolada e a quadrática X_1 (temperatura). Na Equação (9) também pode-se observar que se aumentarmos o valor da variável X_1 (temperatura), diminuiremos o valor da atividade queratinolítica, enquanto se aumentarmos o valor de X_2 (agitação), aumentamos a atividade queratinolítica.

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,923 para atividade queratinolítica, indicando que esse modelo estatístico pode explicar 92,32% da variabilidade da resposta.

Ademais, o Teste de F de Fisher mostrou um valor F calculado $F_c(6,10) = 20,46$, quase 7 vezes maior do que o F tabelado $F(5,11) = 3,22$ demonstrando uma alta significância do modelo de regressão

A significância de cada coeficiente foi determinado pelo teste t-student e valor de p, que estão listados na Tabela 11. Quanto menor o valor de p e maior a magnitude do valor de t, mais significante é o coeficiente correspondente (MYERS e MONTGOMERY, ., 2002).

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a atividade queratinolítica foram construídas superfícies de resposta juntamente com as curvas de contorno. As superfícies estão apresentadas nas Figuras 14, 16 e 18 e as curvas pelas Figuras 15, 17 e 19.

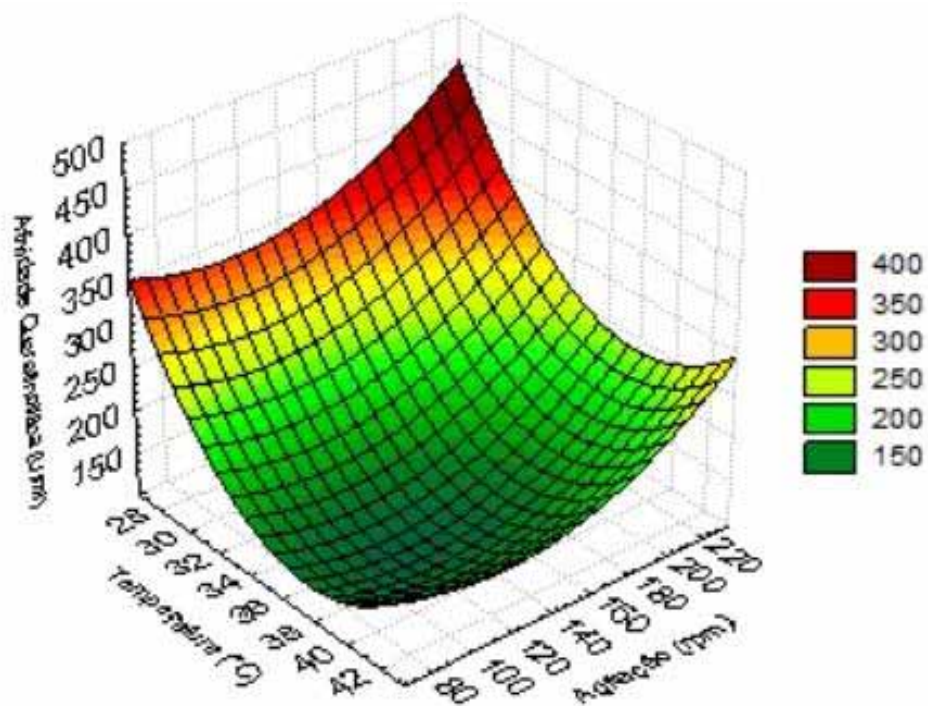


FIGURA 14: Gráfico de superfície de resposta para atividade queratinolítica observada em função da temperatura e agitação

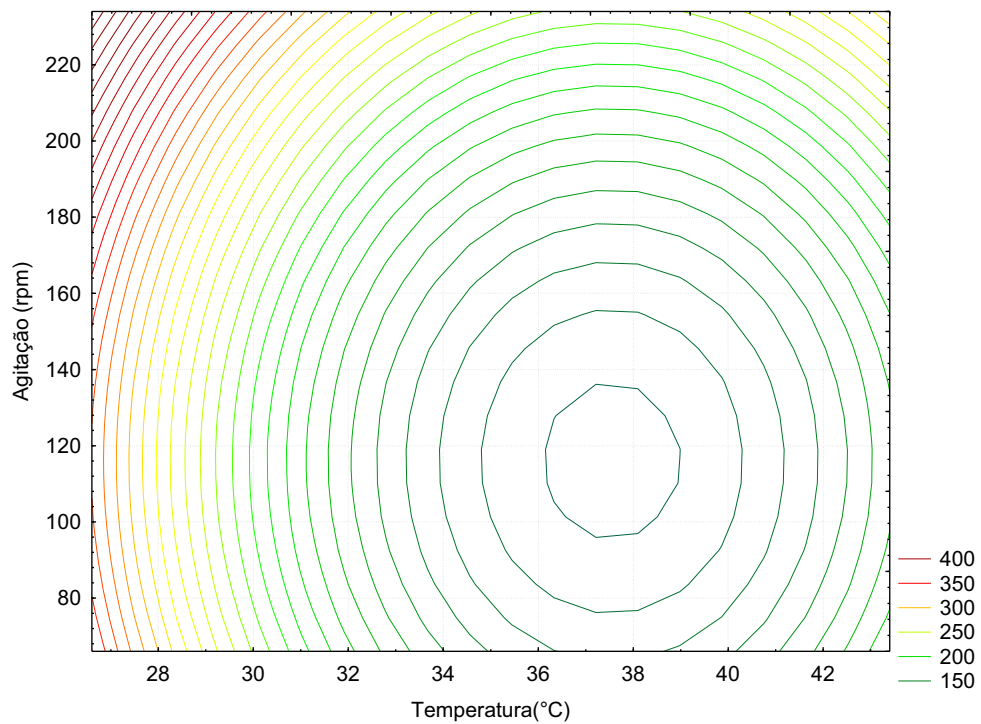


FIGURA 15: Curva de superfície de contorno para atividade queratinolítica observada em função da temperatura e agitação

Nas Figuras 14 e 15 observa-se que a diminuição da temperatura (26°C a 28°C) com agitação entre 200 e 220 rpm provocou um aumento na atividade queratinolítica. Já a variação de temperatura de 32°C a 42°C, sob qualquer agitação, provocou uma redução acentuada da atividade queratinolítica, chegando a menor atividade obtida (150 U/mL). Ademais, de acordo com a equação ajustada (6), as variáveis que mais influenciaram na atividade queratinolítica foram a temperatura e a agitação.

Kim et al., (2001) utilizaram em sua pesquisa, culturas identificadas como *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* a fim de avaliar a potencialidade dos mesmos na degradação de penas e atividade queratinolítica dos mesmos. As condições ótimas de temperatura para a produção da enzima por *Bacillus pumilis* foi de 40°C, para *Bacillus subtilis* 40°C e *Bacillus cereus* 30°C. As culturas apresentaram atividade queratinolítica máxima na fase de crescimento logarítmico ou no início da fase estacionária, nestas condições, a atividade queratinolítica foi de 96, 142 e 109 U/ml respectivamente.

Rozs et al., (2001) verificaram que a temperatura ótima de crescimento para *Bacillus licheniformis* K-508 foi de 47°C quando cultivada em meio contendo penas como substrato, nestas condições os autores verificaram alta atividade de degradação de penas.

Manczinger et al., (2003) estudando a mesma cepa de bactéria verificaram que esta apresentou maior crescimento em temperaturas entre 20 e 55°C, com temperatura ótima de 47°C, Assim puderam deduzir que com o aumento da temperatura possa ter ocorrido um aumento na concentração de micro-organismos presentes no meio de cultura resultando em maior atividade queratinolítica e conseqüente degradação das penas. No entanto, quando utilizada temperaturas mais baixas (26,6°C) também houve crescimento microbiano e conseqüente degradação das penas. Ademais, a agitação teria um efeito positivo ou negativo na atividade queratinolítica dependendo da temperatura utilizada. É importante ressaltar que *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis* são muito próximas filogeneticamente de *Bacillus amyloliquefaciens* (GORDON et al., 1973; SCHALLMEY et al., 2004) e por isso, as condições de cultivo para obtenção de maior atividade queratinolítica devem ser próximas.

Casarin et al., (2008) pesquisando a bactéria *Chryseobacterium* sp. realizaram um estudo de otimização da produção da enzima queratinase. Neste estudo, os autores mostraram que a maior atividade queratinolítica, utilizando meio de cultura contendo penas como substrato, ocorreu a uma temperatura de 23°C. A análise estatística realizada mostrou que a temperatura teve um forte efeito sob a produção de queratinase.

Wang e Shih (1999), estudando uma cepa de *Bacillus licheniformis*, verificaram que a taxa de oxigênio dissolvido limitava o crescimento celular e a produção da enzima queratinase pela cepa, os mesmos observaram que 5% de oxigênio dissolvido reduziu a taxa de crescimento do micro-organismo e a atividade queratinolítica. Os autores também demonstraram que uma taxa superior a 20% de oxigênio dissolvido provocou um descréscimo na produção da enzima queratinase e do crescimento celular.

Uma vez que a agitação do meio é importante para promover uma aeração do meio reacional, uma baixa agitação poderia influenciar negativamente o crescimento celular e uma conseqüente diminuição da atividade queratinolítica. No entanto, alta agitação poderia afetar negativamente o crescimento celular e conseqüentemente reduzir a atividade queratinolítica; os resultados apresentados nas Figuras 12 e 13, assim como as Figuras 14 e 15 demonstram isso.

Wang e Shih (1999) estudando uma cepa de *Bacillus subtilis* em meio contendo penas como substrato verificaram que estes apresentaram como temperatura ótima para crescimento 42°C, com um declínio no crescimento microbiano quando o mesmo foi cultivado a uma temperatura superior a 55°C. Segundo os autores, a máxima atividade queratinolítica ocorreu à 37°C, no entanto a máxima produtividade (atividade/tempo) da enzima queratinase ocorreu a 42°C.

A produção de enzimas geralmente é um processo aeróbio e dessa forma, os processos fermentativos envolvendo o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, tem o aspecto comum de exigirem um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio. O oxigênio é elemento fundamental, do ponto de vista bioquímico, para o armazenamento de energia sob ATP. Essas moléculas de ATP irão participar necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células, no processo de

proliferação da biomassa microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia. Assim sendo, para que o cultivo seja altamente eficiente, ocorrendo com elevadas velocidades de crescimento celular, significa altas velocidades de consumo de carbono e a necessidade de oxigênio dissolvido. No caso de estudo em shakers, a forma de dissolução de oxigênio dá-se através da agitação (rpm). Ademais, a concentração de oxigênio dissolvido diminui com aumento da temperatura.

Neste trabalho, como observado nas Figuras 12, 13, 14 e 15 houve uma tendência de aumento na atividade queratinolítica com o aumento da temperatura, acompanhada por um aumento na concentração de substrato e agitação. Dessa forma, para aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido de uma forma simples, deve-se aumentar também a agitação.

As Figuras 16 e 17 apresentam os valores de atividade queratinolítica em função da temperatura e da concentração de substrato.

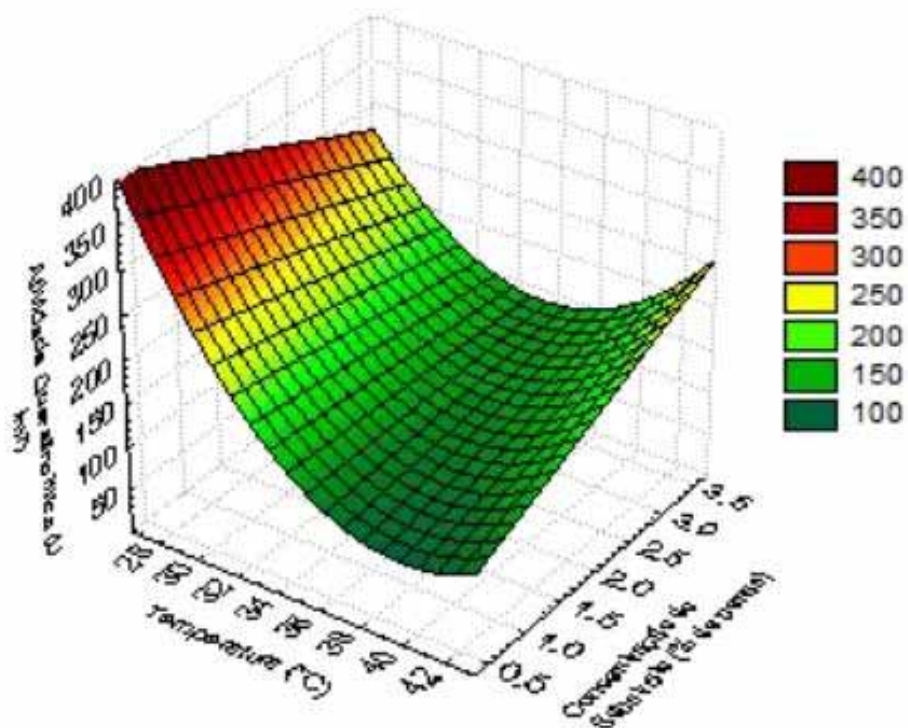


FIGURA 16: Gráfico de superfície de resposta para atividade queratinolítica em função da temperatura e concentração de substrato.

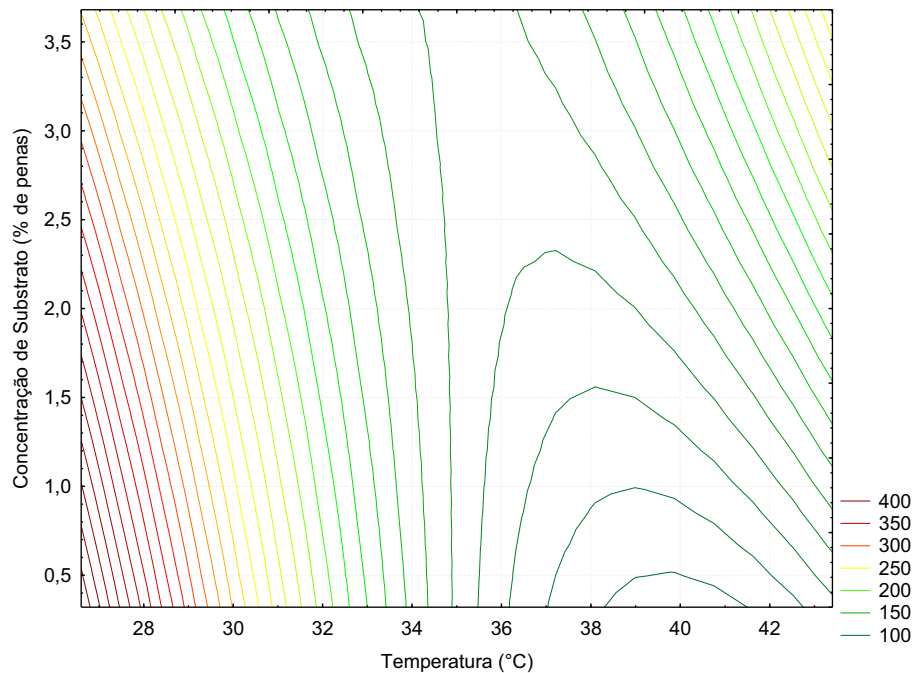


FIGURA 17: Curva de superfície de contorno para atividade queratinolítica em função da temperatura e concentração de substrato

Na Figura 16 observa-se que as melhores atividades queratinolíticas foram obtidas quando a fermentação foi conduzida a uma temperatura entre 26,6°C e 30°C e com menores concentrações de substrato, variando de 0,32% a 1,0%, produzindo de 350 à 400 U/ml de atividade queratinolítica. No entanto, observa-se uma tendência de aumento da atividade queratinolítica com o aumento da temperatura (aproximadamente 43°C) e aumento da concentração de substrato, chegando a 300 U/ml de atividade.

As Figuras 16 e 17 demonstram que, para baixas temperaturas (de 26,6°C à 30°C), houve um acúmulo na concentração de substrato e isto poderia ter influência negativa na atividade queratinolítica, uma razão para isto pode ser o fato de que sob baixas temperaturas as bactérias do gênero *Bacillus*, esporulantes, teriam baixo crescimento celular e, portanto, este acúmulo excessivo de substrato teria um efeito negativo na manutenção desse baixo número de micro-organismos. Com um aumento na temperatura, também haveria um aumento do crescimento celular e, se acompanhado de um aumento na concentração de substrato, haveria uma maior produção da enzima queratinase pelo micro-organismo. Pouco substrato teria o

efeito inverso, uma vez que não haveria fonte protéica para a obtenção de nutrientes pelas bactérias.

Wang e Shih (1999) pesquisando as bactérias *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* verificaram que quando cultivadas em meio contendo penas como substrato nas concentrações de 0,5 e 1%, respectivamente, e em altas temperaturas não houve necessariamente maior produção da enzima. Para *Bacillus licheniformis*, enquanto a melhor temperatura para crescimento celular foi 50°C, o pico de atividade queratinolítica foi a 37°C, enquanto que para *Bacillus subtilis*, a melhor temperatura de crescimento celular foi a 42°C e de atividade queratinolítica 37°C.

Kubo et al., (1991) descreveram que a expressão dos genes de bactérias termofílicas não são sempre favorecidos em altas temperaturas. Neste sentido, foi observado que o RNAm da queratinase possui pouca estabilidade sob altas temperaturas. Outras situações parecidas foram observadas em sistemas de *Bacillus* (PRIEST e SHARP, 1989). Possivelmente a expressão do sistema *Ker A* é sensível ao calor. Para quantidades iguais de RNA total, o RNAm de *Ker A* foi muito mais baixo nas células de *Bacillus licheniformis* a 50°C comparado à 37°C. O mesmo pode estar ocorrendo com o *Bacillus amyloliquefaciens* utilizado neste estudo. Baixas concentrações de substrato (0,5 a 1% de penas) sob baixas temperaturas (26,5 a 29°C) resultaram em maior atividade queratinolítica.

Riffel et al., (2003) estudando *Chryseobacterium* sp. verificaram que esta bactéria apresentou temperatura ótima de crescimento de 30°C, no entanto, máxima atividade queratinolítica foi obtida a 25°C, (96 U/ml), após 48 horas de fermentação. Neste estudo, a concentração de substrato não foi relatada. Esses resultados correspondem com os obtidos com *Bacillus amyloliquefaciens*, uma vez que os melhores valores de atividade queratinolítica foram obtidos após 48 horas, sob uma temperatura de aproximadamente 27°C.

Cheng-gang et al., (2008) relataram que a temperatura ótima para produção de queratinase por *Bacillus subtilis* KD-N2 foi 23°C, sendo que nesta temperatura a maior atividade queratinolítica foi obtida após 30 horas de fermentação, a concentração de substrato utilizada foi de 1% de penas. Os autores afirmaram que, um aumento da temperatura de até 42°C resultou em uma redução rápida da

atividade queratinolítica, mas que *Bacillus* sp. geralmente apresenta temperatura ótima para produção de queratinase entre 30°C e 50°C.

Temperaturas próximas a 23°C e concentrações de substrato de até 1% foram condições de cultivo consideradas ótimas nos estudos realizados por Cheng-gang et al., 2007 e Casarin et al., 2008). O mesmo foi obtido no estudo com *Bacillus amyloliquefaciens*, como pode ser observado na Figura 15, em que melhores atividades queratinolíticas (400 U/mL) foram encontradas quando utilizadas baixas concentrações de substrato (entre 0,5 e 1% de penas) sob baixa temperatura (aproximadamente 27°C). No entanto, quando utilizadas concentrações superiores de penas, observa-se que micro-organismos queratinolíticos geralmente apresentam melhor crescimento celular e degradação de penas sob temperaturas mais altas (WILLIANS et al., 1999; ZAGHLOU et al., 1998; GRADISAR, 2000), o que pode ser uma explicação para a tendência de aumento da atividade queratinolítica em temperaturas acima 42°C com altas concentrações de penas, conforme observado na Figura 16. Há relatos na literatura de queratinases que possuem atividade queratinolítica entre 30°C e 85°C, com um valor ótimo entre 45°C e 65°C.

Um dos indícios de que a concentração de substrato no meio de cultura pode influenciar na temperatura ótima de atividade queratinolítica foi o estudo publicado por Zhang-Jun et al., (2009), neste estudo, verificou-se que a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* cultivada em meio contendo 2% de penas, apresentou alta atividade à 40°C.

Tatineni et al., (2007) realizaram um estudo com o objetivo de otimizar a produção de queratinase por *Streptomyces* sp. Os autores relataram que a temperatura ótima de cultivo para esta cepa foi 45°C, agitação de 300 rpm e concentração de substrato de 7%. Esses valores podem indicar que a tendência representada nas Figuras 3 e 4, de que temperaturas acima de 42°C podem produzir uma alta atividade queratinolítica se utilizada maiores concentrações de penas (no caso do gráfico, acima de 3,5 e obtendo até 200 U/ml, metade do valor máximo encontrado), para *Bacillus amyloliquefaciens* pode ter ocorrido o mesmo. Os autores completam que, a concentração de penas teve um grande efeito na produção de queratinase e que valores superiores a 7g/L podem causar inibição da produção de queratinase, com uma redução da degradação das penas, o que também já foi

verificado para *Bacillus* sp. (SUNTORNSUK e SUNTORNSUK 2003). Ademais, os valores encontrados por Tatiene et al., (2007) são comparáveis aos estudos realizados com *Kocuria rosea* (BERNAL et al., 2003), *Bacillus* sp. FK 46 (SUNTORNSUK e SUNTORNSUK, 2003) e *Streptomyces* sp. SK₁₋₀₂ (LETORNEAU, 1998).

As Figuras 18 e 19 apresentam a atividade queratinolítica em função da agitação e concentração de substrato.

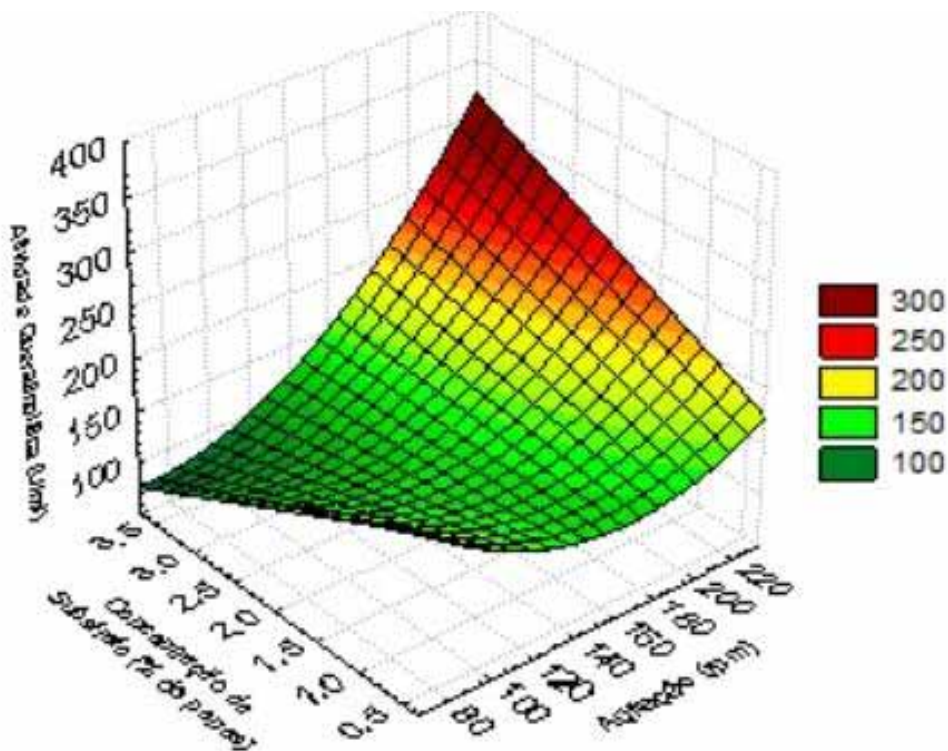


FIGURA 18: Gráfico de superfície de resposta para atividade queratinolítica em função da agitação e concentração de substrato

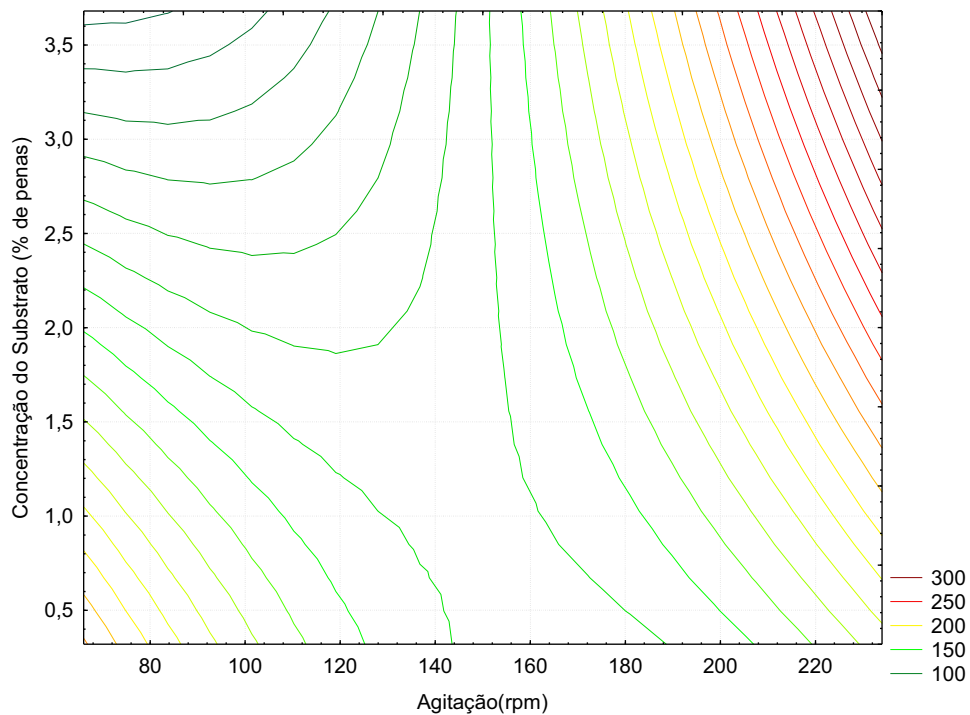


FIGURA 19: Curva de superfície de contorno para atividade queratinolítica observada em função da agitação e concentração de substrato

Nas Figuras 18 e 19 pode-se observar que os valores ótimos de atividade queratinolítica ocorreu quando utilizada uma concentração de substrato entre 3,0% e 3,68% e agitações entre 200 rpm a 234 rpm, apresentando atividade superior a 300 U/ml. Nota-se também que baixas concentrações de substrato (0,5% de penas) resultaram em melhor atividade queratinolítica sob baixas agitações (menores que 80 rpm). É provável que maiores concentrações de penas precisem de maior homogeneização para que o micro-organismo consiga entrar em contato com o substrato, permitindo sua degradação e aumento na atividade queratinolítica. Possivelmente, uma redução da velocidade de agitação também reduziria a quantidade de oxigênio dissolvido, uma vez que as penas impediriam sua passagem. Menores concentrações de substrato, no entanto, não impedem que o micro-organismo entre em contato com as penas e nem que reduza a quantidade de oxigênio dissolvido, uma alta agitação, ao contrário, poderia provocar lise celular das bactérias.

Casarin et al., (2008) estudando a bactéria *Chysoobacterium* sp. Kr6 e utilizando um planejamento fatorial com resposta em superfície observou um declínio na produção da enzima queratinase quando aumentada a concentração de penas. No entanto, seu modelo previu que houvesse um aumento na atividade queratinolítica com um aumento na quantidade de substrato. Eles concluíram que a redução da atividade queratinolítica com grandes quantidades de substrato foi devido a uma aeração inadequada, que resultou em um baixo crescimento microbiano. Ressalta-se que em seu estudo utilizou-se uma agitação de 125 rpm e com uma concentração máxima de substrato a 7%.

Wang e Shih (1999) verificaram o efeito negativo na atividade queratinolítica quando as cepas de *Bacillus subtilis* DB-104 e *Bacillus licheniformis* Kr6 foram cultivadas em alta concentração de oxigênio dissolvido e baixa concentração de penas (0,5% a 1%) para. Para ambas as bactérias, a produção de queratinase foi reduzida sob altas concentrações de oxigênio dissolvido, ou seja, de 20% (w/w). O mesmo pode ser verificado nas Figuras 18 e 19, em que baixas concentrações de substrato (de 0,5 a 1% de penas) resultaram em maiores atividade queratinolítica (200 U/ml) quando em baixa agitação (de 66 a 80 rpm).

Tatieni et al., (2007) estudando a cepa de *Streptomyces* sp. verificaram que as melhores condições de cultivo que resultaram em alta atividade queratinolítica foi quando utilizado 7% de penas como substrato e 300 rpm. Dessa forma, os resultados apresentados nas Figuras 18 e 19 confirmam a tendência apresentada nas Figuras 16 e 17 em relação à concentração de substrato, mostrando que maiores concentrações de substrato, sob maiores agitações e maiores temperaturas, assim como ocorreu com Tatieni et al., (2007) podem produzir maior atividade queratinolítica, uma vez que como apresentado nas Figuras 18 e 19 melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se maior concentração de penas no meio.

Suntornsuk e Suntornsuk (2003) e Refai et al., (2005) também observaram que um aumento na concentração de penas resultou em aumento da atividade queratinolítica produzida.

A agitação quando utilizada altas concentrações de substrato é fundamental. Suntornsuk e Suntornsuk (2003) explicaram que uma agitação maior promove uma maior taxa de oxigênio e melhor mistura entre as células e substrato, resultando em

uma maior degradação. No entanto, o aumento excessivo da agitação resulta em baixo crescimento celular, o que pode ser atribuído à possível danificação celular. Os valores ótimos para agitação devem ser definidos relacionando-se com a concentração de substrato utilizada.

Na análise seguinte, a variável dependente foi a concentração de proteínas no caldo fermentado, em que foram utilizados os maiores valores obtidos, ao final de 72 horas de fermentação. Estes foram colocados na matriz, conforme apresentado na Tabela 12, e assim determinou-se os valores preditos e observados, como pode-se observar na Figura 20.

TABELA 12 - Matriz de planejamento experimental (PCCR) com três variáveis e a variável dependente (concentração de proteínas)

Experimentos	Variáveis			Concentração de proteínas
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	2,479
2	-1	-1	1	3,319
3	-1	1	-1	2,688
4	-1	1	1	3,643
5	1	-1	-1	2,795
6	1	-1	1	3,453
7	1	1	-1	2,372
8	1	1	1	3,254
9	- α	0	0	3,575
10	α	0	0	3,240
11	0	- α	0	2,155
12	0	α	0	3,360
13	0	0	- α	2,072
14	0	0	α	3,897
15	0	0	0	3,405
16	0	0	0	3,135
17	0	0	0	2,886

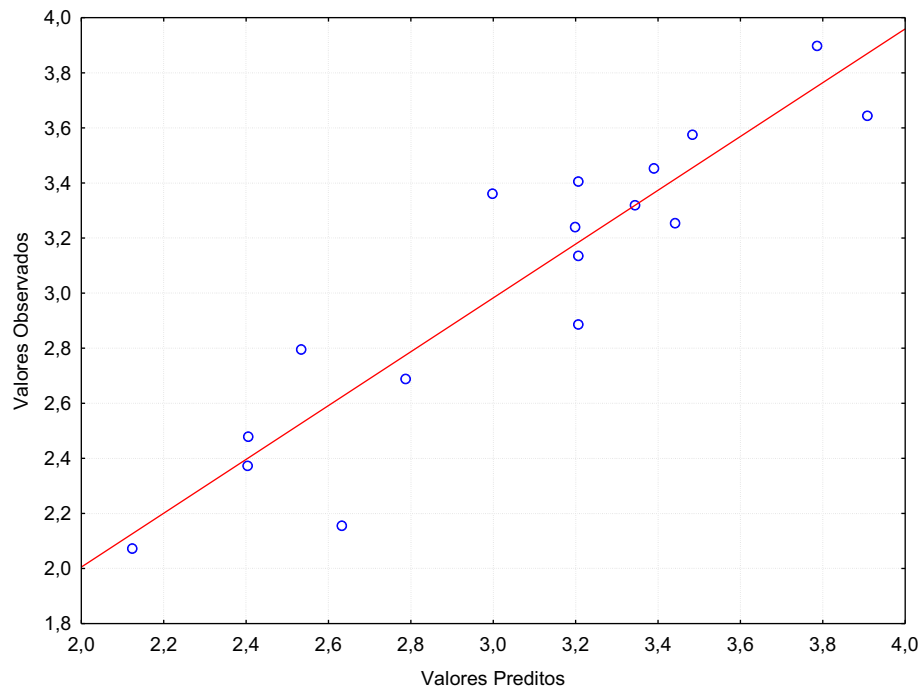


FIGURA 20: Valores preditos em função dos observados relativos à concentração de proteínas

Foram determinados os valores de p , a equação geral e a equação ajustada, contudo, ao contrário do que ocorreu com a atividade proteolítica e a queratinolítica, apenas a variável (X_3), obteve nível de significância inferior a 0,05. Dessa forma, apenas a concentração de substrato influenciou na concentração de proteína obtida. Assim, para melhor visualização dos resultados obtidos, optou-se pela análise a partir do gráfico de Pareto (Figura 21). Na Figura 21, observa-se que a variável que influenciou na concentração de proteína foi, X_3 . O sinal positivo desta variável significa que maiores concentrações de substrato promovem maiores concentrações de proteínas.

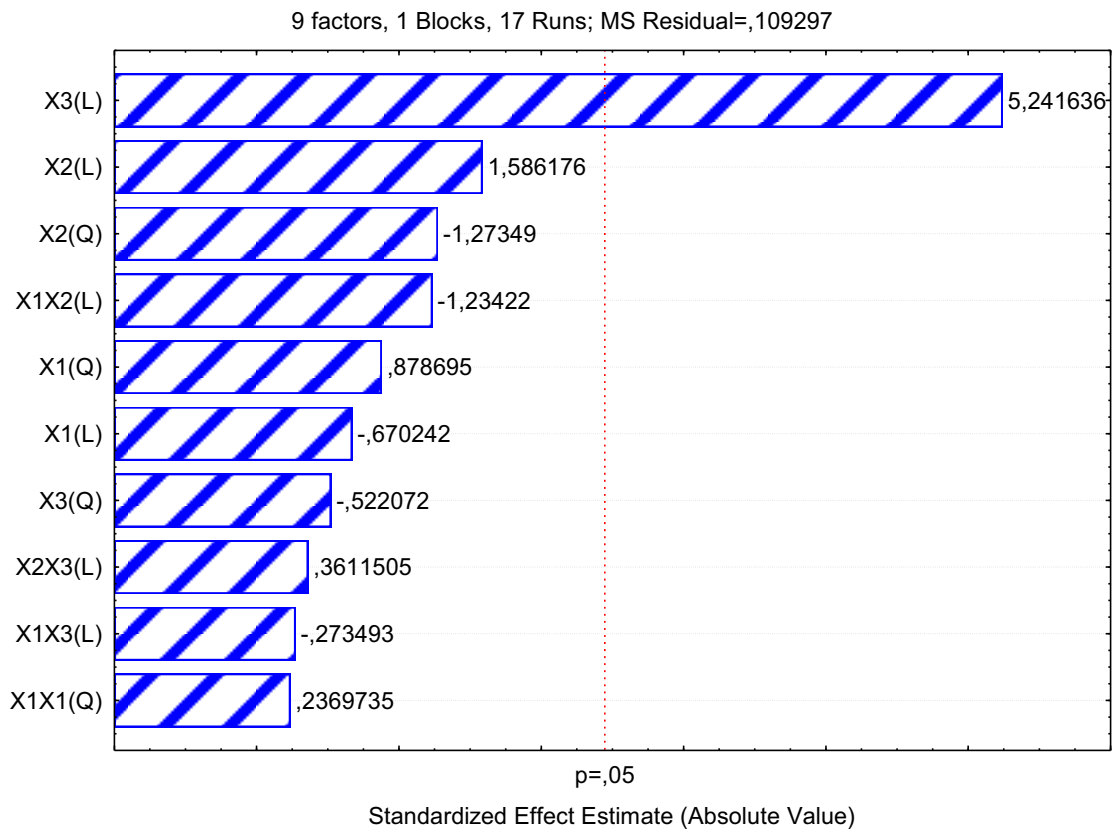


FIGURA 21: Diagrama de Pareto mostrando a contribuição das variáveis estudadas para a concentração de proteína

Uma vez que a queratinase é uma protease, ela tem um papel nutricional importante para os organismos, pois as proteases são responsáveis pela hidrólise de polipeptídeos a peptídeos menores e aminoácidos, viabilizando sua absorção pelas células (RAO et al., 1998).

Com o objetivo de avaliar a presença de aminoácidos no caldo fermentado, foi realizada uma análise dos mesmos por cromatografia em camada delgada. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 22.

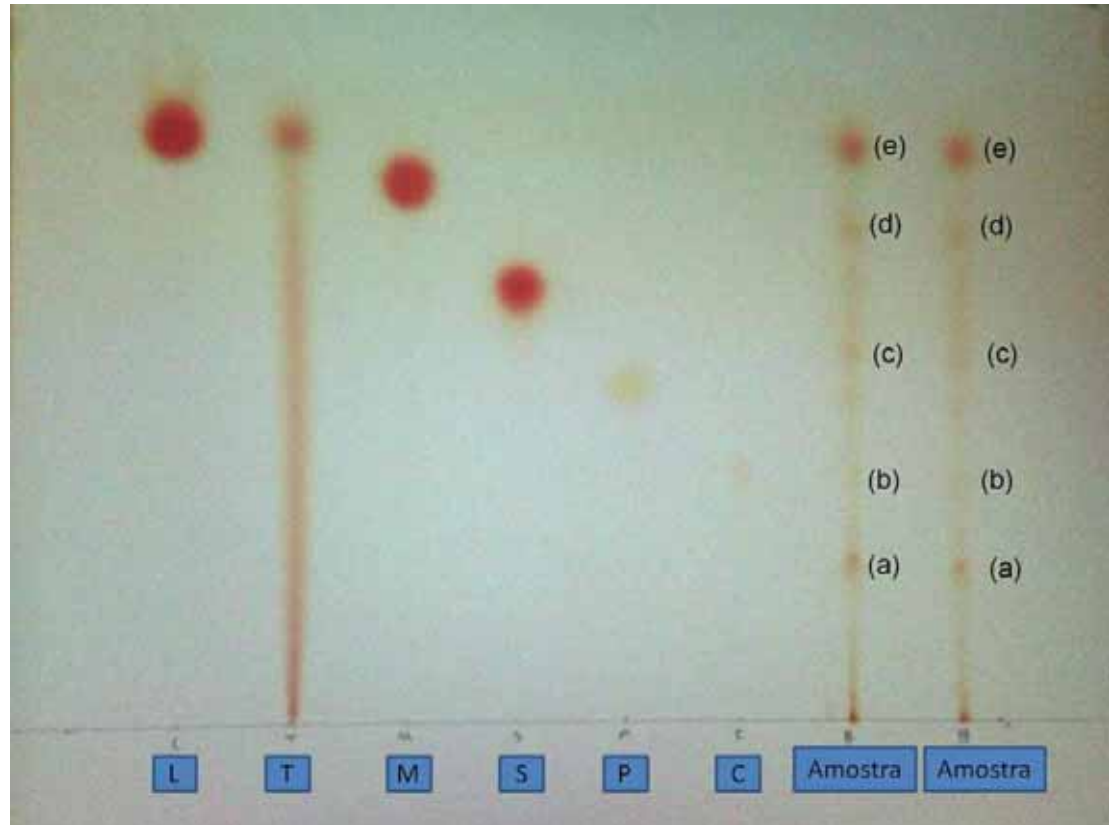


FIGURA 22: Cromatografia em camada delgada. L-) Leucina; T-) Tirosina; M-) Metionina; S-) Serina; P-) Prolina; C-) Cisteína; e Amostra.

A fim de determinar quais aminoácidos estavam presentes na amostra, calculou-se o fator de retenção (R_f), de acordo com a Fórmula 10 (COLLINS et al., 1993) e com a Tabela 13.

$$R_f = \text{distância (cm ou mm) percorrida pela substância} / \text{distância (cm ou mm) percorrida pela frente da fase móvel} \quad (10)$$

TABELA 13 - Valores de Rf (fator de retenção) encontrados na cromatografia em camada delgada, em que (a), (b), (c), (d), e (e) são os *spots* formados pela amostra

Amostra ou padrão	RF (fator de retenção)
G e H (a)	0,16
G e H (b)	0,32
G e H (c)	0,53
G e H (d)	0,69
G e H (e)	0,80
Leucina	0,76
Tirosina	0,81
Metionina	0,71
Serina	0,56
Prolina	0,38
Cisteína	0,33

Dessa forma, os resultados obtidos conforme apresentado na Tabela 13 evidenciam a presença no caldo fermentado de aminoácidos tais como cisteína, serina e metionina.

Não se pode afirmar pela Figura 20 e pelos valores de Rf apresentados na Tabela 13 se houve a liberação de tirosina ou leucina, uma vez que os spots ficaram muito próximos e, dessa forma, obtiveram valores de Rf muito próximos. No entanto, a presença de tirosina foi verificada no caldo de cultura de *Streptomyces thermoviolaceus*, no estudo realizado por Chitte et al., (1999).

A serina é um aminoácido raro e está presente na β -queratina de penas, uma vez que sua molécula consiste em uma longa seqüência de polipeptídeos que alternam resíduos de glicina, alanina e serina (GARRET e GRISHAM, 1995).

Nam et al., (2002), estudando a degradação de penas pela cepa termofílica *Fervidobacterium islandicum* AW-1 verificaram um aumento de aminoácidos livres, dentre eles cisteína, bem como outros nutricionalmente essenciais como metionina. Uma vez que metionina é raro em queratina de penas, os autores explicaram que este aminoácido provavelmente seria produzido como metabólito pela bactéria.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que liberação de aminoácidos evidenciados pela cromatografia em camada delgada no caldo da cultura de *Bacillus amyloliquefaciens* pode permitir a sua utilização no aproveitamento das penas nas indústrias de ração animal.

5 . CONCLUSÃO

- De acordo com o planejamento experimental, a concentração de substrato foi a única variável significativa ($p < 0,05$) para concentração de proteínas;
- Melhores concentrações de proteína no caldo fermentado foram obtidas quando o microrganismo foi cultivado a 35°C, 150rpm e 3,68% de penas;
- Menores concentrações de proteína foram obtidas com menores concentrações de substrato;
- Maior porcentagem de degradação de penas foi obtida quando a fermentação foi realizada à 30°C, 200 rpm e 3% de penas, menor degradação foi observada à 35°C, 66rpm, 2% de penas;
- As fermentações que proporcionaram maior crescimento microbiano foi a realizada a 30°C, 200 rpm e 3% de penas, enquanto a que resultou em baixo crescimento microbiano foi a realizada sob as condições de 35°C, 66 rpm, 2% de penas;
- Verificou-se que as fermentações que resultaram em maior degradação de penas foram aquelas que apresentaram maior crescimento microbiano, assim como aquelas que obteve-se menor degradação de penas apresentaram menor crescimento microbiano;
- A otimização da produção de queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens* permitiu determinar que as melhores condições para atividade queratinolítica foram as realizadas entre temperaturas de 26,6°C a 28°C, agitações em torno de 80 rpm e baixas concentrações de substrato (em torno de 0,5% de penas);
- De acordo com os gráficos de superfície de resposta e superfície de contorno realizadas para atividade queratinolítica, observou-se uma tendência de aumento da atividade queratinolítica sob temperaturas superiores a 42°C, agitações superiores a 220 rpm e concentração de substrato superiores a 3,5%;

- Serina, cisteína e metionina foram encontrados no caldo fermentado por *Bacillus amyloliquefaciens*, enquanto não se pôde determinar com certeza a presença de tirosina ou leucina, devido à proximidade dos spots e dos valores de Rf;
- A presença de aminoácidos no caldo de cultura permite a utilização de *Bacillus amyloliquefaciens* em processos de degradação de penas e utilização desse produto nas indústrias de ração animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLPRESS, J.D.; MOUNTAIN, G.; GOWLAND, P.C. Production, purification and characterization of an extracellular keratinase from *Lysobacter* NCIBM 9497. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 337-342, 2002.
- ANBU, P.; GOPINATH, A.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Purification of keratinase from poultry farm isolate – *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme and Microbiology and Technology**, v. 36, p.639-647, 2005.
- ANBU, P.; GOPINATH, A.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1298-1303, 2007.
- ATALO, K.; GASHE, B.A. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. **Biotechnology Letters**, v.15, p.1151-1156, 1993.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Estructural Biology**, v. 134, p. 95 – 102, 2001.
- BERNAL, C.; VIDAL, L.; VALDIVIESO, E.; COELLO, N. Keratinolytic activity of *Kocuria rosea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 255-261, 2003.
- BOCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MULLER, R. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, 1995.
- BRANDELLI, A. & RIFFEL, A. – Keratinolytic Bacteria isolated from feather waste – **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.395-399, 2006.
- 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.
- BUSSON, B.; ENGSTRON, P.; DOUCET, J; Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. **Journal of Synchrotron Radiation**, – v.6, p.1021-1030, 1999.
- CAO, Z.J.; ZHANG, Q.; WEI, D., CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X.; ZHOU, M. Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p.181-188, 2009.

CASARIN, F.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food Bioprocess Technology**, v.1, p.301-305, 2008.

CHENG-GANG, C.A.I., BING-GAN, L.O.U, XIAO-DONG, Z. Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Univ Sci B** v. 9, p. 60-67, 2008.

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

CHITTE, R.R.; NALAWADE,V..K.; DEY,S.- Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. **Letters in Applied Microbiology**, v.28:131-136, 1999

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

CORTEZI, M., CILLI, E.M., CONTIERO, J. *Bacillus amyloliquefaciens*: A new keratinolytic Feather-degrading Bateria. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.2, p.170-177, 2008.

CORTEZI, M., CONTIERO, J., MONTI, R. Characterization of a feather degrading by *Bacillus amyloliquefaciens* protease: a new strain. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, p. 648-656, 2008.

CORTEZI, M. Isolamento de microrganismos produtores de queratinase: **Estudo da biodegradação da queratina oriunda de penas de abatedouro de frangos**. 2009, 127 f. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2009.

ELMAYERGI, H.H., SMITH, R.E. Influence of growth of *Streptomyces fradiae* in pepsin-HCl digestibility and methionine content of feather meal. **Canadian Journal of Microbiology**, v.17, p. 1067-1072. 1971.

EI-REFAO, H.A.; ABDELNABY, M.A.; GABALLA, A.; EL-ARABY, M.H.; FATTAH, A.F.A. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. **Process Biochemistry**, v.40, p.2325-2332, 2005.

FARAG, A.M. & HASSAN, M.A. – Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Technology**, v.3, p.85-93, 2004.

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

GARRET, S.; GRISHAN C. M. Protein Folding and Tertiary Structure. **Biochemistry**. London: Saunders College Publ.Chap. v.5, p.159-168, 1995.

GEORGE,S.; RAJU, V.; KRISHNAN, M.R.V.; SUBRAMANIAN,T.V.; JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and it's application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, Oxon, v.30, n.5,p.457-462, 1995.

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

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; PANG, C.H.N. The genus *Bacillus*. **United States Department of Agriculture**. Washington, 1973.

GOUSTEROVA, A.; BRAIKOVA, D.; GOSHEV, I.; CHRISTOV, P.; TISHINOV, K.; VASILEVA-TOKONOVA, E.; HAERTLE, T.; NEDKOV, P. Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p. 335-340, 2005.

GRADISAR, H.; KERN, S.; FREDRICH, J. Keratinase of *Doratomyces microspores*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.196-200, 2000.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Genus Streptomyces**. In **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ath. Williams e Wilkins.p.675, 1994.

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**, Delaware, v.47, p.199 – 208, 2001.

IGNATOVA, Z.; GOUSTEROVA, A.; SPASSOV, G.; NEDKOV, P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. **Canadian Journal Microbiology**, v.45, p.217-222, 1999.

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

KUBO, M. e IMANAKA, T. Effect of cultivation temperature on thermophilic and mesophilic enzyme gene expression in *Bacillus subtilis*. **Journal Fermentation Biotechnology**, v. 71, p. 193-197, 1991.

KUMAR, C.G., TIWARI, M.P., JANY, K.D. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 441-449, 1998.

KUSHWAHA, R.K.S. The in vitro degradation of peacock feathers by some fungi. **Mykosen**, v.26, p.324-326, 1983.

LETOURNOU, F.; SOUSSOTTE, P.; BRESSOLLIER, P.; BRANLAND, P.; VERNOEUIL. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 77-80, 1998.

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

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

LOWRY, O.H; ROSEBRAUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 75, p.193-265, 1951.

LUCAS, P.S.; BROENNIMANN, L.; FEBBRARO, P.; HEEB, P. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microbial Ecology**, v. 45, p. 282-290, 2003

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. Physiological and nutritional factors affecting synthesis of extracellular metalloproteases by *Clostridium bifermentans* NCTC 2914. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1195-1200, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Bactérias gram-positivas filamentosas, com alto conteúdo de GC: *Streptomyces* e outros actinomicetos. Cap 12. In: **Microbiologia de Brock**. Ed Pearson. 10a Ed Prentice Hall, p.394 – 398 São Paulo, 2004.

MANCZINGER, I.; ROZS, M.; VAGVOLGYI, C.; KEVEI, F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **World Journal oh Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.35-39, 2003.

Mc DONALD, C. E.; CHEN, L.L. The Modification of the Folin Reagent for Determination of Proteinase Activity. **Analytical Biochemistry**, v. 10 p. 175-177, 1965.

MYERS, R.H. e MONTGOMERY, R.C. Response surface methodology: process ad product optimization using designed experiments, Wiley, 2002.

NAGAL, S. & JAIN, P.C. – Feather degradation by strains of *Bacillus* isolated from decomposing feathers. **Brazilian Journal of Microbiology** v.41, p.196-200, 2010.

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

NELSON, D.L. & COX, M.M. – Estrutura tridimensional de Proteínas – **Lehninger – Princípios de Bioquímica** – 3ª Ed., São Paulo, Ed. Sarvier, p. 132-133, 2002.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J. & BOND, J. S. (Ed). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. IRL Press, Oxford, p. 1-14, 1989.

NITISINPRASERT, S.; PORNWIRUN, W.; KEAWSOMPONG, S. Characterization of two bacterial strains and their synergism in feather degradation. **Natural Science**. Bangkok, v. 33, p. 191-199, 1999.

NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. **Microbiology Research**, v.46, p.308-340.

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

PAPADOPOPOULOS, M.C., EL 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 Technology**, v. 14, p.279-190, 1986.

PARRY, D.A.D. e NORTH, A.C.T. Hard α -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 p. 67-75, 1998.

PRIEST, F.G.; e SHARP, R.J. Fermentation of bacilli. **Fermentation Process Development of Industrial Organisms**, Neway JO ed., p. 73-132, 1989.

Projeções do Agronegócio Brasil 2008/2009 a 2018/2019. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Assessoria de Gestão Estratégica, 2009. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,1299841&_dad=portal&_schema=PORTAL>, acessado em: 27 de fevereiro de 2010.

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

RELATÓRIO ANUAL 2008/2009 ABEF. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>, acessado em 07 de agosto de 2010.

RIESSEN, S.; ANATRAKIAN, G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. Nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. **Extremophiles**, v. 5, n. 6, p. 399-408, 2001.

RIFFEL, A. **Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratonolítica**. 2006, 98 f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

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

ROZS, M.; MANCZINGER, L.; VAGVOLGYI, C.; KEVEI, F. Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.221-224, 2001.

SAFRANECK, W.W. & GOOS, R.I. Degradation of wool by saprophytic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.137-140, 1982.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R (editores). **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. In: cap. 16 Queratinases. BON, E.P.S.; VERMELHO, A.B.Ed. Legis Summa. Ribeirão Preto, 2004.

SANGALI, S.; BRANDELLI, Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 87, 17–24, 2000.

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

SARAVANAVHAVAN, S.; ARAVINDHAN, R.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.R.; NAUR, B.U.; RAMASAMI, T. A source reduction approach: integrated bio-based tanning methods and the role of enzyme in dehairing and fiber opening. **Clean Technology Environmental Policy**, v.7, p.3-14, 2004.

SCHIMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Engenharia Bioquímica**, 1ª Ed. São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda. 2001, v.2, cap. 14, p.277-285.

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

SHAWKEY, M. D.; PILLAI, S. R.; HILL, G. E. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather – degrading bacteria. **Journal of Avian Biology**, Copenhagen v. 34, p. 345 – 349, 2003.

SILVA, C.R.; DELATORRE, A.B.; MARTIM, M.L. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. And some properties of enzymatic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.253-258, 2007.

SINGH, C. J. Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 143, p. 147 – 150, 1999.

SHIH, J.C.H. Recent development in poultry waste digestion and feather utilization – a review. **Poultry Science**, v.72, p.1617-1620, 1993

SUH, H. J.; LEE, H. K. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 165-169, 2001.

SUNTORNUSUK, W; SUNTORNUSUK, L. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 239 – 243, 2003.

SUNTORNUSUK, W.; TONGJUN, J.; ONNIM, P.; OYAMA, H.; RATANAKANOKCHAI, K.; KUSAMRAN, T.; ODA, K. Purification and characterization of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1111-1117, 2005.

SZABO, I.; BENEDEK, A.; SZABO, I.M.; BARABAS, G. Feather degradation with a thermotolerant *Streptomyces graminofaciens* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, p. 253 – 255, 2000.

TATIENI, R.; DODDAPANENI, K.K.; POTUMARTHI, R.C.; MANGAMOORI, A.L.N. Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces* sp7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.141, p.187-201, 2007.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.R.; NAIR, B.U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. **Trends in Biotechnology**, v.22, p.181-188, 2004.

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

- WANG, J.J.; SHIH, J. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformes* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 608-616, 1999.
- WANG, J. J.; SWAISGOOD, H.E.; SHIH, J.C.H. Production and characterization of bio-immobilized keratinase in proteolysis and keratinolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, Raleigh, v.32, p. 812 – 819, 2003.
- WERLANG, P.O. e BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 120, p.71-79, 2005.
- WILLIAMS, C.M., RIECHTER, C.S., MCKENZI, J.M., SHIH J.C.J. – Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1509-1515, 1990.
- WILLIAMS, C. M.; LEE, C.G.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H. Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather – lysate, as a food protein. **Poultry Science**, Raleigh, v.70, p. 85 – 94, 1991.
- 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, p. 1138-1143, 2002.
- YAMAUCHI, K.; YAMAUCHI, A.; KUSUNOKI, T.; KHODA, A.; KONISHI, Y.; Preparation of stable aqueous solutions of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.31, p.439-444, 1996.
- YOUNG, R.A.; SMITH, R.E. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. **Canadian Journal Microbiology**, v.21, p.583-586, 1975.
- ZAGJLOUL, T.I.; AL-BAHRA, M.; AL-AZMEH, H. Recycling of keratin containing materials (chicken feather) through genetically engineered bacteria. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.70, p. 207-213, 1998.
- ZERDANI, I.; FAID, M.; MALKI, A. Feather wastes digestion by new isolated strains *Bacillus* sp. In Morocco. **African Journal of Biotechnology**, Casablanca, v.3, n.1, p.67-70, jan. 2004.