

ANA MARIA MAZOTTO DE ALMEIDA

**USO DE QUERATINASES PARA OBTENÇÃO DE
PEPTÍDEOS PARA RAÇÃO ANIMAL**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Alane Beatriz Vermelho



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
FEVEREIRO 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mazotto, Ana Maria

Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração animal/ Ana Maria Mazotto de Almeida - Rio de Janeiro, 2008.

xvii, 193

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, 2008.

Orientador: Alane Beatriz Vermelho e Sônia Couri

Referência bibliográficas: 177

1. Queratina 2. Queratinases 3. *Bacillus subtilis* AMR 4. Penas 5. Farinha de penas 6. Hidrolisado de queratina 7. Otimização 8. Ração I. Vermelho Alane Beatriz. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, mestrado em ciências Biológicas (Microbiologia). III. Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração animal

Ana Maria Mazotto de Almeida

Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração
animal

Rio de janeiro, 29 de fevereiro de 2008

Dra Alane Beatriz Vermelho (IMPPG/UFRJ)

Dra. Sônia Couri (CTAA/EMBRAPA)

Dr. André Luis Sousa Santos (IMPPG/UFRJ)

Dra. Monica Caramez Triches Damaso (UFRRJ)

Dra. Selma Soares Oliveira (IMPPG/UFRJ)

Dra. Marta Helena Branquinha de Sá (IMPPG/UFRJ)

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteases de Microrganismos do Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Professora Alane Beatriz Vermelho; e no laboratório de Processos Fermentativos, Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar (CTAA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) sob co-orientação da Dra Sônia Couri.

“Amai-vos mutuamente com afeição terna e fraternal. Adiantai-vos em honrar uns aos outros. Não relaxeis o vosso zelo. Sede fervorosos de espírito. Servi ao Senhor. Sede alegres na esperança, paciente na tribulação e perseverantes na oração.”

Romanos 12; 9-13

“Sê o que quiseres, mas procura sê-lo totalmente.”

Goethe

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por minha vida e tudo e todas que fazem parte dela. Também a Nossa Senhora da Rosa Mística, cuja presença se faz palpável em minha vida.
- À minha mãe, **Rose**, pelo amor e dedicação com que cuidou e ainda cuida de mim. Agradeço a meu pai, **Antônio**, pelo apoio e momentos de descontração. A minha irmã, **Ana Carolina**, pela alegria, incentivo, risadas e brigas, amizade e afeto. Amo muito vocês.
- À professora **Alane Beatriz Vermelho**, por ter me apresentado à pesquisa científica e ao projeto das queratinases, pelos conselhos, apoio, pela liberdade de pensamento e criação, pelo exemplo de perseverança e força de vontade. Você me ensinou a dar os primeiros passos na vida científica, e isso significa muito para mim. Obrigada.
- À **Sônia Couri**, por ter aberto as portas de seu laboratório para nós, por ter me ensinado planejamento experimental, pelas sugestões ótimas, por ter dado a oportunidade de trabalhar com as linhagens de *Aspergillus niger*, até então só tinha experiência com bactérias.
- À professora **Marta Helena Branquinha**, pela paciência e compreensão, pelos ensinamentos práticos.
- Ao **Dr. José Luis Ascheri** pela ajuda com a extrusão.
- À **Sabrina Cedrola**, por toda a ajuda, apoio, por compartilhar comigo o carinho pelo projeto queratinase e pela coleção de *Bacillus*, por todos os protocolos que testamos juntas, por partilhar os experimentos apressados e estresse com prazos (você sabe). Vi você crescer e hoje me orgulho de te ver tão independente.

- À **Ana Cristina Nogueira de Melo**, pela amizade, ensinamentos, paciência, conselhos e por não reclamar do cheiro da BAM (*Bacillus subtilis* AMR).
- À **Flávia Vieira**, minha precursora no projeto das queratinases, agradeço pelos ensinamentos práticos.
- Às minhas amigas de sempre, em especial **Gabriella Mendes** (ela tem que ser a primeira!), **Karen Tavares** e **Cinthia L. Serrano**, por me ouvirem, apoiarem, emprestarem o ombro e por vibrar por minhas alegrias. À Gaby agradeço pelo companheirismo, à Cinthia pela amizade que resiste a distância, e a Karen pela paciência e por tentar me fazer sair de casa.
- À **Ana Lúcia Vazquez-Villa**, **Edilma P. de Souza** e **Thalita Duarte**, que junto comigo e Sabrina, e agora com a **Fabíola Lacerda** e **Ana Carolina Mazotto de Almeida**, formam uma equipe linda e harmoniosa (na maior parte do tempo). O projeto das queratinases avança para rumos tão diversos e com sucesso graça a todas nós. As meninas novas no projeto mostrarão em breve seu valor, afinal somos todas vencedoras. Carol e Fabíola, tenho muitas esperanças em vocês, contem comigo.
- A **Barbara G.B.P Lopes**, pela amizade e apoio, pela confiança e doces compartilhados. Também à **Ingrid**, pela tranquilidade e solidariedade, sempre oferecendo ajuda.
- À **Denise**, nossa técnica chique de doer, que é gente quase boa, pela alegria contagiante, pelo infalível ouvido musical, pelo apoio, pelos tubinhos lavados (e foram muitos).
- Ao **Leon Rabinovitch** e à **Jeane Quintanilha** Chaves pela identificação dos *Bacillus*.
- À **Selma**, **Ana Carolina**, **Júlio César** e **Mônica Damaso** (Embrapa), por terem me acolhido no laboratório e me ajudado.

- À professora **Maria Helena da Silva**, por ser solícita quando tive dúvidas e por permitir o uso da centrífuga.
- À todos que direta ou indiretamente contribuíram para as escolhas que fiz, todos os professores, amigos e parentes. Sou muito grata a todos que me ensinaram alguma coisa que pudesse levar na vida profissional e pessoal.
- À indústria avícola Rica, em especial ao **Marcos Fábio Lima**, pela doação de farinha de penas.
- As agências financiadoras deste estudo: Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível superior (**CAPES**), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**MCT/CNPq**), Conselho de Ensino para Graduados e Pesquisas (**CEPG/UFRJ**), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (**FAPERJ**) e a Fundação Universitária José Bonifácio (**FUJB**)

RESUMO

Ana Maria Mazotto de Almeida

Uso de queratinases para obtenção de peptídeos para ração animal

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

A indústria avícola produz milhões de toneladas de penas de frango, um subproduto rico em queratina (90%). Com a ajuda das queratinases, este resíduo agro-industrial pode ser usado como uma fonte de aminoácidos e aplicado em ração animal.

Oito bactérias, isoladas da indústria avícola, identificadas como *B. subtilis* AMR, *B. subtilis* FP4E, *B. subtilis* PP3, *B. subtilis* SLC, *B. subtilis* FP4C, *B. licheniformis* ABV, *B. licheniformis* B1 e *B. cereus* B2, foram avaliados quanto à produção de queratinases em meio com penas ou farinha de penas. Todas as cepas de *Bacillus* produziram peptidases e queratinases com massa molecular entre ~13,8 a ~140 kDa inibidas por PMSF. *B. subtilis* AMR exibiu a maior atividade enzimática. O objetivo deste trabalho foi otimizar o meio de fermentação de *Bacillus subtilis* AMR.

O meio usado para a preparação de inóculo não afetou a produção de queratinases e proteínas. A produção de queratinases foi baixa na ausência de queratina, indicando sua natureza indutível. Fontes exógenas de açúcar aumentaram a produção de queratinase em especial sacarose. Um delineamento experimental 2^3 foi utilizado para otimizar as condições de produção enzimática por metodologia de superfície de resposta (MSR). Foi observado que CuSO_4 suprime a atividade queratinolítica e o crescimento, enquanto que CaCl_2 , MnCl_2 e MgSO_4 aumentou. Máxima produção de queratinase ocorreu quando a cultura de *Bacillus subtilis* AMR

foi incubada a temperatura ambiente, com 1,5% de penas e 10^8 UFC/ml. A síntese de queratinases foi estimulada pela presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KNO_3 nas concentrações de 0,8 e 1%, respectivamente, mas ambos reduziram a concentração de proteínas e degradação de penas. Foi obtida 100% de degradação de penas. A máxima atividade de queratinase e gelatinase e concentração de penas foram alcançadas na fase estacionária de longa duração do *B. subtilis* AMR. A produção ótima de queratinase em meio farinha de penas foi obtida em pH 7,0 e com 2% de farinha de penas. A adição de uma fonte suplementar de carbono não afetou significativamente a produção da enzima.

Para verificar a possibilidade do sobrenadante de cultura do *B. subtilis* AMR ser usado em ração animal, um processo de extrusão foi realizado com farinha de milho, e nossos resultados mostraram que uma ração foi obtida com 26% de umidade correspondendo ao sobrenadante de cultura.

O rendimento de degradação de penas de frango pelas enzimas de cultura de *B. subtilis* AMR foi de 13% após 4 dias de reação, mas o extrato enzimático degradou efetivamente farinha de penas (42%). A maior concentração de proteínas na mistura de reação foi 16,67 mg/ml em 3 dias quando a mistura continha 5% de farinha de penas. Penas e farinha de penas tratadas enzimaticamente apresentaram baixa digestibilidade.

Nossos resultados apontam para o potencial uso de *B. subtilis* AMR queratinolítico em processos industriais envolvendo a hidrólise de queratina para alimentação animal.

Palavras-chave: queratina; queratinases, *Bacillus subtilis* AMR, penas, farinha de penas, hidrolisado de queratina, otimização, ração

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2008

ABSTRACT

Ana Maria Mazotto de Almeida

Use of keratinase to obtain peptides to animal feed

Orientador: Alane Beatriz Vermelho

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

The poultry-processing industry produces several million of tons of chicken feather as a keratin-rich (90%) by-product. With the help of keratinases, this agro-industrial residue could be used as a source of valuable amino acids and applied in animal feed.

Eight bacteria, isolated from poultry industry, were identified as *B. subtilis* AMR, *B. subtilis* FP4E, *B. subtilis* PP3, *B. subtilis* SLC, *B. subtilis* FP4C, *B. licheniformis* ABV, *B. licheniformis* B1 and *B. cereus* B2. They were screened for production of keratinases on feathers or feather meal media. All the *Bacillus* strains produced peptidases and peptidases with molecular mass in a range of ~ 13,8 to ~140 kDa. These peptidases were inhibited by PMSF. *B. subtilis* AMR exhibited the highest enzymatic activity. The aim of this study was to optimize the fermentation medium of *Bacillus subtilis* AMR.

The medium used to the inoculum preparation did not affect the keratinases and protein production. Keratinases were poorly produced in the absence of keratin, indicating its inducible nature. Exogenous sugar sources increased keratinase production, principally sucrose. A 2³ factorial design was performed with the aim of optimizing the conditions for enzyme production by response surface methodology (RSM). CuSO₄ suppresses keratinolytic activity and growth, whereas CaCl₂, MnCl₂ and MgSO₄ increased this. Maximum production of keratinase occurred when the

culture of *Bacillus subtilis* AMR was incubated at room temperature, with 1.5% feather and 10^8 CFU/ml. The keratinase synthesis was improved by the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KNO_3 at 0.8 and 1%, respectively, but both reduced the concentration of proteins and degradation of feather. The total feather degradation was obtained. Maximum keratinase and gelatinase activity and protein concentration were reached in long-term stationary phase by *B. subtilis* AMR. Optimum keratinase production in feather meal medium was reached at pH 7,0 and 2% feather meal. The addition of supplementary carbon source did not have significant effect on keratinase production.

In order to verify the possibility of *B. subtilis* AMR supernatant culture be used in animal feed, an extrusion process was done with corn flour and our results showed that a feed was obtained with 26% of humidity corresponding to the culture supernatant.

The degradation rate of chicken feather by enzymes of *B. subtilis* AMR was 13% after 4 days of reaction, but the same enzymatic extract effectively degraded feather meal (42 %). The highest protein concentration in reaction mixture was 16.67 mg/ml at 3 days in mixture containing 5% feather meal. Feather and feather meal enzymatically treated showed low digestibility.

Ours results point to the potential use of the keratinolytic *B. subtilis* AMR in industrial processes related to keratin hydrolysis for animal feed.

Palavras-chave: keratin, keratinases, *Bacillus subtilis* AMR, feather, feather meal, keratin hydrolyzed, optimization, feed

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2008

ÍNDICE

I. Introdução	1
1.1. Produção brasileira de frangos.....	2
1.2. Queratinas.....	3
1.2.1. Penas de frango: β -queratina	5
1.2.2. Farinha de penas.....	11
1.3. Peptidases.....	17
1.4. Queratinases.....	21
1.5. Microrganismos queratinolíticos.....	23
1.6. Aplicação das queratinases em ração animal.....	28
1.7. Exigências nutricionais de aves.....	31
1.8. Aplicações industriais das queratinases.....	35
II. Objetivos	38
III. Material e Métodos	42
3.1. Substratos usados em meios de cultura: penas e farinha de penas.....	43
3.2. Obtenção de queratina em pó a partir de penas de frango.....	43
3.3. Identificação e seleção da atividade queratinolítica de microrganismos da coleção de microrganismos queratinolíticos	44
3.4. Identificação dos microrganismos queratinolíticos.....	46
3.5. Análises quantitativas.....	46
3.5.1. Dosagem da atividade queratinolítica.....	46
3.5.2. Dosagem da atividade gelatinolítica.....	47
3.5.3. Dosagem de proteínas.....	47
3.6. Análises qualitativas.....	47

3.6.1. Zimografia com substrato gelatina e queratina.....	47
3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.....	48
3.6.3. Enzimografia.....	49
3.7. Identificação da classe enzimática das peptidases e queratinases dos microrganismos queratinolíticos.....	49
3.8. Efeito do meio de propagação de células na produção de queratinases no meio de fermentação (ativação de inóculo).....	50
3.9. Otimização da produção de queratinases em penas.....	51
3.9.1. Estudo da influência de fontes suplementares de carbono na produção de queratinase e conseqüente degradação de penas.....	52
3.9.2. Estudo da influência de sais na produção de queratinase e conseqüente degradação de penas.....	52
3.9.3. Estudo da influência da temperatura, do inóculo e da concentração de penas na produção de queratinase.....	54
3.9.4. Estudo da influência de fonte de nitrogênio suplementar na produção de queratinase.....	54
3.10. Cinética de crescimento de <i>B. subtilis</i> AMR em condições otimizadas.....	55
3.11. Otimização da produção de queratinases em farinha de penas.....	55
3.11.1. Efeito do pH na atividade queratinolítica e degradação de farinha de penas.....	56
3.11.2. Efeito de fontes suplementares de carbono na produção de queratinase.....	56
3.11.3. Efeito da concentração de farinha de penas na degradação do substrato e atividade queratinolítica.....	57
3.11.4. Efeito da concentração de farinha e sacarose na produção de queratinase.....	57

3.12. Extrusão termoplasmática.....	58
3.13. Caracterização dos produtos obtidos por extrusão quanto às suas propriedades físicas e químicas.....	59
3.14. Degradação enzimática da farinha de penas.....	59
3.15. Determinação da digestibilidade <i>in vitro</i>	60
IV.Resultados.....	61
4.1. Identificação dos microrganismos queratinolíticos.....	62
4.2. Seleção dos microrganismos queratinolíticos quanto à produção de queratinases em meio contendo penas e farinha de penas	66
4.3. Efeito dos meios de propagação do inóculo	76
4.4 Otimização da produção de queratinases em penas.....	80
4.4.1. Efeito da fonte suplementar de carbono sobre a produção de queratinase, concentração de proteínas e na degradação de penas.....	80
4.4.2. Estudo da influência de sais sobre produção de queratinases por <i>Bacillus subtilis</i> AMR em penas.....	85
4.4.3. Estudo da influência de temperatura, do inóculo e da concentração de penas na produção de queratinases.....	114
4.4.4. Estudo da influência de fonte de nitrogênio suplementar na produção de queratinases.....	125
4.4.5. Cinética de crescimento na presença de penas em condições otimizadas.....	128
4.5. Otimização da produção de queratinases em farinha de penas.....	132
4.5.1. Efeito do pH na produção de queratinases e degradação de farinha de penas.....	132
4.5.2. Efeito da concentração de farinha de penas na degradação do substrato e produção de queratinases.....	135

4.5.3. Efeito de fontes suplementares de carbono na produção de queratinase.....	137
4.5.4. Efeito da concentração de farinha e sacarose na produção queratinases.....	140
4.6. Extrusão termoplasmática e caracterização dos produtos obtidos por extrusão.....	142
4.7. Degradação enzimática de penas e farinha de penas e determinação da digestibilidade <i>in vitro</i>	144
V. Discussão.....	148
VI. Conclusão.....	173
VII. Referências bibliográficas.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Soro albumina Bovina
Da	Dalton
DFP	Diisopropilfluorofosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
E-64	<i>L-trans</i> -epoxisuccinil L-leucilamida-(4-guanidino)-butano
EC	Classe enzimática
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis-(β - amino-etil éter) N, N'-tetracético
kDa	KiloDalton
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamina contendo SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
UFC	Unidade formadora de colônia

I.INTRODUÇÃO

1.1. Produção brasileira de frangos

Nos últimos anos, o Brasil apresentou desenvolvimento significativo na avicultura, notadamente na produção de frango de corte (Scapim *et al.*, 2003). Atualmente, o Brasil é o maior exportador de frangos do mundo e o terceiro maior produtor, atrás dos Estados Unidos e China, respectivamente. Em 2007 (dados da APINCO - Associação Brasileira dos Produtores de Pintos de Corte), foram abatidos 10,2 milhões de toneladas de frangos. Espera-se que as exportações subam 30,7% até 2015 (comparado com 2005, melhor ano do setor), favorecidas pela crise da influenza aviária na Europa e Ásia (www.avisite.com.br). Em decorrência da expansão da avicultura industrial, verificou-se um expressivo aumento na demanda de matérias-primas para a produção de ração. Simultaneamente, um aumento crescente na produção de resíduos, das partes não-comestíveis das aves, representados por penas, vísceras abdominais, sangue e carcaças condenadas tem ocorrido (Scapim *et al.*, 2003).

O crescimento do consumo de frangos tem levado ao aumento da preocupação de o que fazer com os resíduos gerados pela criação de aves para o abate em escala industrial. O rendimento em carne dos animais de abate oscila entre 34 e 52% de seu peso total. Isto significa que o abate comercial de animais para a produção de carne gera uma grande quantidade de resíduos agroindustriais. O aproveitamento, reciclagem e reutilização desses subprodutos são de grande interesse para a indústria, sob o ponto de vista nutritivo e funcional. A gestão adequada dessas matérias ajuda a minimizar o impacto das indústrias cárneas sobre o meio ambiente (Garcia *et al.*, 2003).

Quanto ao aproveitamento dos subprodutos da criação de aves, apenas a cama de frango está restringida no Brasil por tempo indeterminado para formulação de rações. Cama de frango é o nome dado a todo o resíduo coletado no recinto de

criação, consistindo de excretas das aves, material absorvente usado como cama, e em menor quantidade de outros materiais como ração das aves, penas, material do piso do aviário, entre outras. O material absorvente é bastante variável, sendo os mais comuns a serragem de madeira e a casca de arroz e, com menor frequência, casca de amendoim, palhas em geral e sabugo de milho picado (www.aviculturaindustrial.com.br).

A indústria avícola tem nas penas um dos seus principais subprodutos, considerando o fato de que 5 a 7% do peso total do frango são penas (Onifade *et al.*, 1998). As plantas processadoras de frangos produziram, em 2007, aproximadamente 700 mil toneladas de penas, as quais são constituídas praticamente de queratina pura (90%), sendo a queratina responsável pelo alto grau de recalcitrância deste resíduo da indústria avícola (Allpress, Mountain & Gowland, 2002).

O descarte de penas representa um problema ambiental, uma vez que sua degradação é lenta, levando ao seu acúmulo no meio ambiente (Gupta & Ramnani, 2006), além de liberar compostos sulfurados com odor extremamente desagradável. Contudo, elas podem ser utilizadas para a fabricação da farinha de penas. No entanto, é preciso que seja utilizada de forma criteriosa para não causar efeitos indesejáveis para as aves (Santos *et al.*, 2006).

1.2. Queratinas

As queratinas são proteínas estruturais fibrosas e insolúveis que fazem parte do tecido epidérmico e seus anexos, sendo a principal constituinte de penas, lã, escamas, cabelos, pele, cascos e unhas (Vignardet *et al.*, 2001). São proteínas que apresentam estabilidade mecânica e não são degradadas por peptidases pouco específicas como papaína, pepsina e tripsina (Ignatova *et al.* 1999). A estrutura

estável e rígida deve-se à presença de alto teor de unidades de cistina formando pontes dissulfeto intra- e inter-cadeia. A formação destas pontes ocorre pela oxidação dos grupos SH de duas moléculas de cisteínas, que podem tomar parte de cadeias polipeptídicas adjacentes. Além dessas pontes também há a presença de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas, dentre outras interações, que resultam na estabilização da molécula. Devido à grande quantidade de pontes dissulfeto e de aminoácidos hidrofóbicos, as queratinas são insolúveis em solventes polares, como a água, assim como em solventes apolares (Schrooyen *et al.*, 2001).

Quanto à conformação estrutural, as queratinas podem ser classificadas em α -queratina e β -queratina. Na α -queratina predominam segmentos em α -hélice, formando uma estrutura bastante rígida (Vignardet *et al.*, 2001). Ela é assim chamada para diferenciar das queratinas encontradas nas penas das aves, garras, bicos e escamas (β -queratina) que têm origem evolucionária e estrutura molecular totalmente diferente. Já na β -queratina, observada apenas em aves e répteis, predominam os segmentos na forma β -pregueada (Gupta & Ramnani, 2006). As interações entre os filamentos determinam as propriedades estruturais e mecânicas dos polímeros de queratina (Yamada, Wirtz & Coulombe, 2002). As α -queratinas (40-70 kDa) são conhecidas como as principais proteínas estruturais das células epiteliais (Yamada, Wirtz & Coulombe, 2002), pertencem à superfamília dos filamentos intermediários e são encontradas em cabelos, unhas e pêlos e compõem o citoesqueleto de células epiteliais. A β -queratina será descrita com mais detalhes adiante.

As queratinas podem ser classificadas em macias e duras dependendo do seu teor de cisteína. O termo queratina dura tem sido usado para descrever as proteínas fibrosas dos apêndices epidérmicos e possui um teor de cisteína maior, enquanto a queratina macia é usada para denominar as proteínas fibrosas da epiderme

(Vignardet *et al.*, 2001; Gupta & Ramnani, 2006). Estas possuem um teor de cisteína de 3% e de glicina de 12%, enquanto as do tipo duro, presentes nos cabelos e unhas, possuem um teor mais alto de cisteína (7%) e mais baixo de glicina (Fraser, Macrae & Roger, 1972).

1.2.1. Penas de frango: β -queratina

A principal proteína encontrada nas penas é a β -queratina (11-14,5 kDa). Na estrutura da β -queratina há a presença de segmentos com conformação em α -hélice e β -pregueada estabelecidas por pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio (figura 2), sendo a folha β -pregueada mais importante (Brush, 1996).

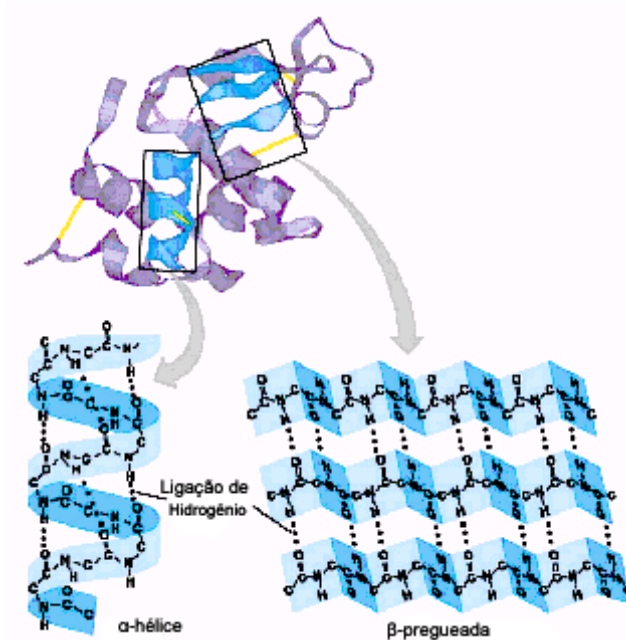


Figura 2: Conformação estrutural da β -queratina (retirado do site www.kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/proteins.htm em 05/12/2006)

A composição química e de aminoácidos da pena são mostradas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Composição química das penas em g.kg⁻¹ (Dalev, 2000).

Componente	Concentração em g.kg ⁻¹
Proteína (queratina)	894,0
Lipídeos	14,1
Água	49,5
Ca	3,5
P	1,3
Na	4,0
Cl	8,0

Tabela 2: Composição de aminoácidos de pena em g.kg⁻¹ (Dalev, 2000).

Aminoácido	Pena	Aminoácido	Pena	Aminoácido	Pena
Ala	56,6	His	14,4	Phe	52,2
Arg	67,4	Ile	49,2	Pro	90,8
Cys	46,1	Val	76,1	Ser	114,4
Glu	102,5	Leu	84,3	Thr	48,9
Gly	76,6	Lys	22,5	Tyr	24,1

Os monômeros de β -queratina têm sempre a mesma forma, mas seu tamanho é variável. Esta diferença de tamanho dos monômeros é tecido-específica (se queratina de penas, escamas, garras ou bico) e produzida por um tripeptídeo inserido na cadeia que é encontrado repetidamente (os três aminoácidos são glicina, glicina e o terceiro pode ser prolina, leucina ou tirosina). Este peptídeo está

presente em outras estruturas epiteliais das aves, não apenas nas penas (Brush, 1996; Fraser & Parry, 1996).

Os microfilamentos são formados pela associação linear dos monômeros, que se dá espontaneamente quando os monômeros são convertidos do estado inativo para o estado associativo. Os microfilamentos formam o filamento, dobrando-se quatro vezes em seu eixo. Os filamentos são as unidades estruturais.

As fibras são formadas pela associação linear dos filamentos, altamente orientados no espaço. A matriz interfibra é formada pela parte globular do monômero. Todos os monômeros de queratina de penas têm a mesma configuração: a parte central β -pregueada é flanqueada por dois braços globulares, ricos em cisteína, onde estão todos os sítios de aminoácidos substituíveis responsáveis pela diversidade monomérica. As pontes dissulfeto participam da formação do filamento e na sua estabilização. Além disso, o alto teor de pontes dissulfeto favorece a insolubilidade (Brush, 1996).

Folículos de diferentes locais na ave produzem penas de diferentes formatos, tamanhos e padrões de pigmentos, (Getty, 1981; Brush, 1996). As penas são estruturas altamente ordenadas e hierarquicamente ramificadas, apresentando três níveis de ramificação (de raque a barba, de barba a bárbula, de bárbula a cílios). As penas podem se desenvolver dentro de uma variedade de formas, incluindo penugem, penas de contorno, ou penas de vôo, como mostrada na figura 3 (Yu *et al.*, 2002).

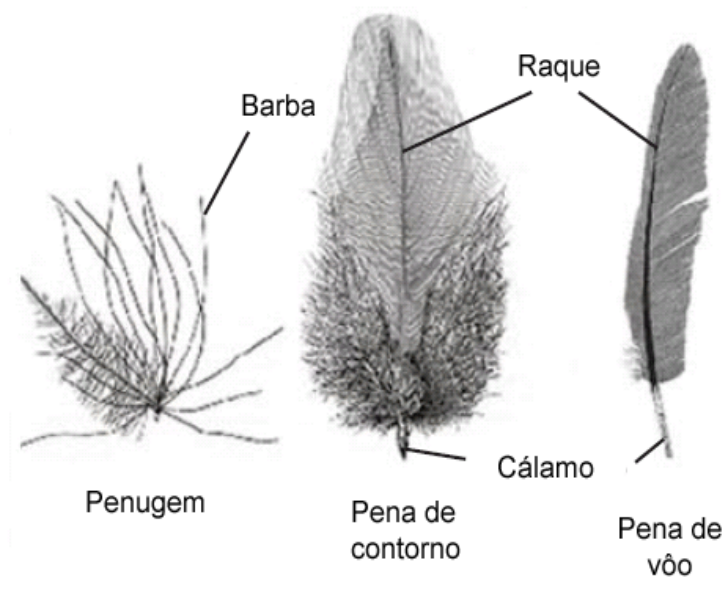


Figura 3: Diferentes tipos de penas de frango (Yu *et al.*, 2002).

As penas de contorno dão formato à ave e variam muito em relação ao tamanho. Uma característica comum a todas as penas de contorno é um vexilo plano, em cada lado do eixo (figura 4A). O eixo de todos os tipos de penas é composto por cálamio e raque. O cálamio é a parte do eixo dentro do folículo da pena; o restante do eixo é o raque. O cálamio tem uma abertura em cada extremidade, o umbigo inferior que contém as papilas dérmicas, e o umbigo superior. Duas partes da pena surgem da margem do umbigo superior, a pena principal e pena posterior ou secundária, que é menor, como mostrado na figura 4B (Getty, 1981).

As barbas são estruturas que se projetam para fora e distalmente de cada lado da raque e delas partem as bárbulas. Das bárbulas projetam-se as barbículas, em cuja ponta encontram-se os cílios, estruturas semelhantes a ganchos que se prendem a sulcos presentes nas bárbulas proximais (Knox, 1980). A pena principal

possui uma parte plumácea e uma penácea (Getty, 1981), cuja diferença consiste na presença de cílios na parte penácea (figura 4B).

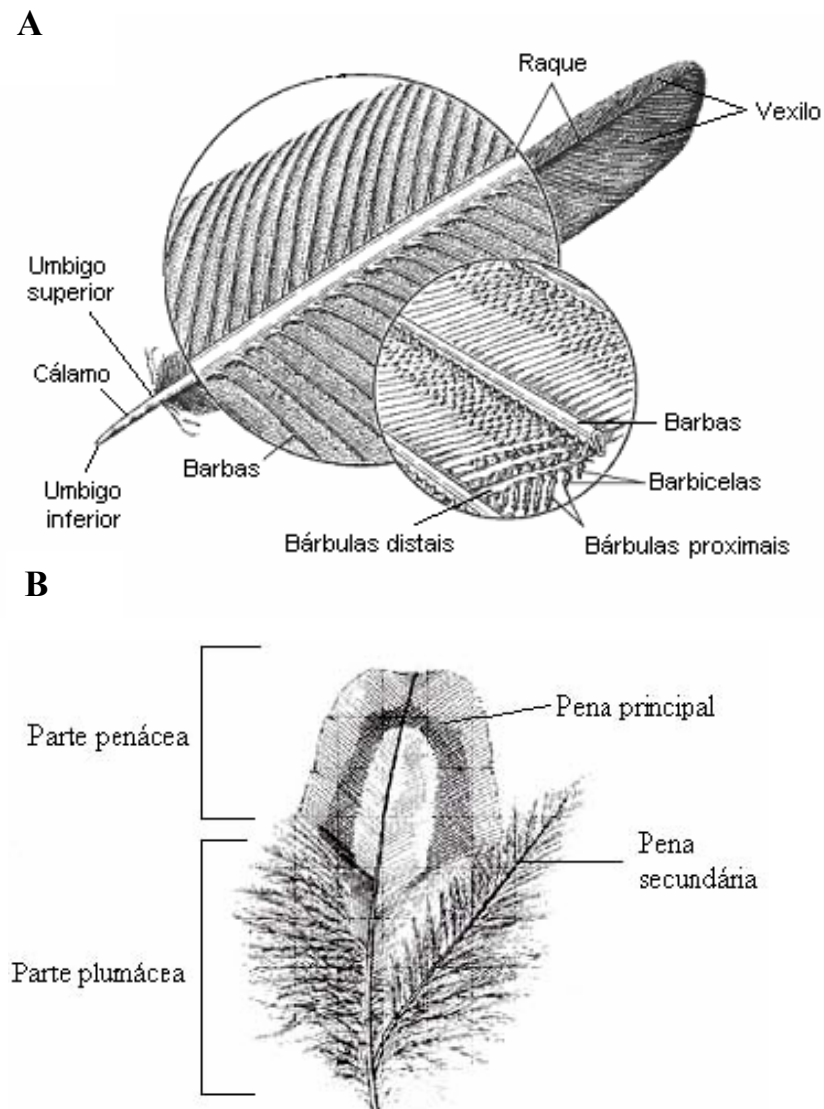


Figura 4: Morfologia da pena. (A - retirado de <http://www.birdwatching-bliss.com/bird-feathers.html>. em 02/10/2005; B - retirado de Getty, 1981).

Bárbulas, barbas, cálamo e raque são completamente queratinizados e formados de β -queratina (Alibardi & Sawyer, 2006). A figura 5 mostra uma seção

longitudinal e transversal, respectivamente, de bárbulas de pena embrionária tratada com anticorpo anti- β -queratina marcado com fluorescência, revelando os filamentos de queratina (Alibardi & Sawyer, 2006).

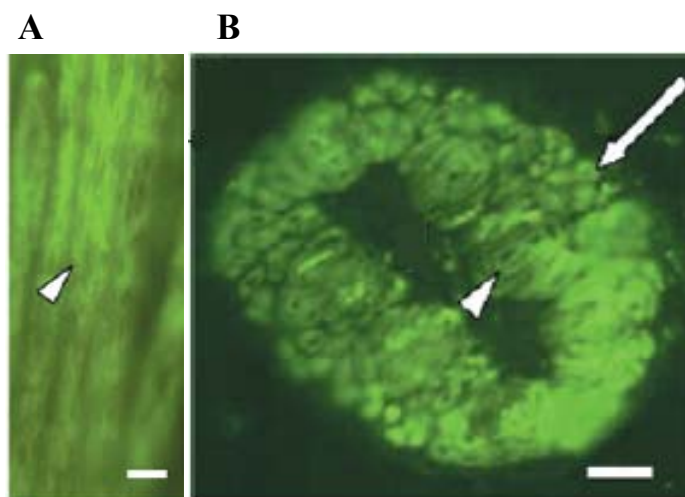


Figura 5: A - Seção longitudinal e B – seção transversal de bárbula de pena embrionária após reação com anticorpo anti- β -queratina, mostrando os filamentos de queratina. Barra de escala de 10 μ m (Alibardi & Sawyer, 2006).

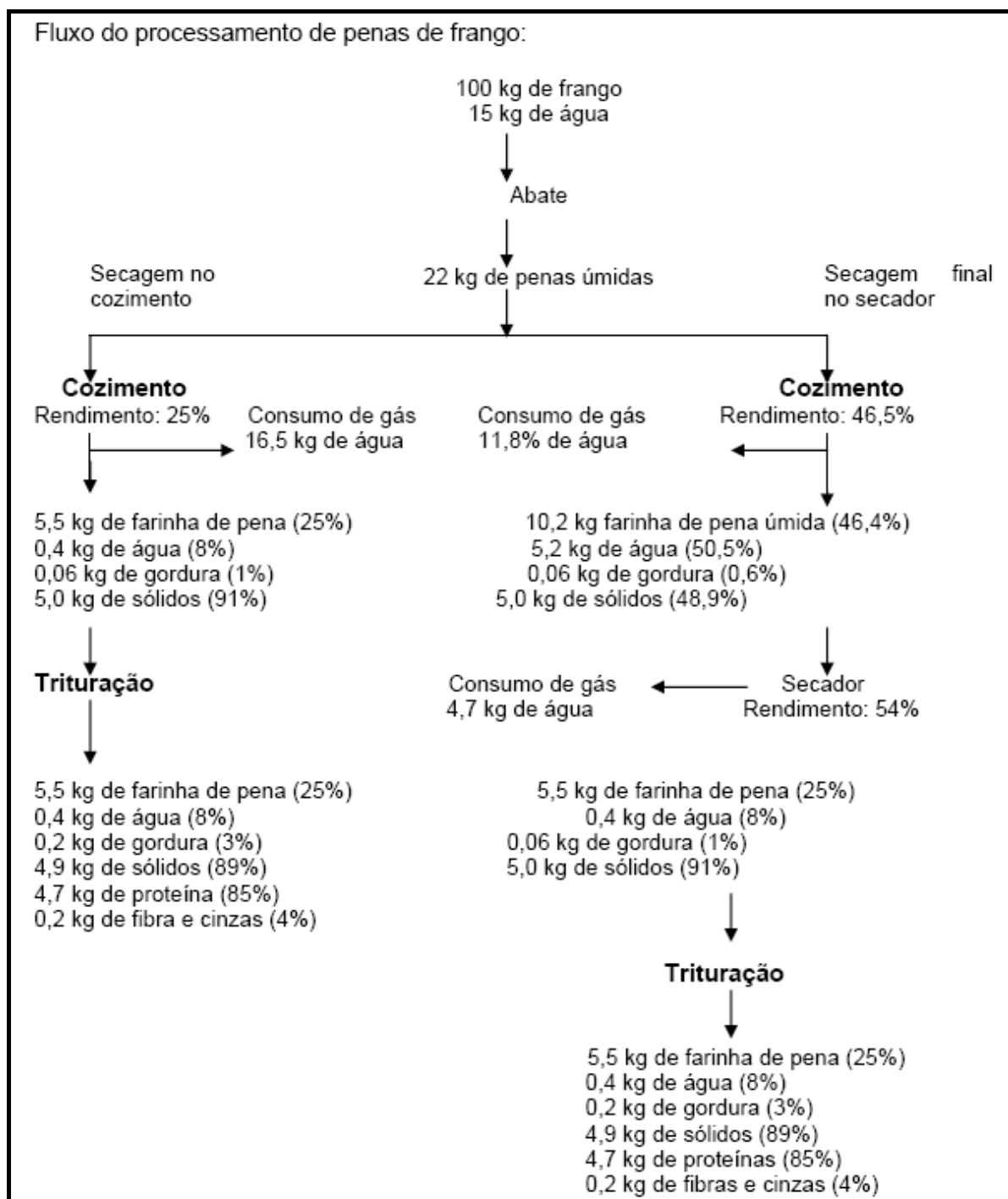
Quando reduzidas sob condições alcalinas, as penas produzem peptídeos S-carboximetilados com 10,6 kDa (Brush, 1996; Alibardi & Sawyer, 2006). Todas as penas e suas partes possuem misturas heterogêneas desse peptídeo. As partes morfológicas das penas possuem composição de enxofre e aminoácidos diferentes (Harrap & Woods, 1967), mas a composição da mesma parte de diferentes penas (de contorno, plumagem ou de vôo) é a mesma em uma mesma espécie (Knox, 1980). Estas diferenças estão confinadas aos mesmos aminoácidos: alanina, cistina, glicina, isoleucina, prolina e tirosina (Harrap & Woods, 1964).

1.2.2. Farinha de penas

As penas representam uma fonte potencial de proteína para alimentação animal se a completa desnaturação da estrutura rígida da queratina for alcançada (Dalev, 1994). Uma das opções de utilização da pena proveniente do abate de aves é submetê-la à cocção sob pressão, para obtenção da farinha de penas, uma forma de modificar a estrutura polipeptídica e quebrar as pontes dissulfeto para tornar as penas mais digestíveis (Tiquia *et al.*, 2005). Este tratamento requer muita energia, pode destruir certos aminoácidos sensíveis ao calor como a metionina, histidina, lisina e triptofano, cuja concentração já é baixa nas penas (Dalev, Ivanov & Liubomirova, 1997; Marcondes *et al.*, 2007), além de formar aminoácidos derivados não assimiláveis como lisinoalanina e lantionina, diminuindo a qualidade nutricional da farinha (Gupta & Ramnani, 2006; Marcondes *et al.*, 2007).

Apesar disso, a farinha de pena é superior à farinha de soja no conteúdo de cisteína, valina e treonina (Santos *et al.*, 2006). Devido ao seu elevado teor protéico, ela tem sido utilizada na dieta de aves, embora esta proteína seja basicamente queratina e tenha baixa digestibilidade (Scapim *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006).

Os tratamentos para a produção da farinha de penas variam em tempo de processamento e intensidade de pressão, sendo que os efeitos dessas variáveis às vezes são similares. A digestibilidade da proteína é melhorada com o aumento da pressão do digestor, conseguindo-se um maior rendimento em aminoácidos úteis, de maior valor biológico, quando o processo é intenso (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT). O fluxograma 1 sumariza o processamento das penas na fabricação de farinha de penas.



Fluxograma 1: Fluxo do processamento de penas de frango. Baseado no manual do Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT.

A utilização da farinha de penas na fabricação de rações para aves pode ser uma alternativa de grande importância no que diz respeito à redução de custos de produção. Mas o uso de farinhas de origem animal em rações também tem suas limitações, como serem passíveis de contaminação por bactérias (*Salmonella*, *E. coli*), príons [uma variante conformacional anormal de uma pequena partícula protéica fisiológica (Müller-Hellwig *et al.*, 2006)] e cheiro desagradável, que podem afetar a qualidade final dos rações produzidas (Bellaver, 2001).

Os nutricionistas têm a preocupação de formular rações para que as aves obtenham o máximo desempenho, de forma economicamente viável. O conhecimento da composição química e energética dos alimentos é de suma importância para a formulação de rações. Isto tem sido uma desvantagem na utilização da farinha de penas, pois nas indústrias avícolas, as plantas processadoras têm dificuldades em adotar um padrão contínuo do material produzido, influenciando diretamente a composição química e, conseqüentemente, a qualidade. Desta forma, o ideal seria determinar a composição química da farinha de penas antes da formulação das rações, ao invés de utilizar composições preestabelecidas, e assim evitar utilizar uma ração com valor real diferente do necessário para as aves, prejudicando o seu desempenho (Nascimento *et al.*, 2002). Não só a composição, mas também a concentração da mesma na ração deve ser investigada para não haver prejuízos no desempenho animal.

Santos *et al.* (2006) testaram, em frangos, quatro rações isoprotéicas e isocalóricas com diferentes níveis de farinha de penas: 0%; 3%; 6% e 9%, e observaram que na fase inicial de crescimento (1 a 7 dias) houve redução do ganho de peso na medida em que aumentaram os níveis de inclusão de farinha de penas na ração, provavelmente devido à baixa digestibilidade deste alimento. A farinha foi utilizada em uma fase de crescimento na qual o animal é mais sensível e necessita de uma dieta de alta qualidade. Resultados semelhantes foram observados para

suínos (Ssu, Brumm & Miller, 2004). Nos períodos de 22 a 42 dias e 1 a 42 dias, houve melhora da taxa de conversão alimentar (aproveitamento da ração pelo animal); os animais consumiram menos ração nestes períodos sem haver prejuízo significativo do ganho de peso dos mesmos.

Atualmente, a utilização dos subprodutos do abate das aves, tais como as farinhas de vísceras, penas e mista (vísceras + penas) nas rações, é uma realidade, mas a definição do seu conteúdo energético torna-se necessário para maximizar o desempenho e o retorno econômico da atividade (Nascimento *et al.*, 2002).

Nascimento *et al.*, (2002) determinaram a composição química e os valores de energia metabolizável de seis farinhas de penas. A composição química, energética e física das farinhas estudadas por eles está representada na tabela 3 (farinhas de 1-6). Foram observadas variações na concentração de proteínas (máximo de 81,87% e mínimo de 72,29%), assim como no extrato etéreo (soma de todas as substâncias extraídas pelo éter, como acilgliceróis, ácidos graxos livres, colesterol, etc) e material mineral. As concentrações ditas como aceitáveis para farinha de penas são extrato etéreo mínimo 2%, de matéria mineral máximo 3%, e teor de proteína bruta de 80%, desta forma as farinhas 1 e 3 não estão dentro do aceitável.

Scapim *et al.* (2003) realizaram um trabalho semelhante avaliando o valor nutricional de 4 farinhas de penas processadas de forma diferente e contendo 20% de farinha de sangue, investigando a composição química (tabela 3). Entretanto, não encontraram valores tão discrepantes quanto Nascimento *et al.* (2002). O conteúdo de aminoácidos das farinhas obtidas está representado na tabela 4. Eles também investigaram a digestibilidade destas farinhas e observaram que ela varia de 58,93 a 61,09%.

Tabela 3: Composição química, física e valores de energia metabolizável de farinha de penas.

FP	MS (%)	PB (%)	EE (%)	EB kcal/kg	MM (%)	Ca (%)	P (%)
FP 1	90,40	76,56	4,70	5.208	3,45	0,69	2,83
FP 2	90,04	77,00	5,45	5.216	1,40	0,28	1,38
FP 3	88,90	78,71	1,32	5.241	1,58	0,24	0,93
FP 4	89,47	81,87	2,36	5.173	1,77	0,02	1,31
FP 5	90,87	72,29	2,62	5.141	1,55	0,23	1,25
FP 6	89,74	73,56	19,07	5.388	2,97	0,42	1,10
FP 7	92,5	79,8%	-	-	-	0,45	0,31
FP 8	92	85	3	-	-	0,45	0,31
FP 9	93	81,2	11,1	3.800	-	-	-
FP 10	87,89	80,66	-	-	2,35	0,34	0,34
FP 11	87,48	80,97	-	-	2,26	0,33	0,34
FP 12	87,67	80,67	-	-	2,31	0,33	0,34
FP 13	87,77	80,59	-	-	2,14	0,33	0,33

Farinha de penas (FP); matéria seca (MS); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); energia bruta (EB); Material mineral (MM). FP 1-6: dados de Nascimento *et al.* (2002); FP 7: dados de Ssu, Brumm & Miller (2004), FP 8: dados de ingredients101.com, FP 9: dados de Apple *et al.* (2003); FP 10-13: dados de Scapim *et al.* (2003).

A tabela 4 mostra o conteúdo de aminoácidos de diferentes farinhas descritas na literatura.

Tabela 4: Composição de aminoácidos da farinha de penas em %

AA (%)	FP 1	FP 2	FP 3	FP 4	FP 5	FP 6	FP 7	FP 8
Ala	4,3	-	3,8	4,15	4,49	4,49	4,49	4,46
Arg	5,2	-	4,98	5,6	5,6	5,46	4,85	8,28
Asp	5,1	-	5,4	5,33	6,94	6,92	6,86	6,82
Cys	3,6	5,25	3,72	3,69	3,72	3,57	3,74	-
Glu	8,9	-	8,13	8,73	9,1	9,04	9,3	11,07
Gly	5,9	-	5,64	6,15	6,05	5,97	6,23	7,92
His	1,1	1,05	1,12	0,74	1,16	1,21	1,13	0,48
Ile	3,6	4,15	3,61	3,79	3,8	3,68	3,82	4,63
Leu	7,0	7,36	6,38	6,77	7,06	7,06	7,31	7,9
Lys	2,4	2,30	2,4	1,98	2,64	2,53	2,48	2,17
Met	0,7	0,62	0,68	0,56	0,71	0,6	0,82	-
Phe	4,0		3,88	3,89	3,96	3,93	4,07	-
Pro	7,5	-	6,8	-	-	-	-	10,27
Ser	8,2	-	7,41	8,73	9,10	9,04	9,3	11,97
Thr	3,9	3,93	3,51	3,49	3,84	3,86	4,02	4,86
Tyr	2,6	2,62	-	2,16	1,85	2,09	2,27	-
Trp	-	0,44	-	-	-	-	-	-
Val	5,6	6,61	5,45	5,97	6,15	5,76	6,02	6,73

Farinha de penas (FP); FP 1: dados de Cunningham, Cecava & Johnson (1994); FP 2: dados de Apple *et al.* (2003); FP 3: dados de Brumano *et al.* (2006); FP 4-7; dados de Scapim, *et al.* (2003); FP 8: dados de Chiba *et al.* (1996).

1.3. Peptidases

Peptidases (proteases ou proteinases) são enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. O nome peptidase é o termo recomendado pelo sistema *MEROPS*, um banco de dados criado para dar suporte à classificação destas enzimas (www.merops.acd.uk). Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e sub-classe 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As peptidases podem ser classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19), quando clivam aminoácidos terminais, e endopeptidases (EC 3.4.21-99), quando hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica. As exopeptidases podem ainda ser classificadas de acordo com a sua atuação na região N- ou C- terminal da proteína. Aquelas que atuam na região N-terminal podem liberar um único aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). Já as carboxipeptidases clivam um aminoácido ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidase). Algumas exopeptidases hidrolisam dipeptídeos, e outras removem unidades de aminoácidos substituídos, ciclizados ou ligados por ligação isopeptídica, neste último caso denominadas ômega peptidases (Bon & Vermelho, 2004). As reações catalisadas pelas peptidases estão esquematizadas na figura 1.

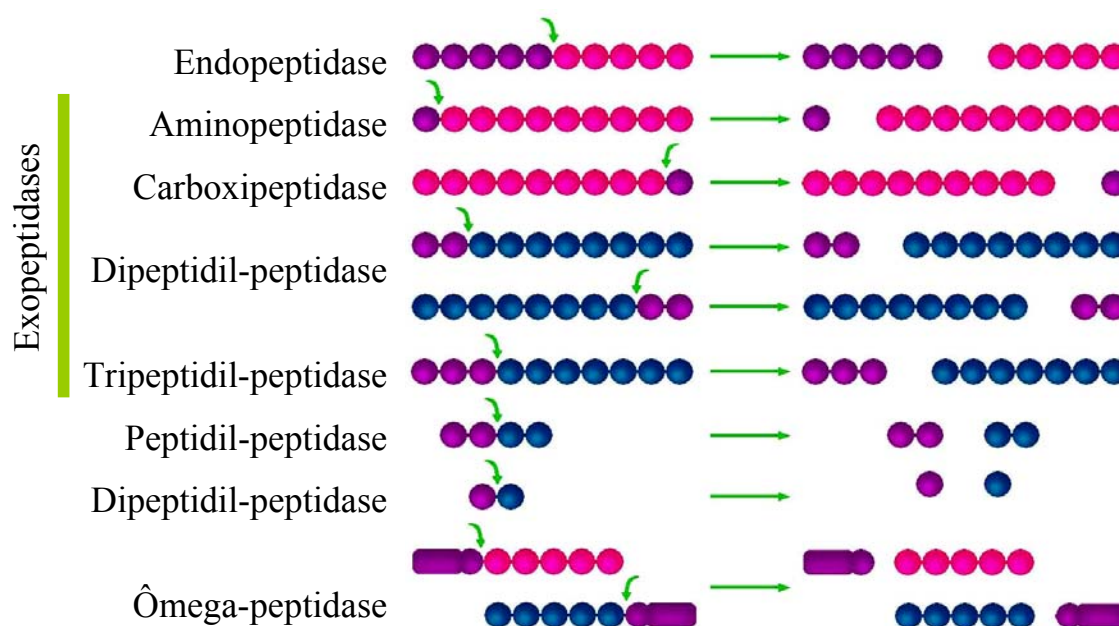


Figura 1: Classificação das peptidases quanto ao local de clivagem na proteína.

As peptidases são também classificadas segundo o sítio catalítico, de acordo com os grupos químicos presentes no centro ativo. Atualmente, são descritos seis tipos catalíticos: cisteína, treonina, glutâmico, aspártico, e serina peptidases, em função da presença destes aminoácidos no centro ativo da molécula protéica, e metalopeptidase quando um ou dois íons metálicos estão envolvidos no mecanismo catalítico (Rao *et al.*, 1998; Bon & Vermelho, 2004). A maioria das metalopeptidases possui zinco no sítio ativo, podendo também ocorrer cobalto ou níquel. Algumas peptidases não têm seus mecanismos de ação suficientemente elucidados e são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99 segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (Bon & Vermelho, 2004).

O avanço dos estudos de química de proteínas, como a cristalografia, estudos comparativos da seqüência primária, dos aminoácidos do centro ativo assim como da estrutura tridimensional das peptidases, permitiram a elaboração de novos critérios para a sua classificação e para os estudos das relações filogenéticas. Estes

estudos foram iniciados por Rawlings & Barrett (1993), que estabeleceram linhas evolutivas baseadas na comparação das seqüências dos domínios importantes para a atividade. Desta forma, cada peptidase é designada como uma espécie, e cada espécie recebe um nome, como tripsina por exemplo. Cada espécie de peptidase pode ser detectada em muitos organismos, com pequenas variações esperadas, neste caso estas são espécies variantes da primeira encontrada. Espécies protéicas com seqüências com semelhança estatisticamente relevante foram, então, alocadas em famílias.

A família é um grupo de peptidases baseada na homologia da seqüência e uma família pode conter uma única peptidase se nenhuma peptidase homóloga for conhecida. Cada família é representada pela letra que representa seu tipo catalítico e por um número. Por sua vez, as famílias que aparentam ter um ancestral comum, ou por causa da estrutura quaternária ou devido a resíduos no sítio ativo, foram agrupadas em clãs (Rawlings *et al.*, 2007). Foi sugerido que a classificação em famílias e clãs fosse usada como uma extensão da classificação de acordo com o sítio catalítico das peptidases. Baseado nesta classificação hierárquica apoiada na estrutura da proteína, foi criado em 1996 o banco de dados *MEROPS* (Rawlings, Tolle & Barrett, 2004; Rawlings, Morton & Barrett, 2006). Em abril de 2007 uma nova versão do *MEROPS* foi lançada (versão 7.8), contendo o dobro de peptidases de sua versão anterior (versão 7.1, julho de 2005) (Rawlings *et al.*, 2007). O *MEROPS* também disponibiliza informações sobre inibidores não protéicos e classifica hierarquicamente os inibidores protéicos em espécies, famílias e clãs baseado em sua estrutura química (Rawlings *et al.*, 2007), além de fornecer outras informações sobre as peptidases, como a especificidade de substrato, quais inibidores atuam sobre elas, função biológica, relevância farmacêutica e biotecnológica.

Um clã contém todas as peptidases que derivam de uma única origem evolutiva. Cada clã apresenta uma ou mais famílias e é identificado por duas letras, sendo a primeira representando o sítio catalítico das famílias incluídas no clã: A para aspártico peptidase, C para cisteína peptidase, M para metalopeptidase, S para serina peptidase, T para treonina peptidase e U para glutâmico peptidase. A letra P é atribuída a clãs que possuem famílias de mais de um tipo catalítico. Alguns clãs são divididos em subclãs quando existe a evidência de divergência evolutiva dentro do clã. O mesmo pode acontecer com as famílias.

Por exemplo, a espécie subtilisina Carlsberg, uma peptidase produzida por *Bacillus licheniformis* Carlsberg, é classificada como S08.001; ela pertence à subfamília S8A (denominada subfamília da subtilisina), que pertence à família S8 (família da subtilisina), uma família de serina peptidases inibidas por PMSF e DFP e algumas vezes por EGTA e EDTA, uma vez que alguns membros desta família são estabilizados por cálcio. Esta família está incluída no clã SB. Neste clã também encontra-se a família S5, a família da sedolisina, uma serina-peptidase produzida por *Pseudomonas* spp. (www.merops.acd.uk).

As peptidases têm grande importância biológica, médica e biotecnológica, e constituem um produto com alto valor agregado, podendo participar de diversos processos industriais, como na indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, têxtil, entre outras. As peptidases correspondem a aproximadamente 60% do total de enzimas no mercado mundial e cerca de 40% das peptidases comercializadas são de origem microbiana. Destas, destacam-se as peptidases alcalinas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, cujas aplicações têm aumentado acentuadamente devido à capacidade de produção destes microrganismos e a alta atividade catalítica das peptidases por eles produzidas (Joo & Chang, 2006). O interesse nas peptidases de origem microbiana de forma geral deve-se ao fato de que as peptidases de plantas e animais não atendem à demanda mundial, além da facilidade de

manipulação genética, grande diversidade bioquímica encontrada, o curto tempo de geração, controle da produção em todas as fases, processo de produção mais barato, processo de extração mais simples, otimização das condições de crescimento e produção regional independente, uma vez que determinadas plantas só crescem em condições climáticas específicas (Gupta *et al.*, 2002; Bon & Vermelho, 2004).

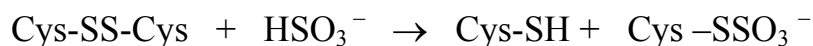
1.4. Queratinases

As queratinases (EC 3.4.21/24/99.11) são peptidases que têm como substrato um grupo de proteínas fibrosas e insolúveis denominadas de queratinas, e estas peptidases são produzidas por bactérias e fungos. Estas enzimas são em sua maioria endopeptidases, embora tenham sido descritas exopeptidases em *Keratinomyces ajelloi* e *Trichophyton gallinae* (Rufflin *et al.*, 1979; Wawrzkievicz, Lobarzewski & Wolsky, 1987). Vários tipos catalíticos de queratinases têm sido descritos em microrganismos, principalmente queratinases do tipo serina e metalopeptidases (Bressolier *et al.*, 1999; Brouta *et al.*, 2002; Gupta & Ramnani, 2006; Kojima *et al.*, 2007). Em *Candida albicans* foi detectada uma aspártico endopeptidase com atividade queratinolítica (Hattori *et al.*, 1984).

Para a hidrólise das ligações peptídicas da queratina é necessária a clivagem prévia das pontes dissulfeto da molécula. Há dois mecanismos propostos para a clivagem destas pontes, um observado por Kunert (1992) no qual a clivagem de pontes dissulfeto é realizada por sulfitólise, e o outro por Yamamura *et al.* (2002a) onde essa clivagem é feita por uma dissulfeto redutase.

Os fungos dermatófitos crescem sobre meio com cistina (duas unidades de cisteína ligadas por uma ponte dissulfeto) livre ou combinada. Eles metabolizam intensamente esta substância, excretando para o meio o excesso de enxofre na

forma de sulfatos e/ou sulfito. O sulfito reage com a cistina em solução neutra ou alcalina, clivando em cisteína e S-sulfocisteína, segundo a reação:

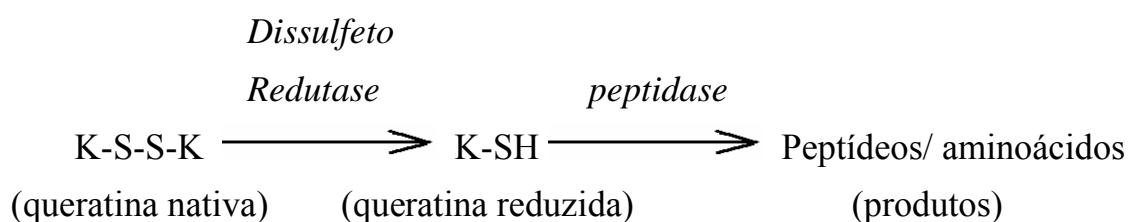


A hipótese foi apoiada por experimentos que revelaram a presença de produtos de sulfitólise no meio de cultura.

Kunert (1992) avaliou o efeito das peptidases do dermatófito *Microsporium gypseum* sobre a queratina e outros substratos protéicos como a soroalbumina bovina (que possui 17 pontes dissulfeto) insolubilizada por ligações cruzadas e caseína (que não tem cistina), na presença de sulfito e outro agentes redutores. Ele observou que houve a estimulação da proteólise na presença dos agentes redutores, em especial o sulfito. Esta estimulação foi detectável quando a peptidase e o agente redutor atuaram juntos. Com o substrato caseína não houve estimulação da hidrólise pelas peptidases do dermatófito. A sulfitólise das pontes dissulfeto também aumentou a atividade de tripsina e pronase sobre substratos queratinosos. Os resultados obtidos por Kunert (1992) apóiam sua hipótese sobre a degradação da queratina pela excreção de sulfito antes do ataque das peptidases do fungo.

Yamamura *et al.* (2002a) isolaram uma bactéria, *Stenetrophomonas* sp. cepa D-1, capaz de degradar queratina. Eles observaram a produção de duas proteínas extracelulares: uma com atividade proteolítica e outra capaz de reduzir pontes dissulfeto. A purificação e caracterização destas proteínas mostraram que a primeira se tratava de uma peptidase pertencente à classe das serina peptidases e a segunda era uma dissulfeto redutase. Estas enzimas, quando testadas individualmente, não mostraram quase nenhuma atividade queratinolítica. Entretanto, depois que as duas enzimas foram misturadas, a atividade

queratinolítica aumentou mais de 50 vezes. Estes resultados demonstraram que as duas enzimas atuaram cooperativamente para degradar a queratina, resultando no aumento da atividade hidrolítica e revelando um novo mecanismo de degradação desta proteína, onde uma dissulfeto redutase ataca as pontes dissulfeto da queratina primeiro, produzindo uma proteína passível de degradação por uma peptidase, como mostra o esquema:



1.5. Microrganismos queratinolíticos

A estrutura da queratina é resistente à atividade da maioria das peptidases, entretanto ela pode ser degradada por algumas espécies de microrganismos que secretam queratinases (Bernal, Cairó & Coello, 2005). Dentre os microrganismos queratinolíticos, o grupo que mais se destaca é o dos fungos dermatófitos, por provocarem infecção em tecidos queratinizados como pele, unha e cabelo. A hidrólise da queratina pelas queratinases produzidas pelos fungos é um aspecto importante na patogênese (Tsuboi, Takamori & Ogama, 1989; Mignon *et al.*, 1998a).

Por estarem envolvidas no mecanismo de patogenicidade de vários fungos, as queratinases dos fungos dermatófitos têm sido estudadas e caracterizadas. Como exemplo, pode-se citar o *Trichophyton mentagrophytes*, o mais estudado dos dermatófitos (Tsuboi, Takamori & Ogama, 1989; Siesenop & Böhm, 1995), *T. rubrum*, que causa infecção crônica em humanos (Mignon *et al.*, 1999), *T. gallinae*, um fungo zoofílico com afinidade para penas de frango (Wawrzkievicz,

Lobarzewski & Wolski, 1987), *T. verrucosum* (Grzywnowicz *et al.*, 1989; Wawrzekiewicz, Wolski & Lobarzewski, 1991) e *T. simii*, (Singh, 1997), entre outros.

Microsporium canis é o mais comum dos dermatófitos zoofílicos humanos. Os gatos são tidos como hospedeiros naturais e também possíveis reservatórios para este fungo. A cepa isolada por Mignon *et al.* (1998b) produz uma serina peptidase com atividade queratinolítica de aproximadamente 31,5kDa, enquanto a cepa isolada por Brouta *et al.* (2002) produz também uma queratinase classificada como serina peptidase de 43,5 kDa. A queratinase produzida por *M. canis* desempenha um papel na patogênese das infecções de pele por estar envolvida na invasão do tecido hospedeiro (Mignon *et al.*, 1998a; 1998b). Queratinases também têm sido isoladas de *Aspergillus fumigatus fresenius*, um patógeno oportunista que provoca desordens respiratórias e infecções invasivas severas (Santos *et al.*, 1996). Outros fungos queratinolíticos que também podem ser citados são *Hendersonula toruloidea* e *Scopulariosis brevicaulis*, agentes etiológicos de onicomiose humana (infecção de unha) (Malviya *et al.*, 1992; Marchisio, Fusconi & Querio, 2000), e *Myrothecium verrucaria*, o primeiro fungo queratinolítico fitopatogênico descrito (Moreira *et al.*, 2007).

Como as queratinases poderiam ser interessantes para diversas aplicações na indústria, 300 fungos comuns não-patogênicos foram avaliados quanto à produção de queratinase por Friedrich & Kern (2003). Eles observaram que a atividade queratinolítica não é rara entre os fungos e selecionaram o fungo não-patogênico *Doratomyces microsporus*, que produz uma serina peptidase que foi purificada e caracterizada. Esta queratinase foi capaz de hidrolisar diferentes tipos de queratina e outros substratos protéicos. Por não degradar o colágeno, esta queratinase tem potencial para ser empregada na indústria do couro (Gradišar, Kern & Friedrich, 2000; Friedrich & Kern, 2003).

Um dos locais de freqüente isolamento de fungos queratinolíticos é o solo. *Cylindrocarpon lichenicola*, *Graphium cuneiferum*, *Microsporum gypseum* e *M. fulvum* foram isolados do solo de uma fábrica de gelatina e mostraram atividade em cabelo humano. No filtrado de colônia destes fungos foram encontrados sulfato e tiosulfato, indicando que eles fazem sulfitólise para a degradação de queratina (Malviya *et al.*, 1992).

Kaul & Sumbali (1997) isolaram, do solo de um aviário, espécies de *Chrysosporium*, *Malbranchea*, *Scopulariopsis*, *Macroascus* e *Gliocladium* capazes de crescer em meio contendo cabelo como principal fonte de carbono e nitrogênio e degradá-lo. Também de solo de aviário foram isolados *Curvularia brachyspora*, *Beauveria bassiana*, *Alternaria tenuissima* e *Acremonium hyalinum* por Marcondes *et al.* (2007). Outros exemplos de fungos queratinolíticos não-patogênicos são *Malbranchea gypsea* (Singh, 1998), *Chrysosporium keratinophilum* (Singh, 2002), *Chrysosporium georgiae* (El-Naghy *et al.*, 1998) e *Aspergillus oryzae* (Farag & Hassan, 2004).

Em leveduras, queratinases foram encontradas apenas em *Candida albicans* e *C. parapsilosis*, ambas patogênicas (Hattori *et al.*, 1984; Rüchel, Böning & Borg, 1986; Segal *et al.*, 2000).

As pesquisas mais recentes estão direcionadas para o potencial das queratinases de origem bacteriana, devido à ampla especificidade para substratos protéicos, fácil cultivo e pela freqüente termoestabilidade (Allpress, Mountain & Gowland, 2002). O gênero com maior número de espécies e cepas queratinolíticas é o gênero *Bacillus*.

Bacillus licheniformis PWD-1 foi isolado de resíduos termofílicos avícolas de um sistema digestor (Williams *et al.*, 1990) e sua queratinase caracterizada por Lin *et al.* (1992). Outro *B. licheniformis* estudado foi o isolado por Rozs *et al.* (2001), que produz uma tiol peptidase semelhante à tripsina, o que não é comum

entre as peptidases extracelulares de microrganismos. O *B. licheniformis* Carlsberg cepa NCIMB 6816 produz a bem caracterizada serina peptidase subtilisina Carlsberg (Evans, Crowder & Miller, 2000; Srimathi, Jayaraman & Narayanan, 2006). *B. pumilus* FH9 isolado de solo é capaz de degradar quase totalmente penas em 48h (El-Refai *et al.*, 2005). *B. pumilus*, *B. cereus* e *B. subtilis* foram isolados de amostras de solo e se mostraram capazes de degradar penas de frango (Zaghloul, Al-Bahra & Al-Azmeh, 1998; El-Refai *et al.*, 2005). As mesmas três espécies de *Bacillus* foram também isoladas de resíduos avícolas, e a única que mostrou produção constitutiva da enzima foi o *B. subtilis* (Kim, Lim & Suh, 2001). *B. cereus* isolado por Sousa *et al.* (2007) produz uma metalopeptidase de 45,6 kDa capaz de hidrolisar lã. *B. cereus* MCM-326 produz múltiplas peptidases com aplicação na indústria de couro (Nilegaonkar *et al.*, 2007). Outros membros do gênero estudados foram: *B. megaterium* F7-1 (Park & Son, 2007), *B. subtilis* KS-1 (Suh & Lee, 2001), *Bacillus* spp. FK 46 (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003), *B. psuedofirmus* (Gessesse *et al.*, 2003, Kojima *et al.*, 2007), *B. halodurans* (Takami, Nogi & Horikoshi, 1999), *B. licheniformis* RGI (Ramnani & Gupta, 2004), entre outros.

Flavobacterium sp. com alta atividade queratinolítica foi isolado de uma indústria avícola. Esta bactéria foi capaz de degradar completamente penas brutas, e a análise do sobrenadante mostrou a presença de uma metalopeptidase (Riffel & Brandelli, 2002). O mesmo grupo isolou o *Vibrio* sp. cepa sk 2, capaz de degradar completamente penas e com potencial para uso em processos que envolvam hidrólise de queratina (Sangali & Brandelli, 2000; Grazzienti *et al.*, 2007), e *Chryseobacterium* spp. kr6, produtor de uma metalopeptidase com atividade sobre penas e farinha de penas (Riffel *et al.*, 2007).

Outras bactérias como *Xanthomonas maltophilia* POA-1 (De Toni *et al.*, 2002), *Lysobacter* NCIMB 9497 (Allpress, Mountain & Gowland, 2002),

Stenotrophomonas spp. (Yamamura *et al.*, 2002b), as alcalinofílicas *Nesternkonkia* spp. e *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (Mitsuiki *et al.*, 2002; Gessesse *et al.*, 2003), a termofílica *Thermoanaerobacter keratinophilus* (Friedrich & Antranikian, 1996) e as anaeróbicas *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans e *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (Ionata *et al.*, 2006; Nam *et al.*, 2002) têm sido descritas com atividade queratinolítica. Em sua maioria, as queratinases foram classificadas como serina peptidases.

Uma peptidase com atividade queratinolítica de 240 kDa secretada por *Kokuria rósea*, quando cultivada em penas como única fonte de carbono e nitrogênio, foi purificada e caracterizada e classificada como serina peptidase (Bernal, Cairó & Coello, 2005). *Kytococcus sedentarius* é uma das poucas bactérias queratinolíticas descritas como agente etiológico de erosão e mau cheiro nos pés, e produz duas serina-peptidases com atividade queratinolítica de 30 e 50 kDa aproximadamente (Longshaw *et al.*, 2002).

Alguns actinomicetos também são capazes de degradar queratina, em especial do gênero *Streptomyces*, como *Streptomyces fradiae*, que é capaz de solubilizar um terço do peso de lã inalterada e produz uma queratinase conjugada a um polímero ácido (Nickerson, Noval & Robinson, 1963). O *Streptomyces* spp. 594 produz mais de uma enzima com atividade queratinolítica, sendo detectadas serina e metalopeptidases quando cultivada em farinha de penas (De Azeredo *et al.*, 2006). *S. pactum* DSM 40530 (Böckle, Galunsky & Müller, 1995) produz peptidases com atividade queratinolítica, assim como *Streptomyces* sp. A11 (Mukhopadhyay & Chandra, 1990), *S. termoviolaceus* (Chitte, Nalwade & Dey, 1999), *S. albidoflavus* (Bressolier *et al.*, 1999), *Termostreptomyces candidus* (Ignatova *et al.*, 1999), entre outros.

1.6. Aplicação das queratinases em ração animal

A expansão da avicultura industrial no Brasil gerou dois problemas a serem solucionados pelos nutricionistas e técnicos da área de produção: a elevada demanda por novos ingredientes que possam ser utilizados na fabricação de ração, a fim de reduzir os custos de produção, e grandes quantidades de resíduos gerados durante o abate das aves, tais como penas, vísceras e sangue, os quais, se manejados inadequadamente, podem causar sérios danos ambientais. Esses subprodutos de abatedouros são passíveis de utilização na alimentação animal como alimentos de baixo custo, desde que processados corretamente (Tucci *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2006).

Uma alternativa para melhorar o valor nutricional das penas é o biotratamento através de microrganismos que produzem queratinases, hidrolisando a queratina em aminoácidos e peptídeos. Nas últimas décadas, a degradação de penas por métodos biológicos tem atraído maior interesse devido ao aumento da consciência ambiental (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003), uma vez que utiliza um resíduo problemático da indústria de rações. O processamento biotecnológico de penas para a produção de ração animal, em contraposição ao seu processamento químico e/ ou térmico, oferece vantagens como, por exemplo, a não-destruição de alguns aminoácidos essenciais e a menor demanda de energia.

O principal desafio dos criadores tem sido reduzir custos, sem no entanto perder em produtividade e, até em alguns casos, melhorar a performance para aumentar a competitividade na produção de carnes e ovos. Um fator limitante na redução de custos na produção de aves e também suínos é o custo das formulações de rações, haja vista que em média 65% do custo total de produção nestas espécies estão representados pela alimentação.

Em 2007, o setor de alimentação animal movimentou 53,5 milhões de toneladas, com faturamento de US\$ 10 bilhões, 10,7% a mais que em 2006. Para 2008, a perspectiva é crescer mais 10%, mais uma vez puxados por aves e suínos, que respondem por 80% do total comercializado. Além de reduzir os preços, o setor mostra-se preocupado neste momento em garantir matéria-prima, cuja escassez atinge suplementos e grãos, uma vez que a demanda para a avicultura e a suinocultura cresce aceleradamente (www.aviculturaindustrial.com.br).

O tratamento com queratinases pode melhorar o rendimento da utilização das penas, não só através da produção de uma farinha de penas de melhor qualidade, mas também como aditivo pós-pellet, ou seja, ao final da produção da ração através do processo de peletização, aumentando a digestibilidade da queratina no alimento e assim aumentando a energia metabolizável.

A suplementação de penas ou farinha de pena com a queratinase PWD1 (queratinase produzida por *Bacillus licheniformis* PWD1), levou a modificação da estrutura da queratina, e com isso a melhora da digestibilidade e do crescimento das aves (Burt & Ichida, 1999; Gupta & Ramnani, 2006). Testes com a enzima Versazyme (nome comercial da queratinase PWD1) mostraram o melhor desempenho de aves quando esta foi usada como aditivo na concentração de 0,1% (Odetallah *et al.*, 2005).

O interesse no uso de enzimas em rações para aves tem aumentado devido ao custo cada vez maior das matérias primas tradicionais e a busca por outros ingredientes alternativos (SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria Alimentação Animal, 1999). Para 2008, há a perspectiva de alta da soja e do milho, que deve causar novas altas nos preços das rações, que foi de 17% em 2007. A melhora significativa na digestibilidade dos alimentos obtida com o uso de enzimas nas dietas permite alterações nas formulações das rações, de forma a minimizar o custo, maximizando o uso dos ingredientes energéticos e protéicos das rações. O

emprego de enzimas possibilita, ainda, a utilização de alimentos alternativos regionais ou sazonais de menor custo em substituição ao milho e à soja, tradicionalmente utilizados como fontes de energia e proteína, respectivamente. O uso de enzimas em rações é uma realidade e algumas enzimas estão comercialmente disponíveis para adição em ração animal, entre elas encontram-se peptidases, fitases, carbohidratases e lipases (www.aviculturaindustrial.com.br). A tabela 5 mostra as principais enzimas utilizadas em rações e sua finalidade.

Tabela 5: Resumo das enzimas utilizadas em rações para aves.

Enzima	Substrato	Efeitos
Xilanase	Arabinoxilanas	Redução da viscosidade da digesta.
Glucanases	β -glucanos	Redução da viscosidade da digesta. Menor umidade na cama.
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da digesta.
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de carboidratos
Proteases	Proteínas	Suplementação das enzimas do animal. Degradação mais eficiente de proteínas.
Amilases	Amido	Suplementação das enzimas endógenas. Degradação mais eficiente do amido.
Fitase	Ácido fítico	Melhora a utilização do fósforo dos vegetais. Remoção do ácido fítico.
Galactosidases	Galactosídios	Remoção de Galactosídios
Lipases	Lipídios e ácidos graxos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais

Fonte: SINDIRAÇÕES, 1999 (www.sindiracoes.org.br, consultado em 12/10/2007).

1.7. Exigências nutricionais de aves

Atualmente, a avicultura se encontra em uma fase na qual todos os processos da cadeia produtiva devem ser conhecidos e detalhados para o alcance das metas produtivas. Sendo assim, a nutrição deve ser cada vez mais precisa, em especial quanto à qualidade protéica em correta proporção nas dietas, uma vez que uma importante função da produção animal é fornecer alta qualidade protéica para a alimentação humana (Araújo *et al.*, 2002).

O valor nutritivo do alimento está diretamente relacionado com sua composição química e energética, importantes no balanceamento das rações. As tabelas nacionais de composição dos alimentos e exigências nutricionais têm contribuído para o avanço da avicultura no Brasil, proporcionando dados mais precisos dos alimentos, o que tem permitido melhor utilização, principalmente, dos alimentos não-convencionais (D'Agostini *et al.*, 2004). Essas tabelas sugerem formulação de rações mais eficientes e que possibilitem às aves expressar todo o seu potencial. A tabela 6 mostra valores de referência para as dietas com diferentes quantidades de proteína bruta.

A proteína é um dos principais nutrientes na nutrição de aves e suínos, possuindo grande importância no custo da formulação das rações, influenciando diretamente na conversão alimentar, qualidade de carcaça e ganho de peso dos animais. Proteína ideal é definida como o balanço exato de aminoácidos que é capaz de prover, sem excesso ou falta, os requerimentos de todos os aminoácidos necessários para a manutenção animal e máxima deposição protéica. O conceito da proteína ideal foi desenvolvido a partir do conhecimento do requerimento de cada aminoácido para as diferentes funções dos animais (Mitchel, 1964, Suida, 2001).

O aminoácido lisina é considerado padrão no conceito de proteína ideal e vem sendo usado como referência para atualizar as necessidades de outros

aminoácidos, por intermédio de relações simples. A lisina também tem papel importante no organismo, na síntese de carnitina, que atua no transporte de ácidos graxos para a beta-oxidação na mitocôndria, na formação da matriz óssea em animais jovens e no crescimento muscular (Ribeiro *et al.*, 2003).

A lisina é utilizada como aminoácido de referência por possuir as seguintes características: assim como a treonina, é um aminoácido estritamente essencial, não havendo nenhuma via de síntese endógena; possui metabolismo orientado principalmente para deposição de proteína corporal; sua análise laboratorial, para a determinação dos seus níveis nos ingredientes, rações e tecidos, é precisa; o conhecimento da sua exigência para todas as fases de produção animal encontra-se disponível; a sua suplementação é economicamente viável nas dietas de aves e suínos, sendo a lisina um limitante em dietas de suínos e aves (Suida 2001; Ribeiro *et al.*, 2003).

Tabela 6: Composição das dietas referências com 26 e 16% de proteína bruta (D'Agostini *et al.*, 2004).

Ingredientes	Dieta com 26%	Dieta com 16%
Milho	40,70	65,41
Farelo de soja	51,20	28,53
Óleo de soja	4,40	1,54
Fosfato bicálcico	1,90	2,00
Calcário	1,00	1,17
Sal	0,37	0,40
Antioxidante (BTH)	0,01	0,01
Cloreto de colina (50%)	0,06	0,06
DL-metionina (99%)	-	0,37
L-lisina HCl	0,10	0,25
Suplemento mineral¹	0,05	0,05
Suplemento vitamínico²	0,10	0,10
Anticoccidiano³	0,10	0,10
Proteína bruta (%)	26,00	18,00
Energia metabolizável (kcal/kg)	2.951	3.050
Metionina (%)	0,50	0,66
Met + Cis (%)	0,90	0,97
Lisina (%)	1,56	1,17
Cálcio (%)	0,99	1,00
Fósforo disponível (%)	0,45	0,45

¹ kg do produto: Fe-80g, Cu-10g, Co-2g, Mn-80g, Zn-50g, I-1g e excipiente q.s.p.-500 g.

² kg do produto: Vit. A-15.10⁶ UI, Vit. D3-1,5 10⁶ UI, Vit. E-15. 10³ UI, Vit. B1-2,0 g, Vit. B2-4,0 g, Vit. B6-3,0 g, Vit. B12-0,015 g, Ácido nicotínico 25g, Ácido pantotênico 10g, Vit. K3- 3,0g, Ácido fólico 1,0g, Colina 250g, Bacitracina de Zn 10g, Se-100mg, BHT.-10 g³ Salinomicina (6%).

O uso do conceito de proteína ideal permite a fácil adaptação a diferentes condições. Este conceito é uma ferramenta de redução do custo da ração, a partir da flexibilização do nível protéico mínimo e da melhor utilização de ingredientes alternativos (Suida, 2001). A tabela 7 mostra a relação entre os aminoácidos essenciais e a lisina.

Tabela 7: Relação ideal dos aminoácidos essenciais com a lisina das rações de frango.

Aminoácidos	Idade dos animais	
	0-21d	21-42d
Lisina	100	100
Metionina	45	38
Met + cis	82	72
Treonina	73	74
Arginina	114	110
Valina	82	82
Isoleucina	73	73
Leucina	109	109
Triptofano	18	18
Histidina	32	32

Dados do National Research Council (NCR 1994)

Sabendo-se a quantidade de aminoácidos nas dietas, é possível fazer o ajuste fino da concentração ótima de aminoácidos. A ordem de limitação dos aminoácidos nas dietas específicas é que vai determinar quais são os aminoácidos industriais necessários a serem adicionados, para manter o ótimo balanço dos aminoácidos essenciais. No caso de frangos de corte, em dietas a base de milho/sorgo e farelo de

soja, a metionina é o primeiro aminoácido limitante, depois a lisina e a treonina, como segundo e terceiro limitantes, respectivamente (Kidd & Kerr, 1996).

A suplementação com hidrolisados de penas e farinha de penas pode diminuir ou eliminar a necessidade de adição de aminoácidos industriais nas rações, o que diminuiria os gastos de produção.

1.8. Aplicação industrial das queratinases

É necessário buscar aplicações alternativas para os resíduos que muitas vezes não interessam à indústria alimentícia, como camas do aviário, aves mortas, resíduos das incubadoras e abatedouros. A compostagem é um dos métodos mais seguros economicamente e ambientalmente de reciclar esses resíduos. Nas últimas três décadas, pesquisas têm sido conduzidas para aumentar a utilização agrônômica de resíduos animais, incluindo resíduos avícolas. Durante a compostagem, matérias orgânicas são misturadas para criar um ambiente úmido e aeróbio onde decomposição e humificação (formação de húmus) da matéria orgânica ocorrem mais rapidamente, podendo então ser aplicado em solos cultivados como fertilizante (Tiquia *et al.*, 2005). Como a degradação da pena é lenta, o uso de microrganismos queratinolíticos poderia agilizar o processo de decomposição. Foi observado que *Bacillus licheniformis* (OWU 1411T) e *Streptomyces* sp. (OWU 1441) aumentam a degradação da queratina e formação de biofilme quando atuam cooperativamente na compostagem de resíduos avícolas (Ichida *et al.*, 2001). Ichida *et al.* (2001) relataram que penas incubadas na ausência de inóculo bacteriano tiveram pouca degradação, mantendo alguma resistência e sua forma, enquanto as penas inoculadas com os microrganismos foram difíceis de serem identificadas após 28 dias de compostagem.

Estudos recentes apontam que hidrolisados de penas são um produto potencialmente útil como fertilizante de liberação lenta de nitrogênio, uma vez que penas têm cerca de 15% de nitrogênio (Ichida *et al.*, 2001). Eles podem ser usados principalmente em fazendas orgânicas onde fontes orgânicas ricas são usadas para aumentar o crescimento da planta e intensificar a atividade microbiana no solo (Gupta & Ramnani, 2006).

As queratinases podem também ser usadas no tratamento de resíduos queratinolíticos animais, como cascos, chifres, pêlos, uma vez que durante a decomposição não controlada da queratina, principalmente por bactérias anaeróbias, é liberada uma grande quantidade de sulfeto de hidrogênio e amônia (Singh, 2002).

Na indústria de couro, as queratinases podem ser empregadas para depilar a pele durante o processamento do couro, em substituição ao sulfeto de sódio (Nilegaonkar *et al.*, 2007). Para o uso em depilação, uma etapa que agrega pouco valor ao produto e que atualmente é realizada por processos com custos muito baixos, uma enzima deverá ter uma atividade específica alta (não pode agir sobre o colágeno) aliada a uma grande estabilidade e ter um custo de produção aceitável pelo mercado (Dayanandan *et al.*, 2003). Até o momento, o uso desta tecnologia é restrito, pois as queratinases disponíveis não possuem todas as propriedades necessárias ao uso industrial, o que eleva os custos a um patamar que não é economicamente rentável. Além disso, a especificidade da maioria das queratinases já descritas não é bem conhecida, mas elas geralmente agem sobre várias outras proteínas além da queratina (Bon & Vermelho, 2004).

Há muitos outros usos diferentes para as queratinases, como na eliminação de queratina em acne ou psoríase (Vignardet *et al.*, 2001) e na eliminação de calo humano, como vem sendo estudado através do uso de duas serina peptidases produzidas por *Kyptococcus sedentarius* (Longshaw *et al.*, 2002). As queratinases

também podem ser aplicadas em pomadas para uso humano e veterinário e na produção de aminoácidos essenciais ou peptídeos a partir de moléculas de alta massa molecular. Queratinases também podem ser usadas na fabricação de filmes biodegradáveis de queratina, em detergentes, na digestão de resíduos avícolas para gerar gás natural e modificação de fibras de lã e seda. Uma vez reportada a degradação de Prion pela queratinase de *B. licheniformis* PWD1, tem-se discutido seu uso como descontaminante de equipamento médico e laboratorial (Gupta & Ramnani, 2006; Müller-Hellwing *et al.*, 2006). As queratinases também têm aplicação no desenvolvimento de hidrolisados de queratina com aplicação na indústria de cosméticos.

II. OBJETIVOS

Tendo em vista o desenvolvimento da avicultura no Brasil nos últimos anos e todo o potencial do uso das queratinases no aproveitamento de penas e desenvolvimento de rações mencionados anteriormente, este trabalho foi desenvolvido objetivando melhorar as condições de cultivo de microrganismos queratinolíticos capazes de degradar penas e farinha de penas para a produção de queratinase e subseqüentemente hidrolisados de queratina, transformando um subproduto com pouco ou nenhum valor agregado em suplemento protéico para ração de aves.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- **Selecionar e identificar microrganismos queratinolíticos a partir de isolados da indústria avícola**

Resíduos obtidos da indústria RICA, como penas, resíduos de silos e restos de farinhas de penas foram usados para o isolamento de microrganismos produtores de queratinases. Microrganismos Gram-positivos e esporulados foram selecionados quanto à capacidade de degradação de penas e farinha de penas. Estes microrganismos foram identificados por meio de provas bioquímicas, fisiológicas, citomorfológicas, entre outros testes.

- **Determinar a classe enzimática das queratinases e peptidases dos microrganismos queratinolíticos selecionados**

As queratinases e peptidases dos microrganismos queratinolíticos produzidas na presença de penas ou farinha de penas foram avaliadas por zimografia com gelatina e queratina para observação de alterações no perfil proteolítico na presença destes dois substratos. Foram usados inibidores de peptidases para determinar as classes enzimáticas das peptidases e queratinases produzidas por esses microrganismos.

- **Avaliar o uso de meios de propagação para ativar a produção das queratinases**

O microrganismo escolhido foi cultivado em vários meios para propagação de células. Estas células foram inoculadas no meio de fermentação e a produção de enzimas foi acompanhada para determinar se o meio de propagação de inóculo afeta a produção de queratinases.

- **Otimizar a produção de queratinases e hidrolisados de queratina obtidos por degradação microbiana**

O microrganismo selecionado teve suas condições de produção de queratinases otimizada avaliando parâmetros como concentração de substrato, quantidade de inóculo, temperatura, concentração de sais, fonte suplementar de carbono e nitrogênio, entre outros.

- **Avaliar a degradação enzimática de penas e de farinha de penas por queratinases (extrato enzimático bruto)**

Este experimento foi realizado visando determinar se as enzimas, na ausência do microrganismo, eram também capazes de degradar penas ou farinha de penas. Após a hidrólise enzimática dos substratos, as penas e farinha de penas foram submetidas ao teste de digestão *in vitro* para determinar se há modificação da digestibilidade deste substratos.

- **Utilizar os hidrolisados provenientes dos processos fermentativos para incorporação em ração por extrusão termoplasmática e determinar suas propriedades físicas e químicas.**

O hidrolisado de queratina da fermentação de penas de frango foi adicionado à farinha de milho e submetido à extrusão termoplasmática. Foi determinada a concentração de sobrenadante de cultura adicionada à ração. O extrusado foi avaliado quanto à sua composição química e de aminoácidos, para avaliar se é possível utilizar o hidrolisado de queratina de penas em ração.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substratos usados em meios de cultura: penas e farinha de penas

Neste trabalho foram utilizadas penas de contorno, por serem as mais abundantes e por possuírem a raque mais flexível, e brancas, para evitar possíveis interferências de pigmentos nos ensaios espectrofotométricos. As penas utilizadas foram previamente lavadas exaustivamente com detergente, bem enxaguadas com água corrente e secas overnight a 60°C. Em seguida, as penas foram delipidadas por tratamento com solução de clorofórmio: metanol (1:1 v/v) sob agitação (300 rpm/1h) e novamente secas overnight a 60°C.

A farinha de penas foi cedida pela indústria avícola Rica e utilizada sem tratamento prévio. A farinha de penas utilizada continha 0,075% de extrato etéreo, 0,73% de cinzas, 0,2025% de nitrogênio total, 98,29% de umidade e granulometria média de 0,42mm.

3.2. Obtenção de queratina em pó a partir de penas de frango

Penas brancas de frango lavadas e delipidadas foram usadas para a extração de queratina. A queratina foi extraída das penas com DMSO (dimetil sulfóxido) a 100°C (Warzkiewicz, Lobarewski & Wolski, 1987) sob refluxo. O substrato solubilizado foi precipitado com dois volumes de acetona e incubado a 4°C por 48 horas. Esta mistura foi centrifugada a 3000rpm por 15 minutos e o precipitado lavado duas vezes com água destilada (3000 rpm/ 15 minutos). A queratina foi seca a 4°C por 24-48 horas e macerada em gral até se obter um pó fino e homogêneo. O pó obtido foi incorporado em gel de poliacrilamida para análise zimográfica de queratinases e usado como substrato em dosagem de atividade queratinolítica.

3.3. Seleção e identificação da atividade queratinolítica de microrganismos da coleção de microrganismos queratinolíticos

Inicialmente, os microrganismos queratinolíticos foram isolados de resíduos da indústria avícola RICA (penas, farinhas e outros materiais), através do método de enriquecimento nos meios extrato de levedura e Sabouraud (formulações a seguir) por 4 dias a 37°C, seguido pelo esgotamento em estrias nos mesmos meios por 48 horas a 37°C de incubação. As colônias isoladas foram inoculadas em tubos com solução salina (NaCl 0,85%) contendo uma pena. As amostras que apresentaram crescimento foram repicadas no meio extrato de levedura sólido e armazenadas a 4°C após incubação a 37°C por 48 horas.

Oito destas amostras (todas Gram-positivas e esporuladas, características de *Bacillus* spp. e gêneros correlatos) foram inoculadas em meio extrato de levedura por 72 horas sob agitação (300 rpm) à temperatura ambiente ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) para obtenção de massa celular. As células foram lavadas duas vezes com salina estéril, centrifugadas (3500 rpm/ 20min) para remoção de resíduos do meio de propagação e inoculadas em meio contendo penas ou farinha de penas como principal fonte de carbono e nitrogênio (formulações a seguir). A incubação foi feita por 7 dias sob agitação constante (300 rpm) à temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi centrifugado (3000 rpm/ 20 min) e o sobrenadante de cultura foi avaliado quanto à atividade queratinolítica, gelatinolítica e determinação da concentração de proteínas. O restante do sobrenadante foi concentrado vinte vezes em membrana de diálise com limite de exclusão de 9000 Da contra polietilenoglicol 4000 “overnight” a 4°C para análises zimográficas (com gelatina e queratina) e enzimográficas. As penas e farinha de penas restantes no meio de cultura foram secas por 48 horas a 60°C para determinar o percentual de degradação do substrato por perda de peso seco. A classe enzimática das peptidases nas amostras também foi determinada.

A amostra que apresentou melhor atividade sobre penas e farinha de penas foi *Bacillus subtilis* AMR, este foi selecionado para os experimentos seguintes.

Meios de cultura utilizados

Extrato de levedura

Extrato de levedura.....	0,5%
Peptona.....	0,5%
KCl.....	2,0%
Sacarose.....	2,0%
Agar (para meio sólido).....	2,0%

Sabouraud

Glicose.....	2,0%
Peptona.....	1,0%
Extrato de levedura.....	0,5%
Agar (para meio sólido).....	2,0%

Meio Penas para seleção de microrganismos queratinolíticos

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O 0,06M.....	72 mL
KH ₂ PO ₄ 0,04M.....	28 mL
Penas.....	1,0% (p/v)
Extrato de levedura.....	0,01%
pH.....	7,2

Meio Farinha de Penas para seleção de microrganismos queratinolíticos

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O 0,06M.....	72 mL
KH ₂ PO ₄ 0,04M.....	28 mL
Farinha de penas.....	1,0%
pH.....	7,2

3.4. Identificação dos microrganismos queratinolíticos

Os microrganismos foram identificados através de provas bioquímicas e fisiológicas, através de citomorfologia e produção de antimicrobianos. Os testes de identificação foram realizados por Jeane Quintanilha Chaves, sob coordenação do Dr. Leon Rabinovitch no Laboratório de Fisiologia Bacteriana (Laboratório de Referência Nacional para Carbúnculo/ Coleção de Cultura do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos), do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz.

3.5. Análises quantitativas

3.5.1. Dosagem da atividade queratinolítica

A atividade enzimática foi medida com base na metodologia descrita por Grywnowicz *et al.* (1989), usando como substrato queratina extraída de penas. 1,5 mL de uma suspensão de queratina a 0,67% (p/v) em tampão fosfato pH 7,4 (91,2 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06M e 8,8 mL de KH_2PO_4 0,04M) ou glicina pH 9,0 (85 mL de glicina 0,2M e 15 mL de NaOH 0,2M) foi adicionada a 1 mL de sobrenadante de cultura diluído 5 vezes. Após 1 hora de incubação a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 1mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e refrigerada a 4°C por 30 minutos. O branco foi obtido com a adição do TCA antes da incubação. A mistura de reação foi centrifugada (3000 rpm/10min) para remoção do substrato não hidrolisado e o sobrenadante, lido em espectrofotômetro a 280 nm. Uma unidade de atividade queratinolítica foi definida como a quantidade da enzima que causa um aumento na absorvância de 0,01 a 280 nm.

3.5.2. Dosagem da atividade gelatinolítica

A 100µL de sobrenadante de cultura (ou extrato enzimático) foram acrescentados 400µL de tampão fosfato pH 7,4 (91,2 mL de Na₂HPO₄.7H₂O 0,06M e 8,8 mL de KH₂PO₄ 0,04M, para seleção dos microrganismos) ou glicina pH 9,0 (85mL de glicina 0,2M e 15mL de NaOH 0,2M, para a amostra *B. subtilis* AMR) e 750µL de gelatina a 1%. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 30 minutos, e 375µL desta solução foi colocada em tubos contendo 500µL de isopropanol. O branco é obtido pelo acréscimo de 375 µL de mistura de reação antes da incubação. Após o período de incubação, os tubos foram deixados por 15 minutos na geladeira e então centrifugados (3500 rpm/ 15 min) (Jones *et al.*, 1998). Cem microlitros do sobrenadante foram usado para dosar proteína pelo método de Lowry. Uma unidade de atividade gelatinolítica foi definida como a quantidade da enzima que causa a liberação de 1µg de proteína nas condições acima.

3.5.3. Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas presentes nos sobrenadantes de cultura foram quantificadas segundo o método de Lowry *et al.* (1951), usando soro albumina bovina como padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

3.6. Análises qualitativas

3.6.1. Zimografia com substrato gelatina e queratina

Aos sobrenadantes concentrados foi adicionado o tampão da amostra para peptidase [tampão Tris-HCl 0,32M, pH 6,8; glicerol 48% (v/v); dodecil sulfato de sódio 8% (p/v) e azul de bromofenol 0,06% (p/v)] na proporção 6:4 (60 µL de amostra para 40 µL de tampão da amostra para peptidase). As amostras foram aplicadas (20-30 µL) no gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970) a 12,5% contendo

1% (p/v) de gelatina ou queratina co-polimarizada (Heussen & Dowdle, 1980). A corrida foi realizada a 170V por 2,5 horas a 4°C. Após a corrida, os géis foram lavados com Triton X-100 2,5 % (v/v) duas vezes por 15 minutos sob agitação (70 rpm/ mim) para a remoção do SDS. Em seguida, os géis foram incubados por 48 horas a 37°C em tampão ácido cítrico pH 5,0 (48,5 mL de ácido cítrico 0,1M e 51,5 mL de Na₂HPO₄ 0,2M). Para detecção da atividade proteolítica, os géis foram corados com coomassie blue [5 mL de solução estoque (coomassie blue 2% p/v); 4 mL de ácido acético; 20 mL de metanol e 11mL de água destilada] “overnight” e descorados com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v), sob agitação, até o aparecimento de bandas de degradação.

3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

O SDS-PAGE foi empregado para determinar qualitativamente a presença de proteínas no sobrenadante de cultura concentrado, em especial a queratina, uma proteína de aproximadamente 10 kDa liberada pela degradação da pena. O sobrenadante de cultura concentrado foi diluído (6:4) em tampão da amostra para proteínas [300µL de tampão da amostra (Tris-HCl 0,15M pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol 10,8% v/v), 10 µL de 2-mercaptoetanol e 10µL de azul de bromofenol 0,1%], aquecido a 100°C por cinco minutos para desnaturação das proteínas, e aplicado (30 µL) no gel de poliacrilamida a 15% (Laemmli, 1970). A corrida foi realizada a 170V por 2,5 horas, e o gel incubado em solução de coomassie blue [5 mL de solução estoque (coomassie blue 2% p/v); 4mL de ácido acético; 20 mL de metanol e 11mL de água destilada] “overnight” e descorado com a solução metanol: ácido acético: água (50:10:40 v/v/v) sob agitação (70 rpm/ mim) até o aparecimento de bandas.

3.6.3. Enzimografia

A degradação do substrato queratina também foi avaliada através de enzimografia. Vinte microlitros de sobrenadante de cultura das bactérias queratinolíticas contendo 5µg de proteínas (mensuradas pelo método de Lowry) foram incubados com 20µL de uma solução contendo 5 µg de queratina em pó em água destilada. A mistura de reação foi incubada por 1 hora a 37°C, e então acrescida de 40 µL de tampão da amostra para proteínas [300 µL de tampão da amostra (Tris-HCl 0,15% pH 6,8, SDS 0,5%, glicerol a 10,8% v/v), 10µL de 2-mercaptoetanol e 10 µL de azul de bromofenol 0,1%] e aquecida a 100°C por 5 min. Foram feitos controles com a solução de queratina e com os sobrenadantes de cultura. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15% (item 3.6.2). A corrida foi realizada a 170V por 2,5 horas e o gel, corado pelo método de coloração da prata.

3.7. Identificação da classe enzimática das peptidases e queratinases dos microrganismos queratinolíticos selecionados

Os sobrenadantes concentrados das amostras foram submetidos à zimografia com substrato gelatina e queratina. Os géis foram incubados em tampão de proteólise pH 5,0 (48,5 mL de ácido cítrico 0,1M e 51,5 mL de Na₂HPO₄ 0,2M), com os seguintes inibidores de peptidase separadamente: pepstatina 10µM (inibidor de aspártico peptidases), 1,10-fenantrolina 10mM e EDTA 0,26M (ácido etilenodiaminotetracético) (inibidores de metalopeptidases), PMSF 1mM (fenilmetil sulfonil fluoreto) (inibidor de serina peptidases) e E-64 5 µM (L-trans-epoxisuccinil L-leucilamida-(4-guanidino)-butano) (inibidor de cistéina peptidases).

3.8. Efeito do meio de propagação de células na produção de queratinases no meio de fermentação (ativação de inóculo)

A ativação de inóculo consiste em utilizar no meio de propagação do microrganismo o substrato usado no meio de fermentação, a fim de adaptá-lo a produzir a enzima de interesse. A principal função do inóculo ativado é diminuir ou suprimir a fase de adaptação do microrganismo no meio de fermentação. Cinco meios de propagação foram testados, variando o substrato (penas ou farinha de penas obtida da moagem das penas) e a concentração de extrato de levedura, são eles:

Composição base de sais (meio base) pH 8,0

Na₂HPO₄.7H₂O 0,06M.....95 mL

KH₂PO₄ 0,04M.....5 mL

MgSO₄.7H₂O.....0,02%

NaCl.....0,05%

CaCl₂.2H₂O.....0,01%

Meio 1 - extrato de levedura (item 3.3)

Meio 2

Meio base

Penas.....1%

Extrato de levedura.....0,01%

Meio 3

Meio base

Penas.....1%

Extrato de levedura.....0,1%

Meio 4

Meio base

Farinha de penas.....1%

Extrato de levedura.....0,01%

Meio 5

Meio base

Farinha de penas.....1%

Extrato de levedura.....0,1%

Após a inoculação do *B. subtilis* AMR nos meios de propagação, estes foram incubados por 72h à temperatura ambiente sob agitação constante (300 rpm/ min). Ao final do período de incubação, as células foram lavadas (2 vezes a 3000 rpm/ 20 min), contadas pelo método de contagem em placa utilizando o meio Sabouraud, e um volume correspondente a uma contagem inicial de 10^8 UFC/mL foi inoculado no meio de fermentação (mesma composição do meio 2).

O meio de fermentação foi incubado à temperatura ambiente sob agitação constante (300 rpm) por 8 dias. Diariamente foi retirada uma alíquota para análise das atividades queratinolíticas, gelatinolíticas e determinação das concentrações de proteínas. Os sobrenadantes de cultura dos meios de propagação foram concentrados contra polietilenoglicol para análises zimográficas.

3.9. Otimização da produção de queratinases em penas

Nestes experimentos buscou-se as melhores condições de cultivo da amostra selecionada para a produção de queratinases e de hidrolisados de penas.

Após o cultivo em meio extrato de levedura por 72 horas sob agitação (300rpm) à temperatura ambiente para obter massa celular, as células de *Bacillus*

subtilis AMR foram lavadas duas vezes com salina estéril (3000 rpm/20min) e inoculadas em diferentes meios contendo penas, tamponado com tampão fosfato pH 8,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06M e KH_2PO_4 0,04M). Os meios estão apresentados nos itens seguintes. A contagem inicial dos meios foi de 10^8 UFC/mL, contado pelo método de contagem em placa.

Os meios de cultura foram incubados por 6 dias sob agitação (300rpm). Ao final deste período, os meios fermentados foram centrifugados (3000 rpm/ 20 min) para separação das células. Parte do sobrenadante foi usado em dosagens (atividade queratinolítica, gelatinolítica e determinação da concentração de proteína) e parte foi concentrada 20 vezes em membrana (exclusão de 9000 Da) contra PEG 4000 “overnight” a 4°C, para análises zimográficas com gelatina e queratina.

3.9.1. Estudo da influência de fontes suplementares de carbono na produção de queratinase e degradação de penas

Diferentes fontes de carbono suplementares foram testadas para averiguar seu efeito sobre a produção de queratinases. O meio usado para este experimento foi o meio base de sais (item 3.8), acrescido de 1% de penas. As fontes adicionais de carbono (açúcares e proteínas) testadas foram glicose, sacarose, milhocina, caseína, gelatina e extrato de levedura, todas nas concentrações de 0,01 e 0,05%. Um meio sem fonte adicional de carbono também foi usado como controle.

3.9.2. Estudo da influência de sais na produção de queratinase e consequente degradação de penas

Para a análise da melhor composição de sais no meio de cultura foi usado planejamento experimental para 3 variáveis, com 3 níveis cada, com separação do ponto central, correspondendo a um planejamento fatorial 2^3 com 11 experimentos, e três repetições do ponto central como exemplifica a tabela 8.

Na primeira etapa, os sais testados foram $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações 0 (-1), 0,5 (0) e 1mM (+1). Na segunda etapa, obedecendo ao mesmo planejamento fatorial, os sais testados foram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, nas concentrações de 0, 0,5 e 1mM.

Tabela 8: Planejamento experimental para a avaliação do uso de sais no meio sobre a produção de queratinase.

Ensaio	Variável 1 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Variável 2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Variável 3 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	+1	+1	+1
9	+1	+1	-1
10	+1	-1	+1
11	+1	-1	-1

Em ambas as etapas o meio usado continha tampão fosfato pH 8,0, 1% de penas e 0,01% de extrato de levedura, 0,05% de glicose ou 0,05% de sacarose.

3.9.3. Estudo da influência da temperatura, do inóculo e da concentração de penas na produção de queratinase

Nestes experimentos também empregamos o planejamento experimental mostrado no item 3.9.1 em duas etapas variando a temperatura. As variáveis e níveis estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Valores utilizados para a otimização da temperatura, inóculo e concentração de substrato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura	40°C ou ~25 °C	45°C ou 30 °C	50°C ou 35 °C
inóculo	10 ⁶ UFC/mL	10 ⁷ UFC/mL	10 ⁸ UFC/mL
[penas]	0,5%	1,0%	1,5%

3.9.4. Estudo da influência de fonte de nitrogênio inorgânico suplementar na produção de queratinase

Diferentes fontes de nitrogênio suplementares foram testadas para averiguar seu efeito sobre a produção de queratinases. O meio usado para esse experimento foi o meio base de sais (item 3.8), acrescido de 1% de penas e 0,05% de sacarose. As fontes adicionais de nitrogênio testadas foram (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, KNO₃, e uréia nas concentrações de 0,6, 0,8 e 1,0%. Um meio sem fonte adicional de nitrogênio foi usado como controle.

3.10. Cinética de crescimento de *B. subtilis* AMR em condições otimizadas

Com todas as condições testadas otimizadas, foi realizada uma contagem diária de células viáveis, esporos e dosagem da atividade de malato desidrogenase para avaliar se há morte celular no meio.

A contagem de células viáveis foi realizada pela contagem em placa com meio Sabouraud, com período de incubação de 24 horas a 28°C. Para a contagem de esporos, o sobrenadante de cultura foi previamente aquecido a 90°C por 20 minutos para eliminação de células viáveis e depois foi feita uma contagem em placa, com incubação de 24 horas à mesma temperatura.

A determinação de células mortas no meio de fermentação foi feita pelo método indireto da dosagem de malato desidrogenase. Esta dosagem baseia-se na redução de oxaloacetado a malato, com gasto de $\text{NADH}+\text{H}^+$ pela ação da malato desidrogenase, uma enzima intracelular. A mistura de reação consiste de tampão 860 μL de Tris HCl 50mM pH 7,4, 20 μL de ácido oxaloacético 20mM, 20 μL de NADH, 7,5mM e 100 μL de sobrenadante de cultura. A reação foi realizada à temperatura ambiente por 3 minutos. A leitura foi realizada a 340 nm.

3.11. Otimização da produção de queratinases em farinha de penas

Estes experimentos foram realizados para buscar as melhores condições de cultivo da amostra selecionada para a produção de queratinases na presença de farinha de penas comercial.

A amostra selecionada foi cultivada em meio extrato de levedura por 72 horas sob agitação (300 rpm) à temperatura ambiente para obter massa celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com salina estéril (3000 rpm/20 min) para remoção dos componentes do meio antes de serem inoculadas em diferentes meios com farinha de penas. Os meios serão apresentados nos itens seguintes.

3.11.1. Efeito do pH na atividade queratinolítica e degradação de farinha de penas

Este experimento buscou o melhor pH de fermentação para a produção de queratinase em meios contendo apenas 1% de farinha de penas tamponados nos valores de pH 5 (tampão ácido cítrico: ácido cítrico 0,1M e Na₂HPO₄ 0,2M), 6, 7, 8 (tampão fosfato: Na₂HPO₄.7H₂O 0,06M e KH₂PO₄ 0,04M) e 9 (tampão glicina: ácido aminoacético 0,2M e NaOH 0,2M). A contagem inicial foi de 10⁸UFC/mL, contado pelo método de contagem em placa utilizando o meio Sabouraud.

Os meios de cultura foram incubados por 6 dias à temperatura ambiente sob agitação (300 rpm). Ao final dos 6 dias, os sobrenadantes de cultura foram separados das células por centrifugação (3000rpm/ 20min), e destinados a dosagens de atividade queratinolítica, gelatinolítica e determinação da concentração de proteína.

3.11.2. Efeito de fontes suplementares de carbono na produção de queratinases

Diferentes fontes de carbono adicionais foram testadas para avaliar sua influência sobre a atividade queratinolítica do microrganismo. O meio usado continha 1% de farinha de penas tamponada com tampão fosfato pH 8,0. O inóculo foi calculado de tal forma que a contagem inicial foi de 10⁸UFC/mL. As fontes adicionais de carbono foram extrato de levedura, sacarose e cana-de-açúcar nas concentrações de 0,01 e 0,05%. O caldo de cana foi dosado pelo método de Somogyi (Marais, De Wit & Quicke, 1966) e foi usado no meio de cultura nas concentrações citadas acima referente a açúcares redutores.

Após 6 dias de incubação à temperatura ambiente sob agitação (300 rpm), os sobrenadantes de cultura foram separados das células por centrifugação (3000rpm/20min), e destinados a dosagens.

3.11.3 Efeito da concentração de farinha de penas na degradação do substrato e atividade queratinolítica

Este experimento visou determinar qual a concentração máxima de farinha de penas que pode ser usada no meio de fermentação. As concentrações testadas foram: 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15%. O inóculo inicial foi de 10^8 UFC por grama de farinha utilizada. Desta forma, concentrações maiores de farinha não ficarão prejudicadas por um número menor de células no meio de fermentação.

Os meios de cultura foram incubados por 6 dias à temperatura ambiente sob agitação (300rpm). Ao final deste período, os sobrenadantes de cultura foram centrifugados (3000rpm/20min), avaliados quanto à atividade queratinolítica, dosagem de proteínas e degradação de farinha de penas.

3.11.4. Efeito da concentração de farinha e sacarose na produção de queratinases

Nestes experimentos também empregou-se o planejamento experimental semelhante ao mostrado no item 3.9.2, porém usando duas variáveis, a concentração de farinha de penas e de sacarose. Diferentemente do item anterior, em que o objetivo foi buscar a maior concentração de substrato em que o microrganismo seria capaz de degradar mantendo uma atividade queratinolítica satisfatória, neste buscou-se a melhor concentração para a produção de queratinases.

Tabela 10: Valores utilizados para o melhoramento da atividade queratinolítica na presença de farinha de penas.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
farinha de penas	1%	1,5%	2%
sacarose	0	0,01%	0,05%

Os meios de cultura foram incubados por 6 e 10 dias à temperatura ambiente sob agitação (300rpm). Ao final destes períodos os sobrenadantes de cultura foram separados das células por centrifugação (3000rpm/20min) e utilizados para dosagens.

3.12. Extrusão termoplasmática

O objetivo deste experimento foi incorporar o sobrenadante de cultura proveniente do processo fermentativo com penas ou farinha de penas à farinha de milho e submeter à extrusão termoplástica. O sobrenadante de cultura e a farinha de milho foram misturados na concentração de 26%.

As misturas foram extrusadas num extrusor da marca BRABENDER, modelo 20DN (Duisburg, Alemanha), constituído por um único parafuso com taxa de compressão de 1:3. Foi utilizada uma matriz circular de 3 ou 4 mm e a taxa de alimentação foi de 5 kg/h aproximadamente. As temperaturas das três zonas de aquecimento foram: zona 1 e 2 mantidas constantes às temperaturas de 50 e 100°C, respectivamente, e a temperatura da zona 3 variou de acordo com o delineamento experimental. O material extrusado foi coletado depois que o processo atingiu o equilíbrio, acompanhado pela leitura do torque do extrusor. Durante o processo o expandido foi cortado em tamanho aproximado de 4,0 cm de comprimento, seguido de desidratação a 75°C até que a umidade final alcançasse 3 a 7%. Uma parte das

amostras foi moída em moinho de disco seguido de uma moagem em cilindros, obtendo-se assim as farinhas para os testes seguintes.

Este experimento foi realizado em cooperação com a equipe do pesquisador José Luis Ramirez Ascheri, CTAA, Embrapa.

3.13. Caracterização dos produtos obtidos por extrusão quanto às suas propriedades físicas e químicas

Para a determinação da umidade, amostras das farinhas obtidas por maceração do extrusado com o hidrolisado de penas, e das farinhas usadas como matérias-primas foram pesadas e desidratadas a 105°C até a obtenção de massa constante. Na análise de extrato etéreo, as amostras previamente desidratadas foram submetidas à extração com éter etílico por cerca de 5 h, passando em seguida por um processo de evaporação. Os resíduos resultantes foram secos a 105°C até obtenção de massa constante. Das amostras dessecadas e desengorduradas foram determinadas as quantidades de cinzas e de proteínas. A proteína bruta foi determinada através do método Kjeldahl tradicional segundo a AACC (1995) com modificações usando como catalisadores o Na₂SO₄, CuSO₄ e Se, titulado com H₂SO₄ 0,1 N, usando como fator de cálculo o valor de 6,25. A quantidade de cinzas foi determinada segundo o método da AOAC (2000).

Estes experimentos foram realizados no CTAA, Embrapa.

3.14. Degradação enzimática da farinha de penas

O microrganismo selecionado foi cultivado em meio extrato de levedura por 48 horas sob agitação (300rpm) à temperatura ambiente para obter massa celular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com salina estéril (3000 rpm/ 20 min) e inoculadas nos meios otimizados para penas ou farinha de penas por 6 dias nas melhores condições. Ao final da incubação, o meio de fermentação foi

centrifugado (3000 rpm/ 20min) e o sobrenadante de cultura (extrato enzimático bruto) foi clarificado em membrana com poro de 0,45 μm , seguida de filtração em membrana com poro de 0,22 μm . O extrato enzimático bruto foi acrescido de azida sódica (0,05%) e distribuído em erlenmeyers contendo 2, 4, 6, 8 e 10% de penas ou farinha de penas (proporcional ao volume de extrato enzimático usado) autoclavadas. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente sob agitação constante (300rpm) por 24, 48, 42 e 96 horas. Ao final da hidrólise enzimática, as penas ou farinha de penas restantes foram desidratadas (60°C/ 72 h) e pesadas para avaliação de perda de massa além de submetidas ao ensaio da digestibilidade *in vitro*.

O sobrenadante da mistura de reação, coletado diariamente, foi avaliado quanto à concentração de proteínas solúveis.

3.15. Determinação da digestibilidade *in vitro*

A pena ou farinha de penas (0,02g), antes e após a fermentação microbiana, foi colocada em tubos contendo 1,5 mL de HCl 0,1M contendo 0,15 mg de pepsina, seguida da incubação a 37°C por 3h. A suspensão foi neutralizada com NaOH 0,5M e tratada com 0,4mg de pancreatina em 0,75 mL de tampão fosfato contendo 0,005M de azida sódica, e a mistura incubada por 24h a 37°C. Após a incubação, as amostras foram tratadas com 1 mL de TCA 10% e centrifugadas a 9000 rpm por 5 minutos. A proteína do sobrenadante foi mensurada pelo método de Lowry et al., (1951) e a digestibilidade foi calculada pela razão da proteína no sobrenadante e proteína na amostra.

IV. RESULTADOS

4.1. Identificação dos microrganismos queratinolíticos

As amostras da coleção de cultura de microrganismos queratinolíticos foram isoladas de resíduos da indústria avícola, como penas e farinha de penas em decomposição, através do método de enriquecimento e esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Estes isolados foram selecionados quanto à capacidade de crescimento em meio contendo penas de frangos como única fonte de carbono, nitrogênio e energia. Dentre estes microrganismos, 8 amostras de bactérias Gram-positivas formadoras de esporos foram escolhidas para identificação devido ao acentuado crescimento em penas.

A identificação destas amostras foi realizada no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz, através de avaliação bioquímica e citomorfológica dos bastonetes selecionados. A tabela 11 mostra os resultados do estudo da citomorfologia das amostras. Somada às características morfológicas apresentadas pelas cepas, as provas bioquímicas (tabela 12) realizadas e a análise de produção de antimicrobianos pela susceptibilidade de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (tabela 13), foi demonstrado que todas as cepas isoladas com atividade queratinolítica pertencem ao gênero *Bacillus*, com membros de três espécies distintas. As cepas denominadas AMR, SLC, FP4E, FP4C e PP3 foram identificadas como *B. subtilis*, conservando sua pré-nominação como nome da cepa (*B. subtilis* AMR). As amostras ABV e B1 foram identificadas como *B. licheniformis*, e a B2 como *B. cereus*. Este foi o único isolado que, por ser potencialmente produtor de toxinas (Kim, Kim & Rhee, 2001), não poderá ser explorado para produção de alimentos, o que não o elimina do uso para produção de enzimas para outros fins. A tabela 14 apresenta o número de registro desses microrganismos. As cepas foram depositadas na coleção de cultura de *Bacillus* e gêneros correlatos da Fundação Oswaldo Cruz.

Tabela 11: Resultados da citomorfologia e coloração das cepas isoladas e suas identificações

Cepas	Tamanho das células		Esporos			Mobilidade	Cepas identificadas presuntivamente ¹
	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Forma*	Deformação/ Esporângio	Posição*		
AMR	2,7	0,8	E	-	T	+	<i>Bacillus subtilis</i>
SLC	2,4	0,6	E	-	T	+	<i>Bacillus subtilis</i>
B2	3,2	1,2	E	-	ST	+	<i>Bacillus cereus</i>
ABV	,9	0,7	E	-	ST	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
FP4C	2,7	1,0	E	-	ST	+	<i>Bacillus subtilis</i>
FP4E	2,9	0,6	E	-	T	+	<i>Bacillus subtilis</i>
PP3	3,0	0,6	E	-	ST	+	<i>Bacillus subtilis</i>
B1	2,8	0,6	E	-	T	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cepa padrão	2,0 – 3,0	0,7 - 0,8	E	-	C / ST	+	<i>Bacillus subtilis</i>
Cepa padrão	3,0 -5,0	1,0 – 1,2	E	-	C / ST	+	<i>Bacillus cereus</i>
Cepa padrão	1,5 – 3,0	0,6 -0,8	E	-	C / ST	+	<i>Bacillus licheniformis</i>

Legenda:

+ = Positivo - = Negativo
 E = Elíptico ST = Sub-terminal
 T = Terminal (*) = Predominante

¹ = Vide demais provas

Tabela 12: Resultados das provas bioquímicas e fisiológicas das cepas de bastonetes Gram-positivos

Provas Bioquímicas e Fisiológicas	Cepas								Padrão		
	AMR	SLC	B2	ABV	FP4C	FP4E	PP3	B1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ANI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LEC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
TIR	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
CAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ANA	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
pH em VP	>6	>6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	>6	<6	<6
ACE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
HIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 5,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TEMP. 50°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
HEM	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
GLI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
XIL	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
MAN	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
GLI c/ Gás	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

+ = Positivo - = Negativo

Utilização do citrato (**CIT**); Hidrólise da caseína (**CAS**); Liquefação da gelatina (**GEL**); Hidrólise do amido (**ANI**); Produção da lecitinase (**LEC**); Produção de catalase (**CAT**); Produção de acetil-Metil Carbinol (**ACE**); crescimento em Meio VP (**pH em VP**); Crescimento anaeróbico (**ANA**); Redução do nitrato à nitrito (**NIT**); Crescimento em diferentes concentrações de cloreto de sódio (**NaCl 5% e 7%**); Produção de hemólise do tipo β (**HEM**); Fermentação da glicose (**GLI**); Fermentação da arabinose (**ARA**); Fermentação da xilose (**XIL**); Fermentação de manitol (**MAN**); Fermentação da glicose com pesquisa de produção de gás (**GLI c/ Gás**); Hidrólise da tirosina (**TIR**); Hidrólise do hipurato (**HIP**); Crescimento em pH 5,7 em Meio de sabouraud dextrose (pH 5,7); Crescimento na temperatura de 50°C (**TEMP. 50°C**).

Tabela 13: Produção de antimicrobianos pelas cepas selecionadas e cepas-padrão

Cepas Identificadas Cepas-Padrão	Gram-negativa	Gram-positiva
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
AMR (<i>Bacillus subtilis</i>)	NS*	S**
SLC (<i>Bacillus subtilis</i>)	NS	S
B2 (<i>Bacillus cereus</i>)	NS	NS
ABV (<i>Bacillus licheniformis</i>)	NS	S
FP4C (<i>Bacillus subtilis</i>)	NS	S
FP4E (<i>Bacillus subtilis</i>)	NS	S
PP3 (<i>Bacillus subtilis</i>)	NS	S
B1 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	NS	S
<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 14598)	NS	S
<i>Bacillus licheniformis</i> (ATCC 6384)	NS	S

* NS = Não sensível

** S = Sensível

Tabela 14: Sumário da identificação e o número de registro dos *Bacillus* spp.

Nº de Registro LFB-FIOCRUZ	Sigla da cepa	Espécie
LFB-FIOCRUZ 1266	AMR	<i>Bacillus subtilis</i>
LFB-FIOCRUZ 1267	SLC	<i>Bacillus subtilis</i>
LFB-FIOCRUZ 1268	B2	<i>Bacillus cereus</i>
LFB-FIOCRUZ 1269	ABV	<i>Bacillus licheniformis</i>
LFB-FIOCRUZ 1270	FP4C	<i>Bacillus subtilis</i>
LFB-FIOCRUZ 1271	FP4E	<i>Bacillus subtilis</i>
LFB-FIOCRUZ 1273	PP3	<i>Bacillus subtilis</i>
LFB-FIOCRUZ 1274	B1	<i>Bacillus licheniformis</i>

4.2. Seleção dos microrganismos queratinolíticos quanto à produção de queratinases em meio contendo penas e farinha de penas

Os oito microrganismos da coleção de cultura previamente identificados foram avaliados quanto à capacidade de produzir queratinases e peptidases. O rendimento de degradação em meio contendo penas ou farinha de penas como principal fonte de carbono e nitrogênio também foi calculado para as amostras.

As atividades queratinolíticas (figura 6) mais pronunciadas foram detectadas no sobrenadante de cultura das cepas de *B. subtilis* AMR e FP4E, sendo 389,48 U/ml e 446,14 U/ml em penas, e 489,88 U/ml e 351,21 U/ml em farinha de penas, respectivamente. A menor atividade queratinolítica foi observada na amostra *B. licheniformis* ABV (29,48 U/ml em penas e 137,88 U/ml em farinha de penas). A média das atividades encontradas nas duas cepas de *B. licheniformis* foi cerca de 4

vezes menor que a encontrada em *B. subtilis* AMR e FP4E, que por sua vez foi 2-3 vezes maior que a observada em *B. cereus* em penas e farinha.

Quanto a atividade gelatinolítica (figura 7), a amostra AMR destacou-se por apresentar a maior atividade gelatinolítica, 690 U/ml, 1,7 vezes maior que a amostra ABV, a segunda maior produtora de peptidases em penas. Em farinha de penas a atividade da amostra AMR foi 802,6185 U/ml, também 1,7 vezes maior que a amostra PP3, o segundo maior produtor de peptidases neste meio.

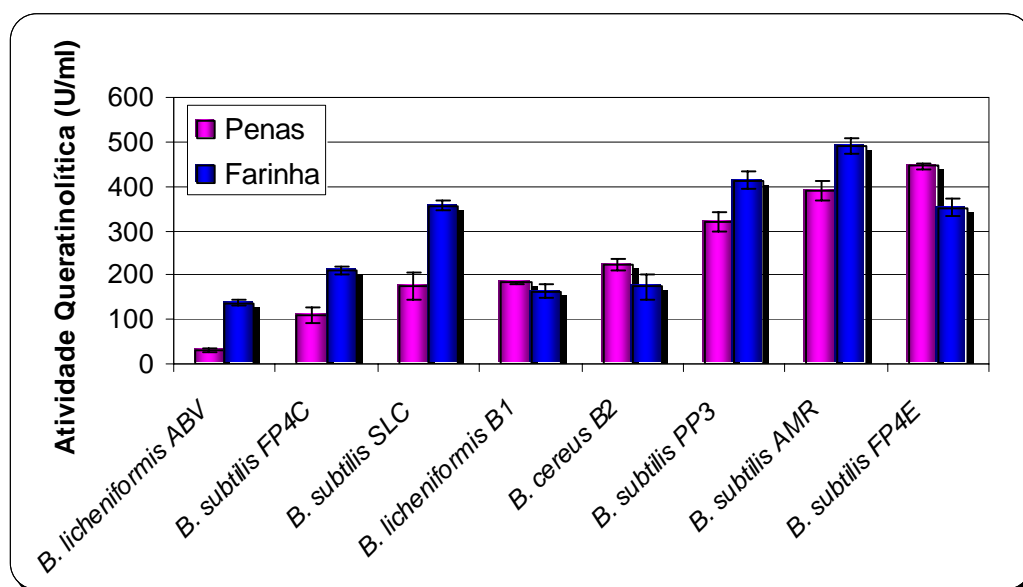


Figura 6: Atividade queratinolítica do sobrenadante de cultura das cepas de *Bacillus* spp. cultivados em meio contendo de penas ou farinha de penas após 7 dias de cultivos.

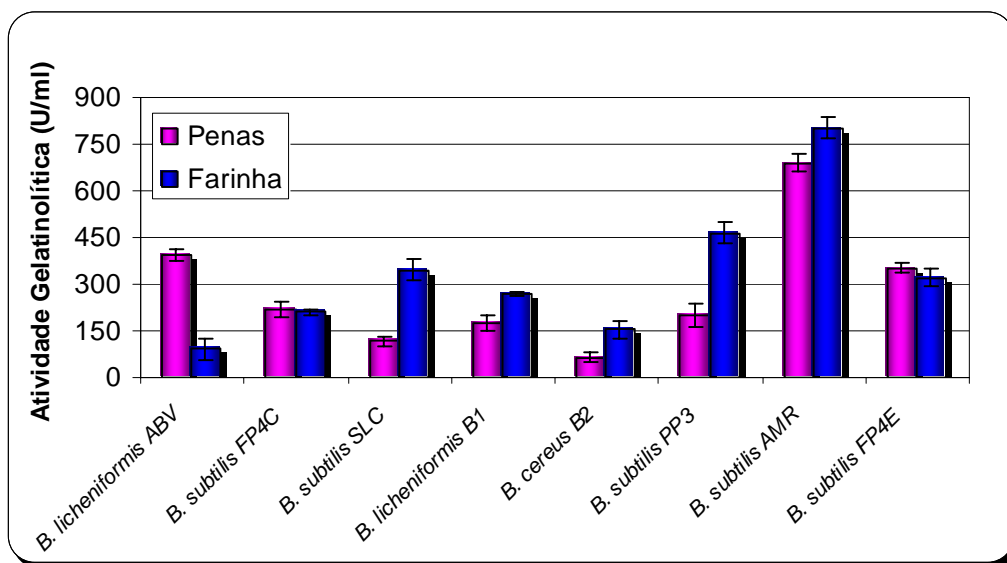


Figura 7: Atividade gelatinolítica do sobrenadante de cultura das cepas de *Bacillus* spp. cultivados em meio contendo de penas ou farinha de penas após 7 dias de cultivos.

A concentração de proteínas do meio de cultura (figura 8) e o rendimento de degradação do substrato (figura 9) também foram avaliados. Os resultados apontaram a amostra AMR como a melhor amostra para a produção de proteínas em farinha de penas (6,533 mg/ml). O sobrenadante de cultura da amostra FP4E, cultivado em meio penas, se destacou pela concentração de proteínas (3,632 ± mg/ml), mas o valor encontrado não foi muito maior que para as amostras AMR, SLC e B1 (3,044, 3,215 e 3,285 mg/ml, respectivamente), que apresentaram valores muito próximos.

Com relação ao estudo da degradação do substrato, *B. subtilis* FP4E hidrolisou 96,03% das penas e 80,8% da farinha de penas. A amostra AMR foi a segunda no consumo de farinha de penas (77,32%), assim como a cepa SLC, que apresentou rendimento de 77,22% (figura 9). A cepa SLC foi a terceira na degradação de penas, 90,57%, atrás das cepas FP4E e PP3 (94%).

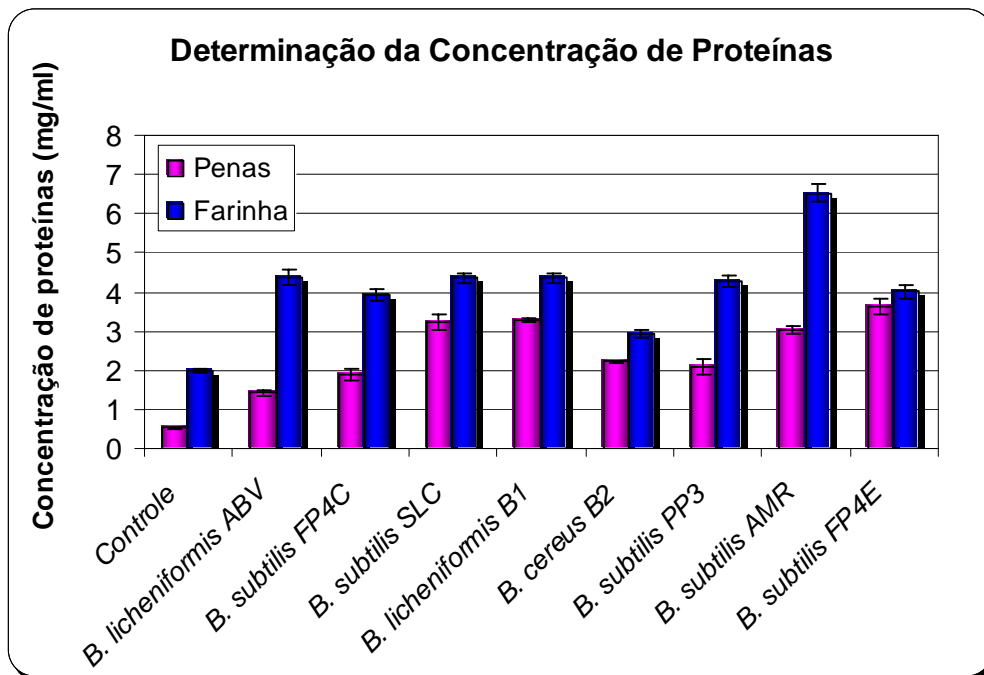


Figura 8: Concentração de proteínas solúveis no sobrenadante de cultura das cepas de *Bacillus* spp. na presença de penas ou farinha de penas após 7 dias de cultivo.

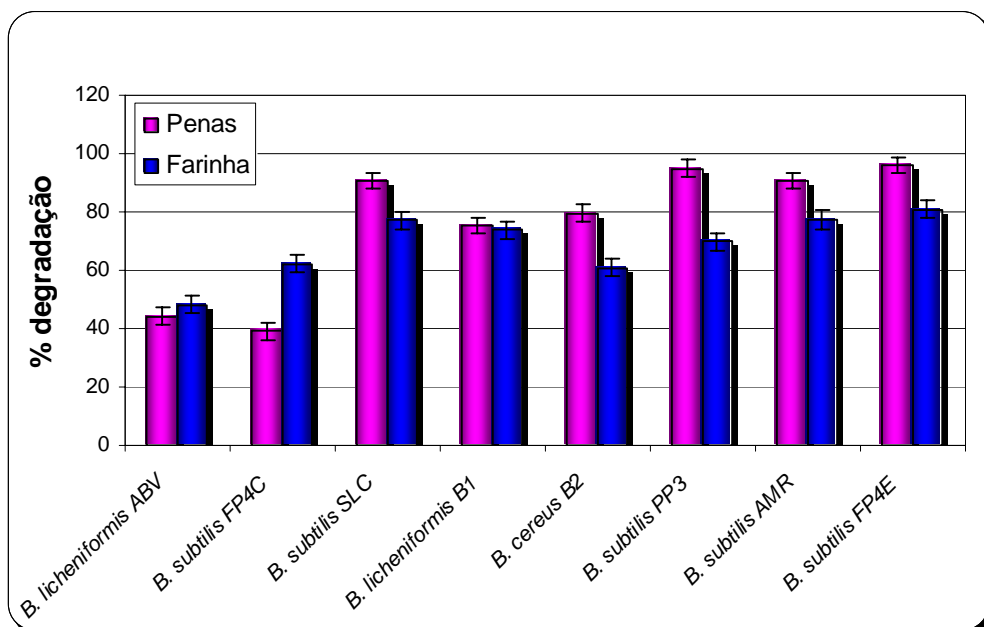


Figura 9: Rendimento da degradação de penas ou farinha de penas pelas cepas de *Bacillus* spp. após 7 dias de cultivo.

As figuras 10 e 11 mostram a zimografia dos sobrenadantes de cultura concentrados 20 vezes das cepas de *Bacillus* queratinolíticas quando cultivados em meios contendo penas ou farinha de penas como única fonte de carbono. O objetivo desta análise foi observar o perfil de bandas com o substrato gelatina (para peptidases em geral) e queratina (para queratinases), além de verificar as diferenças entre os perfis das amostras de *Bacillus*.

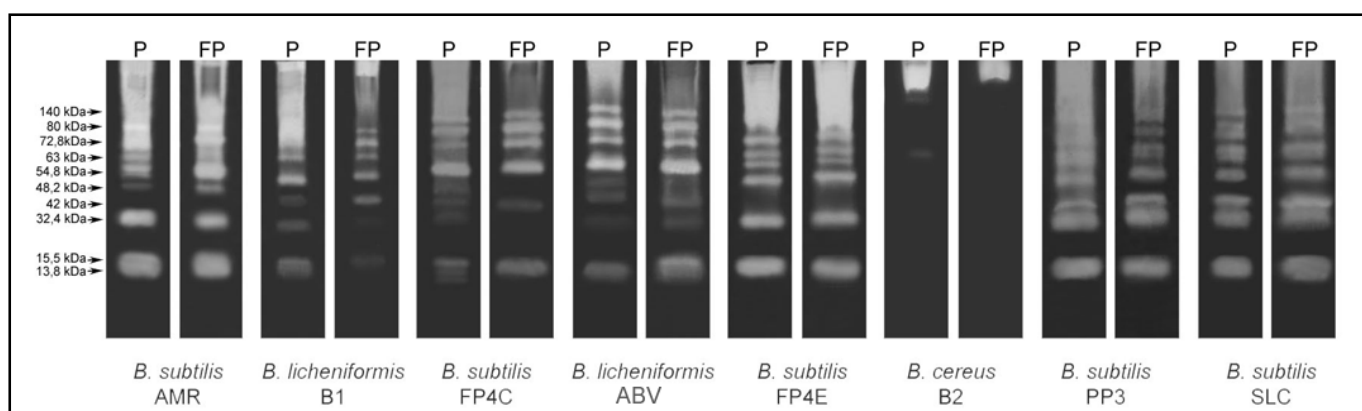


Figura 10: Zimografia com substrato gelatina das peptidases produzidas pelas cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio contendo penas (P) ou farinha de penas (FP). À esquerda, as massas moleculares calculadas utilizando como padrão fosfolipase b, albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor da tripsina e α -lactoalbumina.

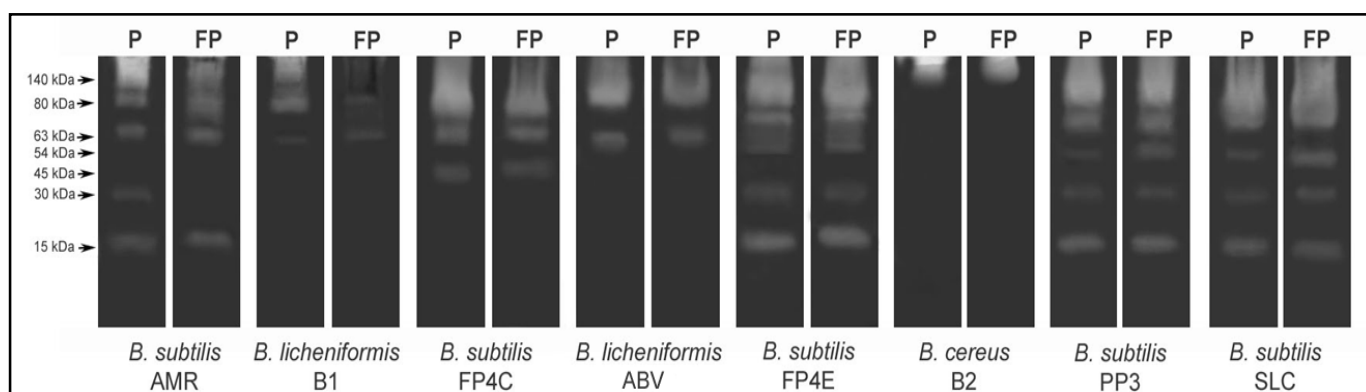


Figura 11: Zimografia com substrato queratina das peptidases produzidas pelas cepas de *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio contendo penas (P) ou farinha de penas (FP). À esquerda, as massas moleculares calculadas utilizando como padrão fosfolipase b, albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor da tripsina e α -lactoalbumina.

Como observado, todas as amostras de *B. subtilis* apresentaram um perfil de peptidases bastante semelhante, com poucas variações, como a diferença na intensidade de algumas peptidases, em especial entre as cepas FP4E e FP4C, esta com enzimas com baixa atividade migrando abaixo de 50 kDa. Nas cepas AMR e FP4E uma peptidase de 32 kDa foi detectada, enquanto que, migrando na mesma faixa, as amostras PP3 e SLC apresentaram uma banda dupla.

As diferenças no perfil de bandas em relação ao meio de cultivo dos microrganismos também foram poucas. A peptidase de 54,8 kDa, na amostra AMR, foi mais ativa quando o microrganismo foi cultivado em meio farinha de penas. Já na amostra *B. licheniformis* B1, a intensidade de todas as bandas foi menor quando este microrganismo foi cultivado em meio com farinha de penas. *B. licheniformis* ABV apresentou perfil proteolítico semelhante ao das amostras de *B. subtilis* (figura 10).

O perfil das queratinases também foi bastante parecido entre as cepas de *B. subtilis*, com exceção da cepa FP4C. Assim como houve semelhanças entre as duas cepas de *B. licheniformis*. *B. cereus* B2 foi a amostra com perfil mais discrepante. Em zimografia com queratina, não houve diferenças significativas entre as queratinases das amostras cultivadas em meio com penas ou farinha de penas (figura 11).

A enzimografia com substrato queratina (figura 12) foi realizada para demonstrar que as cepas de *Bacillus* efetivamente degradam queratina. O sobrenadante de cultura bruto das amostras (cultivadas em meio contendo penas) foi incubado com uma solução de queratina por 1h (Item 3.6.3). Todas as amostras foram capazes de hidrolisar queratina extraída de penas de frangos, como mostra a figura 12. A enzimografia mostra que há uma proteína migrando na mesma faixa que a queratina extraída de penas no sobrenadante de cultura das amostras (exceto *B. cereus* B2), indicando que durante o crescimento dos *Bacillus* em penas há a

liberação de queratina para o meio (linha 1 do gel). A linha 2 mostra a presença de queratina na mistura de reação, esta é degradada durante o período de incubação (linha 3), o que leva à redução de intensidade ou desaparecimento da banda de aproximadamente 10 kDa (queratina). Nas amostras *B. licheniformis* B1, *B. subtilis* FP4C e *B. subtilis* SLC observou-se um fragmento protéico inferior a 10 kDa, que pode ser produto da hidrólise da queratina.

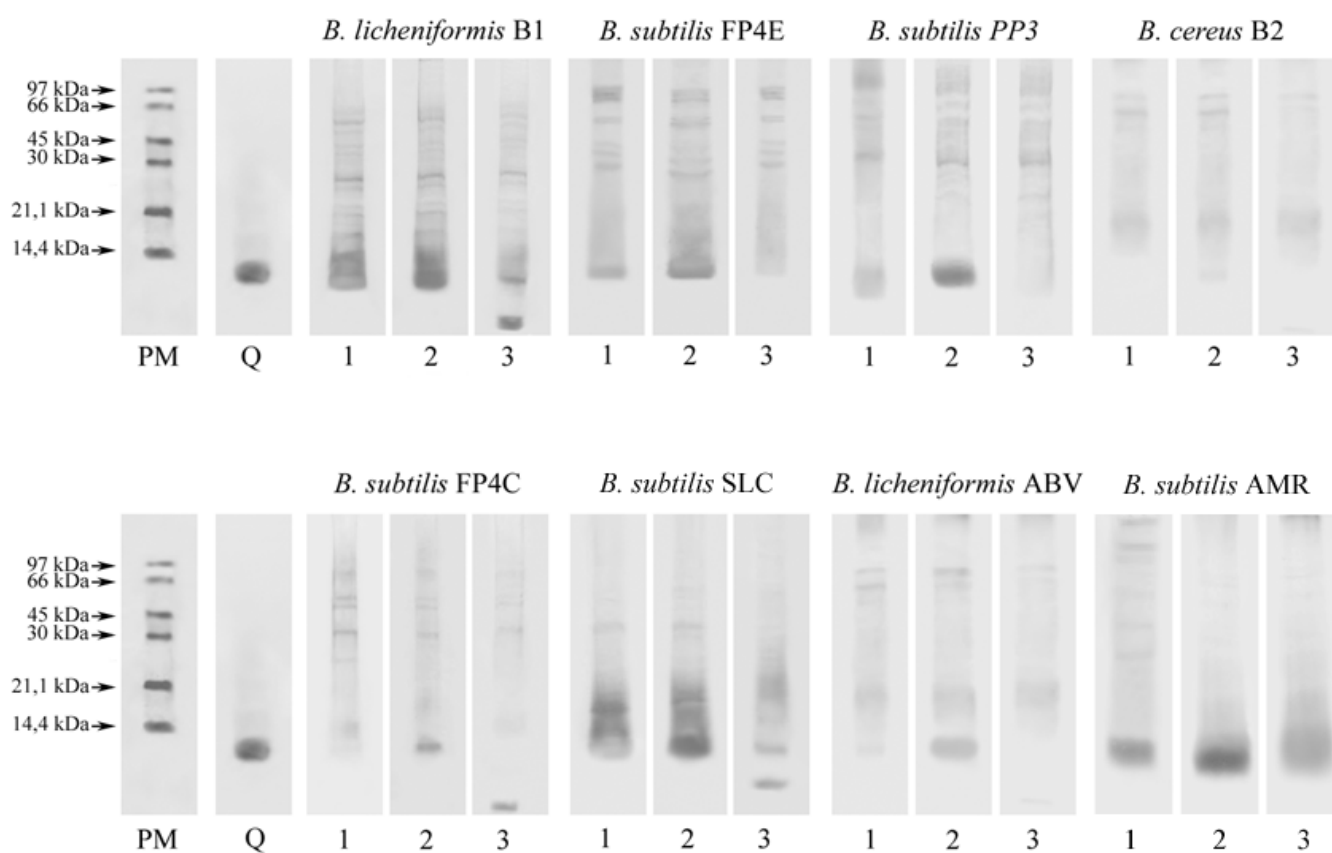


Figura 12: Enzimografia com substrato queratina utilizando sobrenadante de cultura das cepas de *Bacillus* após 7 dias de cultivo em meio contendo penas. Padrão de peso molecular (PM): fosfolipase b, albumina bovina, ovoalbumina, anidrase carbônica, inibidor da tripsina e α -lactoalbumina. Queratina de penas (Q). 1: controle dos meios de cultura; 2: controle da reação (sobrenadante de cultura e substrato antes da incubação); 3: mistura de reação após 1 hora de incubação a 37°C.

As peptidases produzidas por *Bacillus* foram identificadas como serina peptidases (figura 13). Apesar de todas as amostras apresentarem inibição por PMSF (inibidor de serina peptidases), a amostra *B. subtilis* PP3 teve sua atividade aumentada na presença de EDTA, enquanto as peptidases que migram na faixa de 72,8 e 54,8 kDa da amostra *B. subtilis* AMR foram inibidas por este quelante de íons divalentes, indicando a participação de íons na atividade enzimática destas peptidases. Todas as queratinases foram inibidas apenas por PMSF, logo podem ser classificadas como serina peptidases (figura 14).

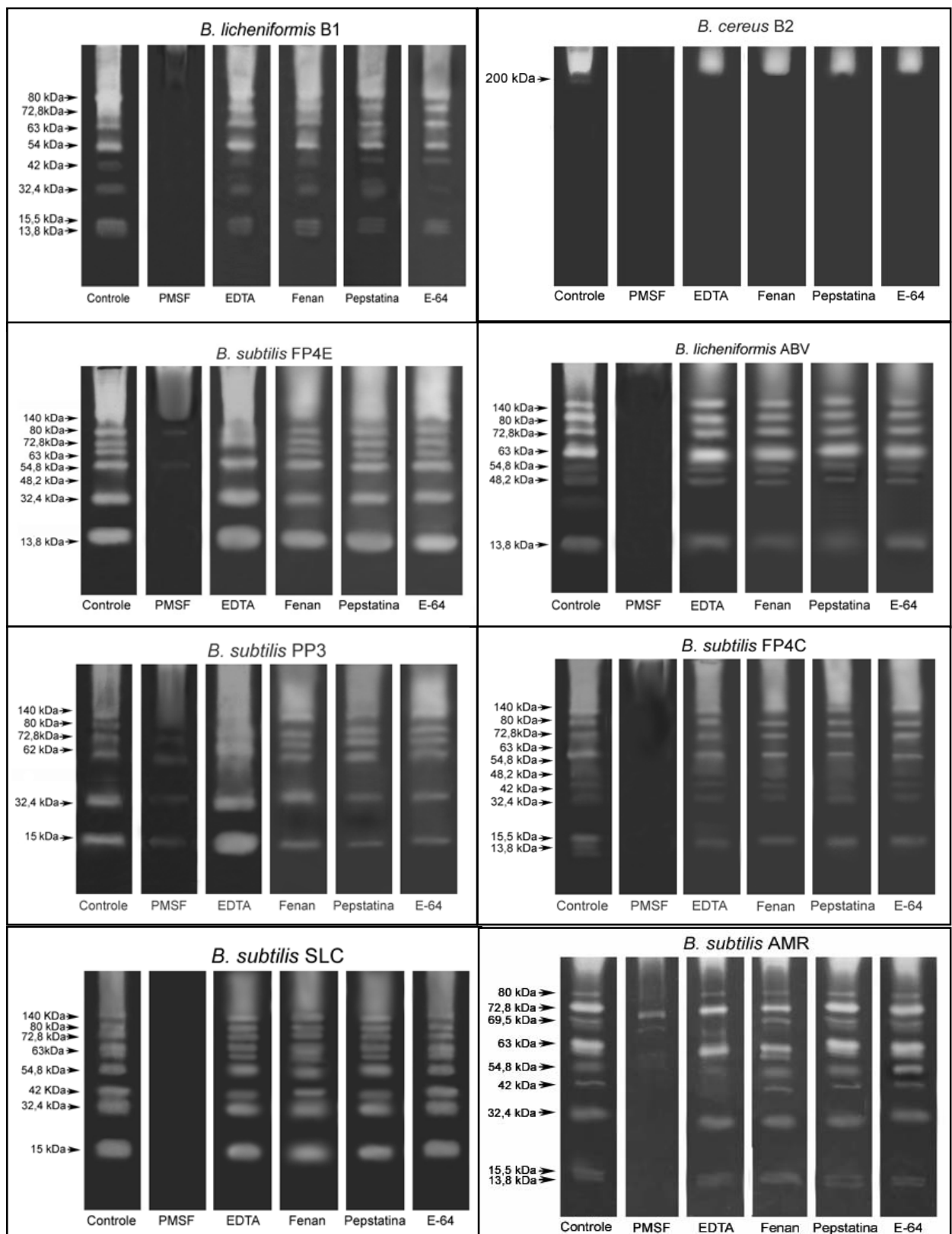


Figura 13: Determinação da classe enzimática das peptidases das cepas *Bacillus* spp. Os géis foram incubados na ausência ou presença dos seguintes inibidores: PMSF, EDTA, fenantrolina (fenan), pepstatina e E-64. Para detalhes ver materiais e métodos (item 3.7).

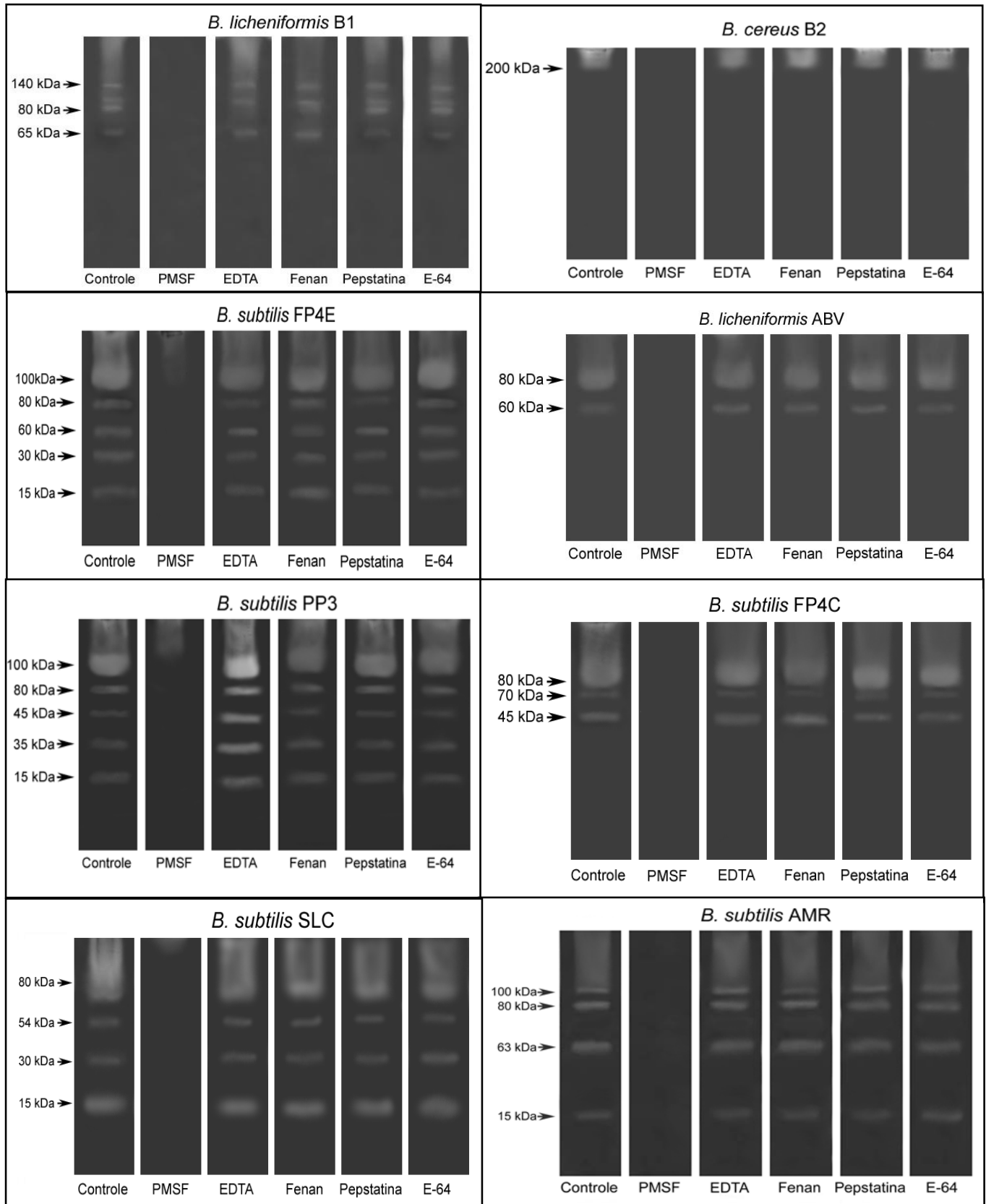


Figura 14: Determinação da classe enzimática das queratinases das cepas de *Bacillus* spp. Os géis foram incubados na ausência ou presença dos seguintes inibidores: PMSF, EDTA, fenantrolina, pepstatina e E-64. Para detalhes ver materiais e métodos item 3.7.

Apesar de não ter o melhor rendimento na degradação, a alta atividade queratinolítica e gelatinolítica, assim como a concentração relativamente alta de proteínas no sobrenadante de cultura em comparação com as demais amostras, levaram à escolha do microrganismo *Bacillus subtilis* AMR para os próximos experimentos.

4.3. Efeito dos meios de propagação do inóculo

O objetivo deste experimento foi determinar se a presença de queratina na forma de penas ou farinha de penas obtida em moinho de bola no meio de preparo do inóculo diminuiria o tempo de adaptação do microrganismo ao meio de fermentação e aumentaria a produção de queratinases.

A análise da atividade queratinolítica do sobrenadante de cultura dos meios de fermentação com inóculos obtidos em meio extrato de levedura (meio 1), penas 1% suplementado com 0,01% de extrato de levedura (meio 2) e penas 1% suplementado com extrato de levedura 0,1% (meio 3) mostrou que a presença de substratos queratinizados no meio de propagação não altera significativamente a atividade queratinolítica (figura 15), nem a concentração de proteínas do meio de fermentação (figura 16).

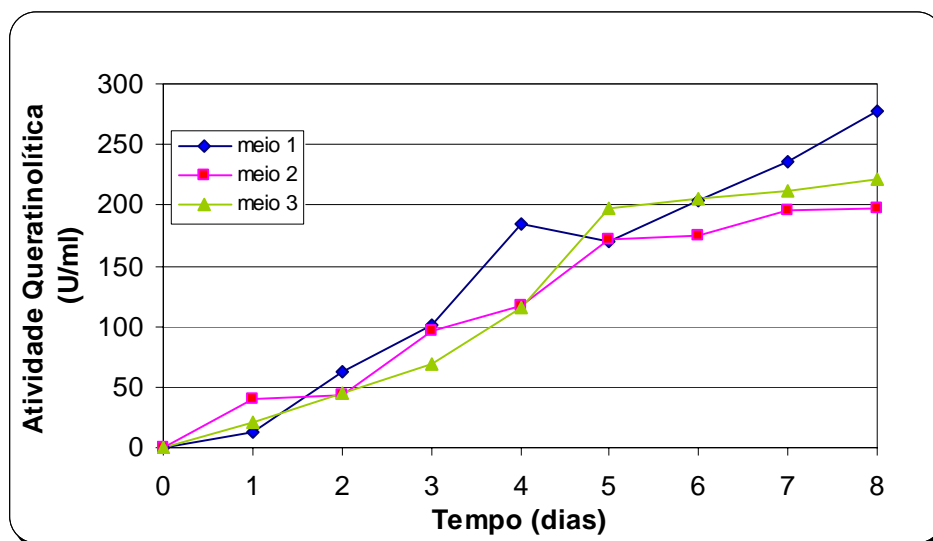


Figura 15: Efeito de meio de propagação de inóculo sobre a atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR. Inóculos obtidos em meios: extrato de levedura (**meio 1**), 1% de penas com extrato de levedura 0,01% (**meio 2**) e 1% de penas com 0,1% de extrato de levedura (**meio 3**).

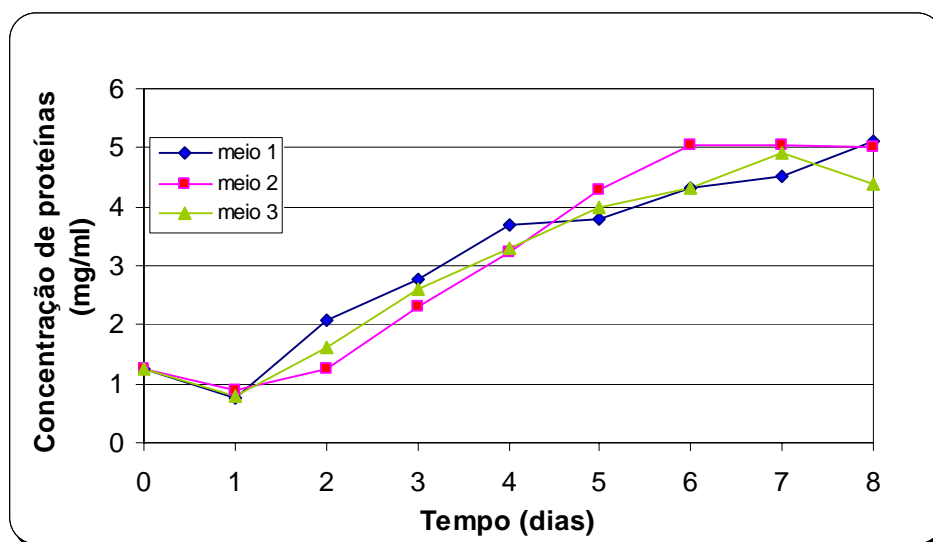


Figura 16: Efeito de meio de propagação de inóculo sobre a concentração de proteína do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR. Inóculos obtidos em meios: extrato de levedura (**meio 1**), 1% de penas com extrato de levedura 0,01% (**meio 2**) e 1% de penas com 0,1% de extrato de levedura (**meio 3**).

Quanto à atividade de gelatinase, o meio 3 apresentou o melhor desempenho nos três primeiros dias, mas nos demais a diferença não foi significativa quando comparado com o meio 1, que não continha penas. O meio 2 mostrou atividade gelatinolítica um pouco menor.

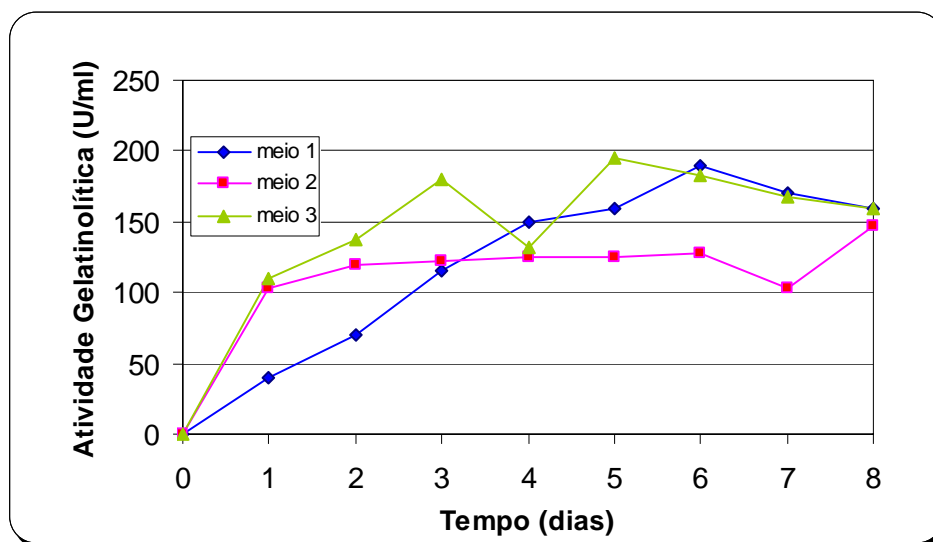


Figura 17: Efeito do meio de propagação de inóculo sobre a atividade gelatinolítica de *B. subtilis* AMR. Inóculos obtidos em meios: extrato de levedura (**meio 1**), 1% de penas com extrato de levedura 0,01% (**meio 2**) e 1% de penas com 0,1% de extrato de levedura (**meio 3**).

Como os resultados mostrados apontam que a atividade queratinolítica do microrganismo independe do meio de propagação utilizado, nos experimentos seguintes foi utilizado extrato de levedura como meio de cultura para obtenção de massa celular, pela sua simplicidade de preparação.

Foi feita uma zimografia com substratos gelatina e queratina dos sobrenadantes de cultura dos meios de propagação após 72 h de crescimentos do *B. subtilis* AMR, a fim de visualizar quais peptidases e queratinases era expressas nestes meios antes da passagem das células para o meio de fermentação. O sobrenadante do meio de fermentação, também com três dias de incubação, foi

utilizado como controle. Foi observado que no meio 2, um meio com composição semelhante ao meio de fermentação, o perfil proteolítico foi parecido com o observado neste meio (figura 18). No meio 3, que também continha penas, o perfil foi também parecido, exceto pela banda de aproximadamente 15 kDa. O meio extrato de levedura (meio 1) mostrou a presença de 4 bandas com atividade proteolítica (64, 72,8, 77 e 80 kDa), indicando que a produção destas peptidases não são induzidas apenas por queratina. Essas bandas também aparecem nos géis dos meios com penas. Apesar de não haver queratina no meio extrato de levedura, uma banda dupla migrando em aproximadamente 80 kDa com atividade queratinolítica foi observada no meio extrato de levedura; possivelmente essas queratinases sejam expressas de forma constitutiva pelo *B. subtilis* AMR (figura 19).

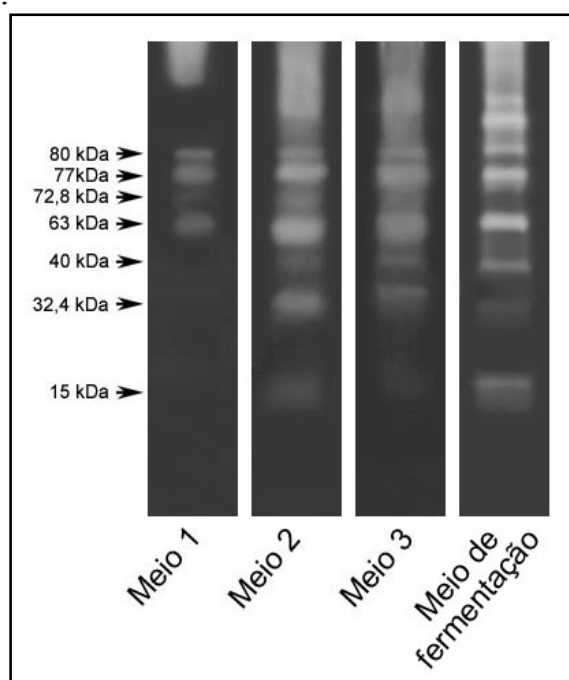


Figura 18: Zimografia com substrato gelatina dos sobrenadantes de cultura de *B. subtilis* AMR nos seguintes meios: extrato de levedura (**meio 1**); 1% de penas e 0,01% de extrato de levedura (**meio 2**); e 1% de penas e 0,1% de extrato de levedura (**meio 3**). A Faixa da direita mostra a zimografia do sobrenadante de cultura da amostra no meio de fermentação cultivado por 72 horas.

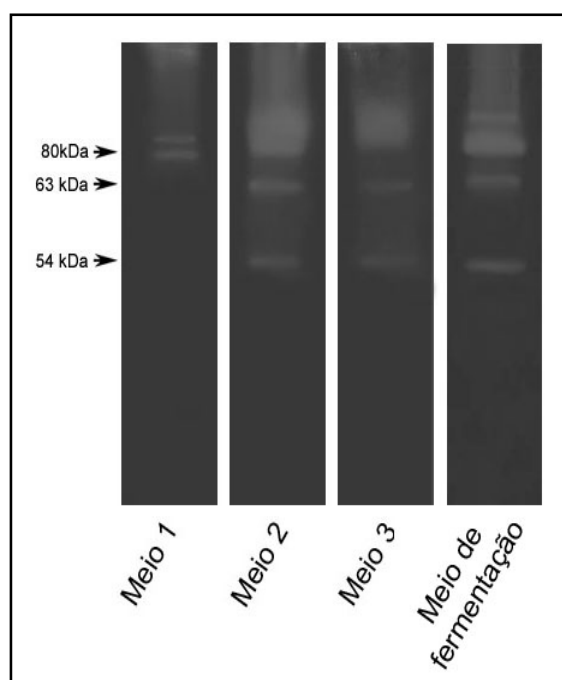


Figura 19: Zimografia com substrato queratina dos sobrenadantes de cultura de *B. subtilis* AMR nos seguintes meios: extrato de levedura (**meio 1**); 1% de penas e 0,01% de extrato de levedura (**meio 2**); e 1% de penas e 0,1% de extrato de levedura (**meio 3**). A Faixa da direita mostra a zimografia do sobrenadante de cultura da amostra no meio de fermentação cultivado por 72 horas.

4.4. Otimização da produção de queratinases em penas

4.4.1. Efeito da fonte suplementar de carbono sobre a produção de queratinases, concentração de proteínas e na degradação de penas

A influência de fontes suplementares de carbono sobre a produção de queratinases foi avaliada. A melhor fonte de carbono para a produção de queratinase foi sacarose 0,05%, com 360,66 U/ml, seguido de glicose, caseína a 0,05% (310 e 304, 67 U/ml, respectivamente) e extrato de levedura 0,01% (304 U/ml), como apresentado na figura 20. A sacarose a 0,05% também se mostrou a melhor fonte de carbono adicional para a produção de peptidases, o que foi verificado através de ensaio enzimático com gelatina. A atividade gelatinolítica neste substrato foi de 663, 77 U/ml, seguido por extrato de levedura 0,01% (606 U/ml) e caseína 0,05% (546,6 U/ml) (figura 20). A adição de sacarose a 0,05% foi a melhor condição de cultivo, em comparação com o meio sem suplementação, sendo 1,31 e 1,23 vezes maior na atividade de queratinase (274 U/ml) e gelatinase (537,12 U/ml), respectivamente.

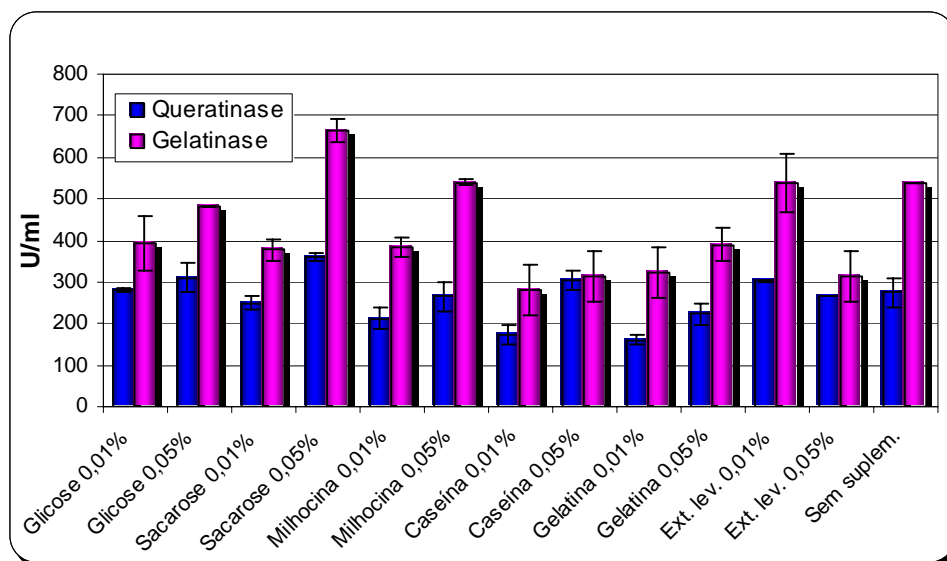


Figura 20: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a atividade queratinolítica e gelatinolítica do sobrenadante de cultura da amostra *B. subtilis* AMR cultivada por 6 dias.

Foi observado que a fonte adicional de carbono não altera significativamente a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura (figura 21). A concentração de proteínas foi mais alta quando a caseína foi adicionada a 0,01% ($4,114 \pm 0,208$ mg/ml) e menor com glicose 0,05% (3,360 mg/ml). Sem suplementação, foi observado um valor de 3,743 mg/ml.

A análise do consumo de penas mostrou que extrato de levedura e caseína, ambos a 0,01%, levaram à degradação de 98,93% das penas, 10% a mais que no meio sem suplementação. Com sacarose a 0,01% foi alcançada 97,37% de degradação de penas.

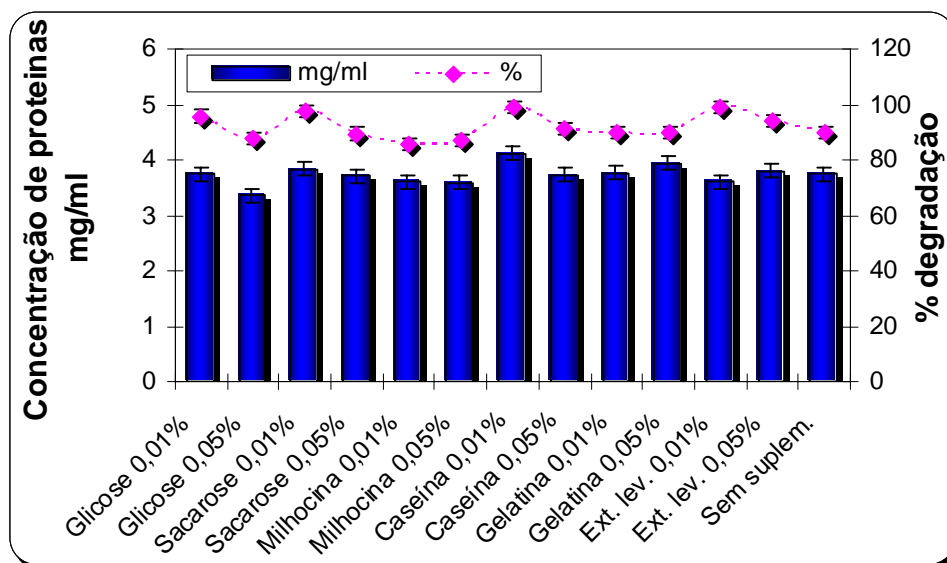


Figura 21: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a concentração de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR e sobre o percentual de degradação de penas.

Ao final do período de cultivo, as células viáveis foram contadas. A contagem mostrou que a concentração final de bactérias não corresponde à atividade enzimática encontrada (figura 22). A suplementação com qualquer um dos substratos testados favoreceu o crescimento bacteriano, mas como observado nas figuras 20 e 21, algumas fontes adicionais de carbono foram ineficazes para a produção de enzimas e degradação das penas. Caseína a 0,05 % apresentou uma contagem de células 12,3 vezes maior do que sem suplementação.

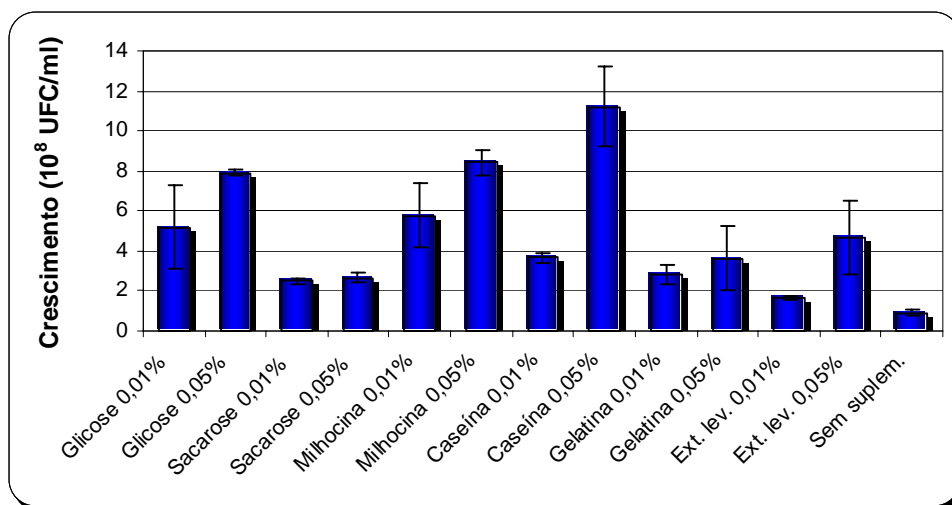


Figura 22: Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a contagem de células viáveis ao final de 6 dias de incubação de *B. subtilis* AMR.

As zimografias com substratos gelatina e queratina mostraram que a adição de uma fonte adicional de carbono ao meio de penas não gera nenhuma alteração no perfil de bandas da amostra (figura 23 A e B). Entretanto, com substrato milhocina, na faixa de migração de aproximadamente 77kDa, observamos uma banda dupla no gel com gelatina, enquanto com os demais substratos avaliados observamos uma banda simples.

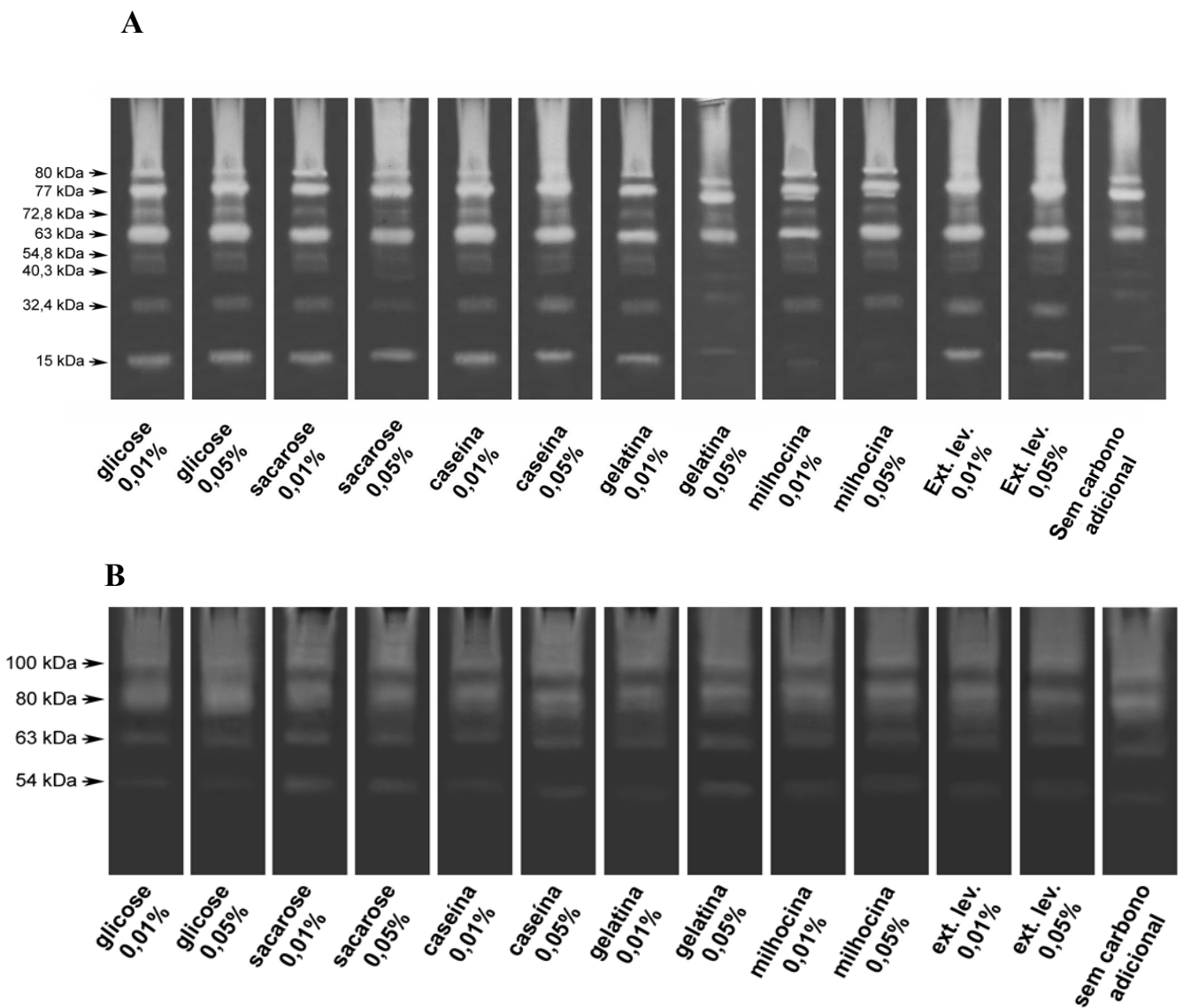


Figura 23: Zimografia com substrato gelatina (A) e queratina (B) dos sobrenadantes de cultura concentrado da amostra *B. subtilis* AMR cultivados por 6 dias em meio contendo penas e diferentes fontes suplementares de carbono.

4.4.2. Estudo da influência de sais sobre produção de queratinases por *Bacillus subtilis* AMR em penas

A análise da melhor composição de sais no meio de cultura para a produção de queratinases, hidrolisados de queratina, rendimento de degradação e crescimento, foi realizada utilizando metodologia de superfície de resposta, conforme descrito no item 3.9.2.

Numa primeira etapa, foi avaliado o efeito das concentrações de sais de zinco, ferro e cobre sobre a produção de queratinases, concentração de proteínas, degradação de penas e contagem final de células. A análise estatística dos resultados mostrou que sulfato de cobre teve efeito fortemente negativo sobre os parâmetros avaliados. A interação entre esses sais, avaliado através da análise de variância (ANOVA), utilizando limite de significância de 95%, mostrou que o modelo é significativo para as quatro respostas – atividade queratinolítica, concentração de proteínas, rendimento da degradação de penas e contagem final de células (dados resumidos na tabela 15), com valores de p menores que 0,05. O valor de R^2 para atividade queratinolítica foi de 0,9958, para a concentração de proteínas foi de 0,9932, para rendimento da degradação foi de 0,9975 e para contagem de células foi 1,000, indicando que 99,58, 99,32, 99,75% e 100% da variabilidade na resposta poderia ser explicado pelo modelo.

Tabela 15: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas, rendimento da degradação e contagem final de células, para as variáveis CuSO₄, ZnSO₄ e FeSO₄.

Termos	Queratinase (U/ml)	Proteínas (mg/ml)	Degradação de penas (%)	Nº de células (UFC/ml)
Soma dos quadrados	1,016E+005	9,95	6452,58	1074,75
Graus de liberdade	7	7	7	7
Quadrado médio	14520,13	1,42	921,80	153,54
Valor de F	67,76	41,56	112,18	3,543E+007
Prob>F*	0,0146	0,0237	0,0089	< 0,0001
Desvio padrão	14,64	0,18	2,87	2,08
Média	127,18	2,23	33,16	6,2
Coef. de variância	11,51	8,29	8,64	0,034
R ²	0,9958	0,9932	0,9975	1,000
R ² ajustado**	0,9811	0,9693	0,9886	1,000
Precisão adequada***	21,133	16,852	26,469	15293,832

*Valores de Prob>F maiores de 0,05 indicam que os termos são significativos.

**O valor de R² ajustado corrige o valor de R² para o tamanho da amostra e para o número de termos no modelo.

***A precisão adequada mede o sinal da razão de ruído, uma razão maior que 4 indica um sinal adequado.

Os coeficientes da equação de regressão foram calculados, e as seguintes equações foram obtidas:

$$Y_1 = 248,66 + 30,34*A - 209,16*B + 68,84*C - 14,34*A*B - 110,34*A*C - 70,67*B*C + 125*A*B*A$$

$$Y_2 = 3,271 + 0,671*A - 1,675*B + 0,759*C - 1,056*A*B - 1,526*A*C - 0,759*B*C + 1,724*A*B*C$$

$$Y_3 = 75,98 - 5,89*A - 59,38*B - 5,12*C - 1,18*A*B - 10,51*A*C + 5,08*B*C + 8,37*A*B*C$$

$$Y_4 = 27,30 - 18,85*A - 27,297*B + 1,50*C + 21,847*A*B - 9,3475*A*C - 1,50*B*C + 6,3505*A*B*C$$

Nas equações, Y_1 é atividade queratinolítica, Y_2 é a concentração de proteínas, Y_3 é o rendimento de degradação, Y_4 a contagem de microrganismos, A é a concentração de $FeSO_4$, B é concentração de $CuSO_4$, e C é a concentração de $ZnSO_4$.

Os valores observados através de análises experimentais e os valores preditos pelo modelo ficaram próximos (tabela 16).

Tabela 16: Valores observados e preditos pelo delineamento experimental usando planejamento fatorial.

Experimento				Valores observados				Valores preditos			
	FeSO ₄	CuSO ₄	ZnSO ₄	Atividade Queratinolítica	10 ⁷ UFC/ml	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação	Atividade Queratinolítica	10 ⁷ UFC/ml	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação
1	-1	-1	-1	248,67	27,3	3,271	75,98	248,66	27,32	3,271	75,98
2	-1	-1	1	317,5	28,8	4,030	70,86	317,5	28,8	4,03	70,86
3	-1	1	-1	39,5	2,36	1,421	16,82	39,5	0,003	1,596	16,6
4	-1	1	1	37,67	0,003	1,596	16,56	37,67	0,003	1,596	11,48
5	1	-1	-1	279	8,45	3,942	70,09	234,32	8,44	3,942	74,8
6	1	-1	1	237,5	0,6025	3,175	54,46	237,5	0,6	3,175	54,46
7	1	1	-1	55,5	3	1,211	9,53	55,5	3	1,211	9,53
8	1	1	1	68,33	0,003	1,409	7,35	68,33	0,053	1,409	7,35
9	0	0	0	35,5	0,005	1,515	11,75	34,17	8,52*	1,6935	23
10	0	0	0	54,34	0,001	1,564	14,16	34,17	8,52*	1,693	23
11	0	0	0	25,5	0,002	1,222	17,56	34,17	8,52*	1,693	23

*Valores preditos pelo modelo que ficaram distantes dos observados.

A atividade queratinolítica foi observada através de gráficos de superfície de resposta, como mostra a figura 24. A adição de cobre ao meio de fermentação prejudicou consideravelmente a produção de queratinases (figura 24 A e B). Na ausência de sulfato de cobre e de zinco e na presença de sulfato ferroso, a atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR foi muito próxima àquela observada na ausência de sais no meio, sendo 279 e 248,67 U/ml, respectivamente, considerando que o desvio padrão do modelo foi de 14,64. Mesmo quando CuSO₄ é testado com os demais sais, ele continua inibindo a produção de queratinases pelo microrganismo, independente da concentração de ZnSO₄ e/ou FeSO₄.

Quando a interação de sulfato ferroso e sulfato de zinco foi analisada, observou-se que na presença destes sais na concentração de 1 mM, a atividade queratinolítica foi ligeiramente menor que na ausência deles (237,5 U/ml). A mistura destes dois sais não favoreceu a produção de queratinases, entretanto, quando testados individualmente, ZnSO_4 e FeSO_4 tiveram atividades de 317,5 e 279 U/ml, respectivamente (figura 24 B).

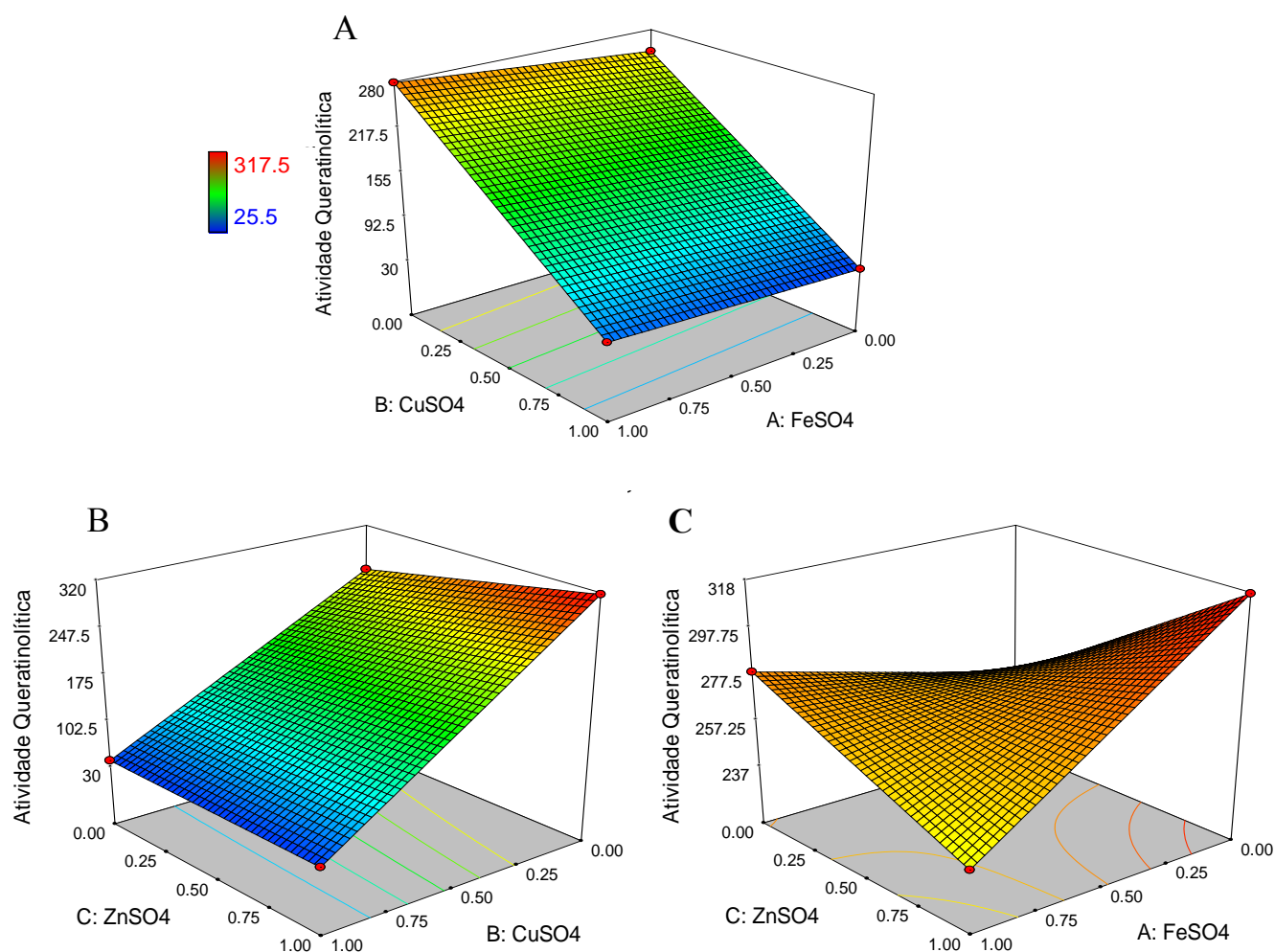


Figura 24: Superfície de resposta e curvas de níveis da atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR mostrando a interação entre concentrações de CuSO_4 e FeSO_4 (A), CuSO_4 e ZnSO_4 (B) e FeSO_4 e ZnSO_4 (C).

Quando a concentração de proteínas foi analisada através de superfície de resposta, resultados semelhantes àqueles observados para atividade queratinolítica foram obtidos (figura 25). A concentração máxima de proteínas foi encontrada quando ZnSO_4 a 1 mM (4,04 mg/ml) foi testado separadamente no meio, e mínima quando sulfato de cobre foi adicionado a 1 mM (1,409 mg/ml). Assim como a presença de sais de cobre inibiram a atividade queratinolítica, a concentração de proteínas também decresceu. FeSO_4 e ZnSO_4 separadamente apresentaram concentrações de proteínas (4,04mg/ml e 3,942 mg/ml, respectivamente) maiores que quando estes dois sais foram adicionados juntos no meio, quando a concentração de 3,175 mg/ml foi observada. Quando o microrganismo foi crescido em meio sem sais, 3,271 mg/ml de proteínas foi dosada (figura 25 B).

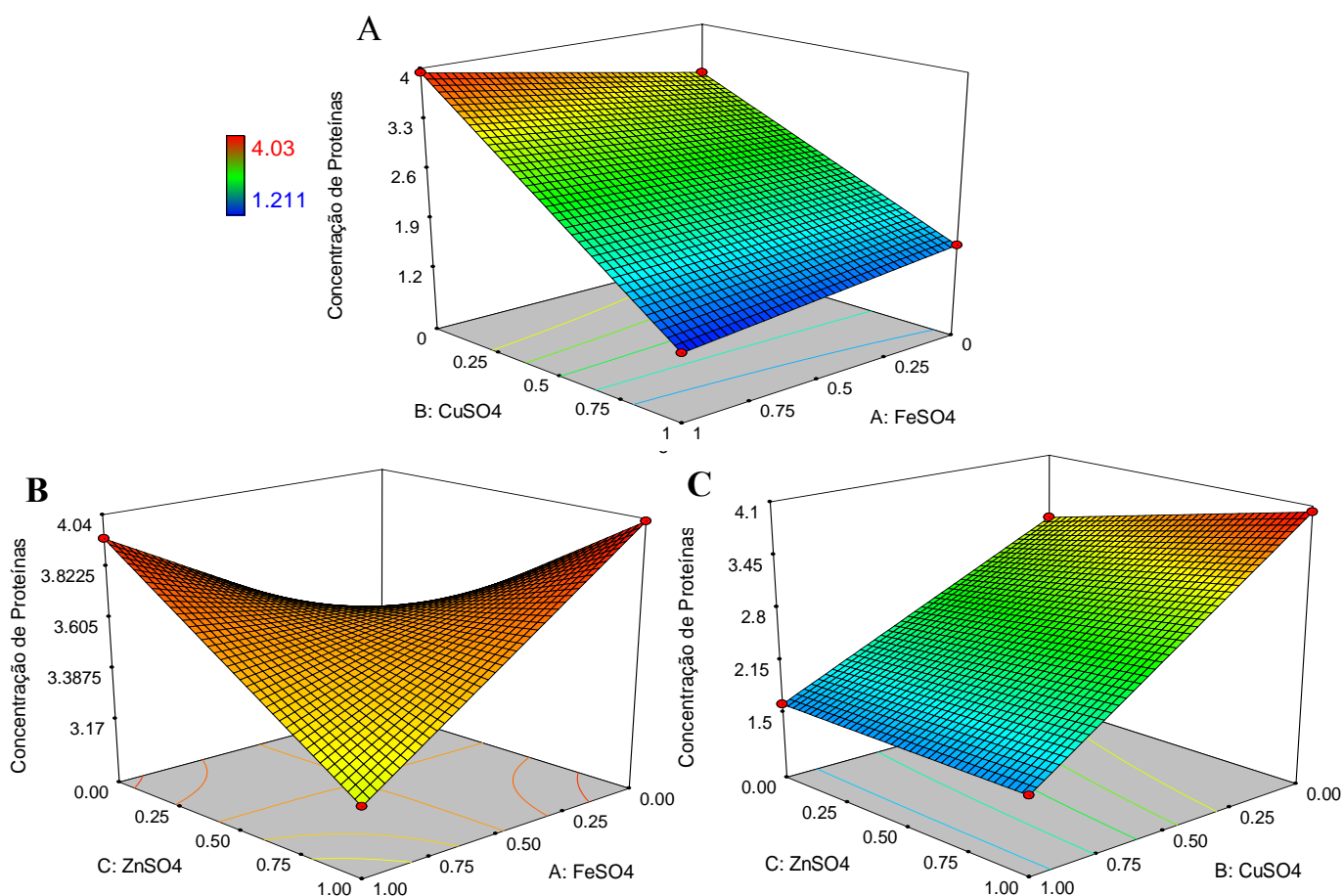


Figura 25: Superfície de resposta e curva de contorno da concentração de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR mostrando a interação entre concentrações de CuSO_4 e FeSO_4 (A), ZnSO_4 e FeSO_4 (B) e CuSO_4 e FeSO_4 (C).

O rendimento de degradação das penas pelo *B. subtilis* AMR também foi reduzido quando CuSO_4 foi testado (figura 26). Na ausência de sais, o microrganismo degradou 75,98% das penas. Nos meios contendo separadamente 1mM de ZnSO_4 , FeSO_4 ou CuSO_4 , 70,86, 70,9 e 16,82% de degradação das penas foram encontrados, rendimentos de degradação menores do que na ausência destes sais. Se comparado com o resultado observado para concentração de proteínas, quando ZnSO_4 e FeSO_4 levaram ao aumento na concentração de proteínas, o resultado para degradação de penas foi inverso, uma vez que menos penas foram degradadas na presença deste sais.

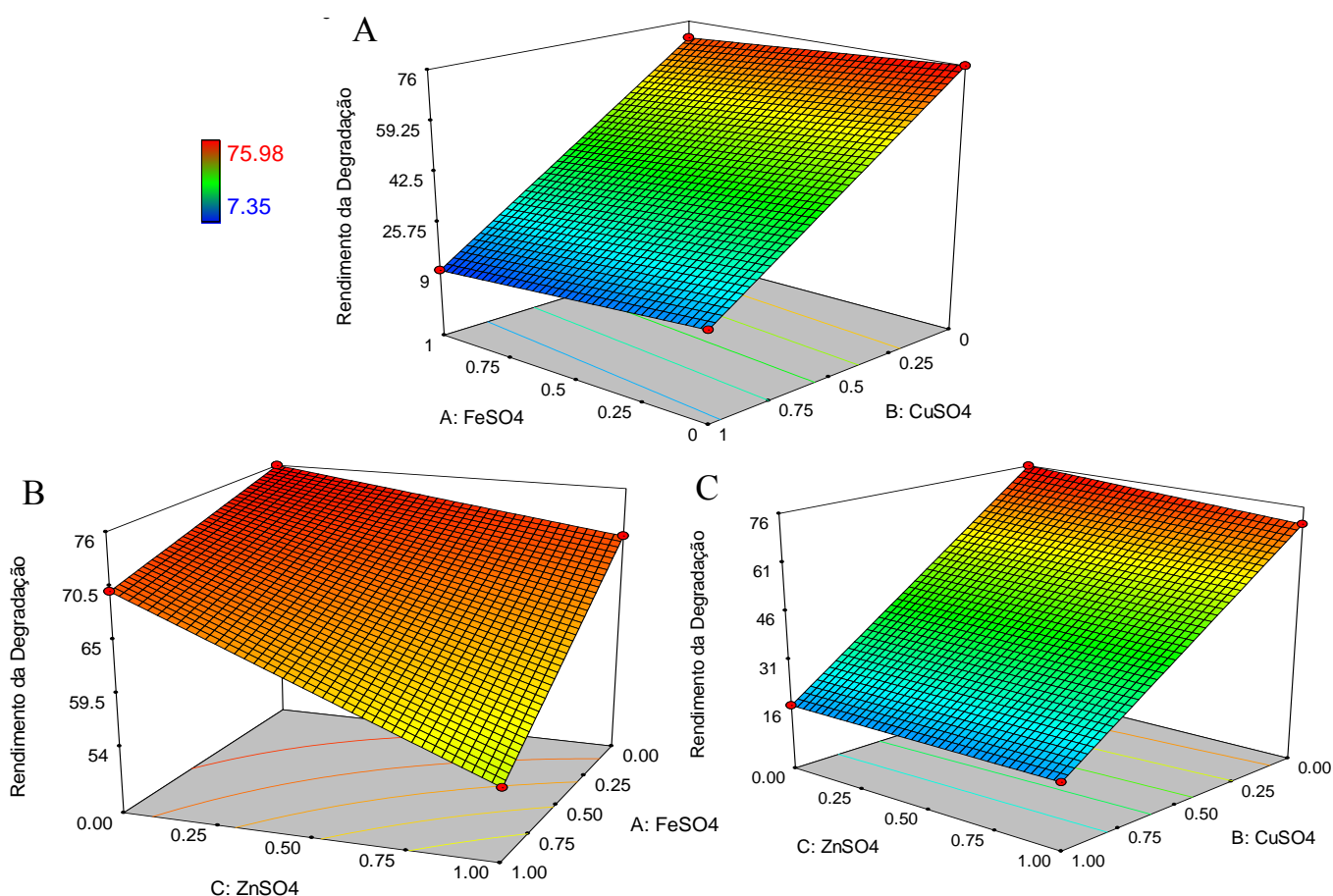


Figura 26: Superfície de resposta e curva de contorno do percentual de degradação de penas após 6 dias de cultivo com *B. subtilis* AMR mostrando influência da interação entre concentrações de CuSO_4 e FeSO_4 (A), ZnSO_4 e FeSO_4 (B) e CuSO_4 e FeSO_4 (C).

A contagem final de microrganismos no meio de cultura, através da contagem de UFC (unidade formadora de colônia), mostrou que sulfato de cobre é inibitório para o crescimento do microrganismo quando misturado aos outros dois sais, com uma contagem de 3×10^4 UFC/ml. Sem sal, a contagem foi de $2,78 \times 10^8$ UFC/ml. Curiosamente, apenas o CuSO_4 não levou a uma queda brusca no crescimento ($2,36 \times 10^7$ UFC/ml). Sulfato de zinco aparentemente não afetou o crescimento ($2,88 \times 10^8$ UFC/ml). FeSO_4 também levou a uma redução na contagem ($8,45 \times 10^7$ UFC/ml), assim como sua mistura com ZnSO_4 (6×10^6 UFC/ml). A figura 27 mostra a influência de combinações destes três sais na contagem final de UFC.

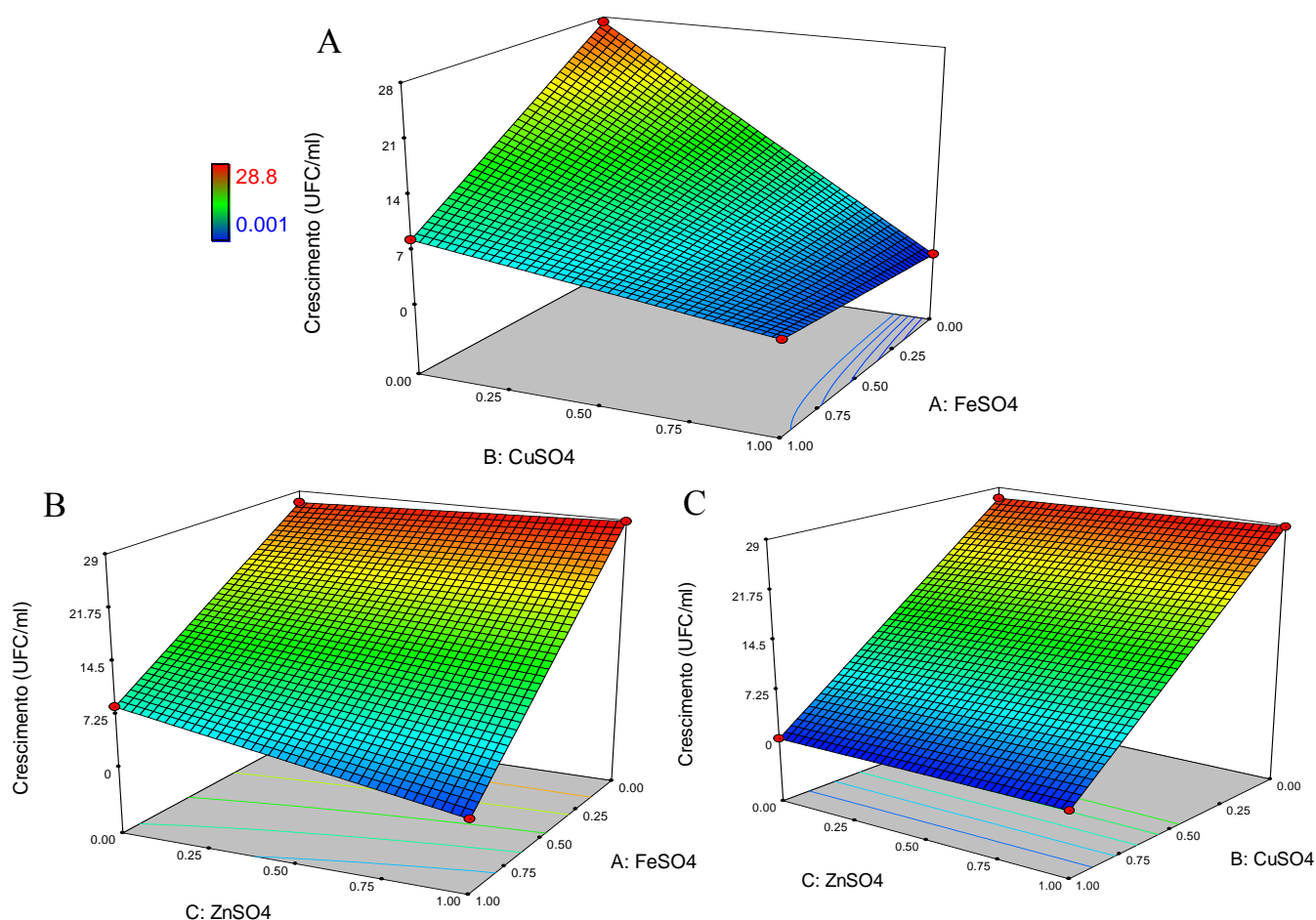


Figura 27: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de CuSO_4 e FeSO_4 (A) e ZnSO_4 e FeSO_4 (B), CuSO_4 ZnSO_4 (C) na contagem final de células viáveis em (10^7 UFC/ml) após 6 dias de cultivo.

O valor de R^2 (coeficiente de determinação) para as variáveis $MnCl_2$, $MgSO_4$ e $CaCl_2$, em meio contendo 1% de penas e 0,01% de extrato de levedura, foi calculado para atividade queratinolítica e para concentração de proteínas em 0,9894 e 0,9422, respectivamente, indicando que o modelo estatístico pode explicar 98,94% e 94,22% da variabilidade nas respostas. Para rendimento da degradação e contagem final de células no sobrenadante de cultura, o valor de R^2 foi ainda mais próximo de 1, sendo 0,9996 e 0,9995 respectivamente. A análise de variância sumarizada na tabela 17 mostra que o modelo é significativo para todas as respostas exceto concentração de proteínas, onde o valor de p para o modelo (0,1882) foi maior que 0,1. Para esta resposta nenhum termo foi significativo. Para a atividade queratinolítica, C ($MnSO_4$), AB (A- $MgSO_4$ e B- $CaCl_2$) e AC foram termos significativos no modelo, para o rendimento os termos significativos foram B, C, AB, AC e BC. Já para o crescimento todos os termos foram significativos. A análise de regressão dos dados experimentais levaram à obtenção das seguintes equações:

$$Y_1 = 319,34 - 64,34*A - 81,34*B + 1,14922E-013*C + 88,84*A*B + 74*A*C + 65,7*B*C - 21,33*A*B*C$$

$$Y_2 = + 75,98 - 5,74*A + 1,09*B - 6,98*C + 13,94*A*B - 3,65*A*C - 4,41*B*C + 2,05A*B*C$$

$$Y_3 = 23,3 + 60,2*A - 21,98*B - 5,5*C - 52,65*A*B - 67*A*C + 6,9*B*C + 83,73*A*B*C$$

$$Y_4 = + 3,542 - 0,05*A - 1,00000E-002*B + 3,00000E-003*C - \\ 0,46*A*B - 3.00000E-003*A*C - 0,573*B*C + 1,451A*B*C$$

Nas equações, Y_1 corresponde à atividade queratinolítica em U/ml, Y_2 corresponde ao rendimento da degradação em %, Y_3 , a contagem final de células viáveis em 10^7 UFC/ml e Y_4 corresponde à concentração de proteínas em mg/ml. A representa a concentração de $MgSO_4$, B, a concentração de $CaCl_2$, e C, a concentração de $MnCl_2$.

O desvio padrão calculado foi de 0,14 e coeficiente de variância de 4,02 (tabela 17).

Tabela 17: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas, rendimento a degradação e contagem final de células.

Termos	Queratinase (U/ml)	Proteínas (mg/ml)	Degradação de penas (%)	Nº de células (UFC/ml)
Soma dos quadrados	15323,29	0,65	423,17	4919,33
Graus de liberdade	7	7	7	7
Quadrado médio	2189,04	0,093	60,45	702,76
Valor de F	26,65	4,66	674,45	600,33
Prob>F	0,0366	0,1882	0,0015	0,0017
Desvio padrão	9,06	0,14	0,30	1,08
Média	317,46	3,52	72,56	17,6
Coef. de variância	2,85	4,02	0,41	6,15
R^2	0,9894	0,9422	0,9996	0,9995
R^2 ajustado	0,9523	0,7498	0,9981	0,9979
Precisão adequada	17,363	7,343	94,754	83,972

Os valores obtidos pelas análises experimentais e os valores preditos pelo modelo estão expressos na tabela 18.

Tabela 18: Valores observados e preditos pelo delineamento experimental usando planejamento fatorial.

Experimento	MgSO ₄	CaCl ₂	MnCl ₂	Valores observados				Valores preditos			
				Atividade Queratinolítica	10 ⁷ UFC/ml	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação	Atividade Queratinolítica	10 ⁷ UFC/ml	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação
1	-1	-1	-1	319,34	27,3	3,545	75,98	319,34	23,3	3,542	75,98
2	-1	-1	1	286	17,8	3,024	69	285,6	17,8	3,056	69
3	-1	1	-1	238	1,32	3,533	77,07	238	1,32	3,534	77,07
4	-1	1	1	303,17	2,72	2,963	65,68	303,17	2,72	2,962	65,68
5	1	-1	-1	255	83,5	3,464	70,24	255	83,5	3,492	70,24
6	1	-1	1	329	11,9	3,492	59,61	329	11	3,492	59,61
7	1	1	-1	262,5	8,87	3,022	85,27	262,5	8,87	3,022	83,09
8	1	1	1	380,34	27	3,900	72,28	380,34	22,22	3,9	72,28
9	0	0	0	355,5	25,2	2,981	74,48	337,22	13,2	3,435	71,89
10	0	0	0	357,67	7,25	3,82	74	337,22	13,2	3,435	71,89
11	0	0	0	372,17	5,625	3,567	74,55	337,22	13,2	3,435	71,89

A superfície de resposta da interação entre sulfato de magnésio e cloreto de cálcio sobre a atividade queratinolítica mostrou que na ausência de cloreto de manganês, a atividade queratinolítica foi negativamente afetada (figura 28 A). Esta foi de 262,5 U/ml quando MgSO₄ e CaCl₂ foram adicionados ao meio na concentração de 1mM, um valor menor que o observado na ausência de sais (319,34 U/ml). A atividade de queratinase caiu com o aumento da concentração de CaCl₂, chegando a 238 U/ml (figura 28). Entretanto, quando MnCl₂ 1mM adicionado a MgSO₄ e CaCl₂, a atividade queratinolítica aumentou à medida em

que a concentração destes sais aumentou (figura 28 B), alcançando o máximo de atividade (380,34 U/ml).

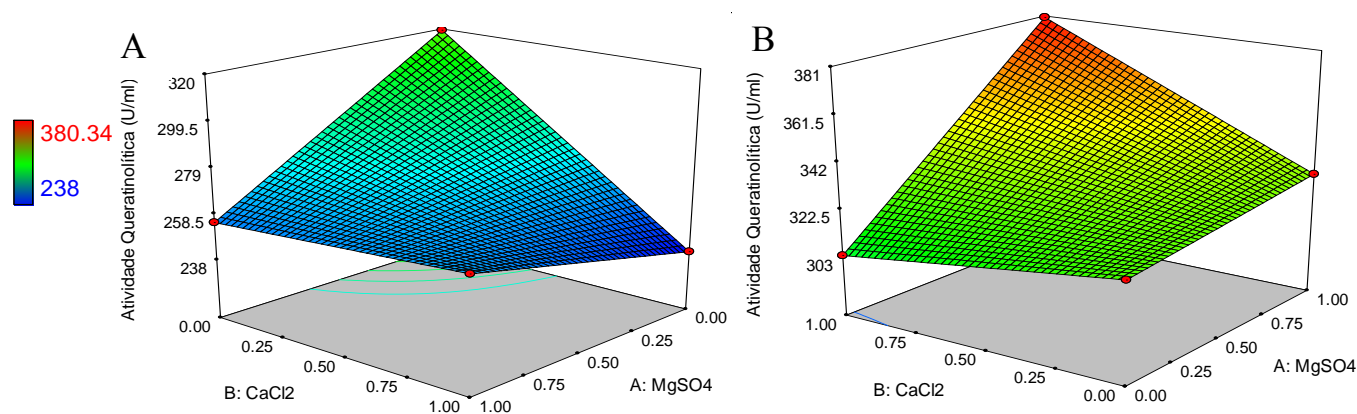


Figura 28: Superfície de resposta e curvas de nível da atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR mostrando influência da interação entre concentrações de MgSO₄, CaCl₂, ausência (A) ou na presença (B) de MnCl₂.

Quando a interação entre MnCl₂ foi analisada com MgSO₄ e CaCl₂ separadamente, observou-se que quanto maior a concentração de cloreto de manganês e menor de sulfato de magnésio ou cloreto de cálcio, maior a atividade queratinolítica (figura 29 A e B). Quando *B. subtilis* AMR foi crescido em meio contendo MgSO₄, CaCl₂ ou MnCl₂ a 1mM, a atividade foi de 255, 238 e 286 U/ml, respectivamente, valores menores que 319,34 U/ml no meio sem sais (figura 29).

Com relação à concentração de proteínas no sobrenadante de cultura do microrganismo, uma melhor concentração foi encontrada quando os três sais foram acrescidos ao meio na concentração de 1mM (3,9 mg/ml), porém, o valor encontrado não foi muito distante daquele encontrado na ausência de sais (3,545 mg/ml). A figura 30 A mostra a interação entre diferentes concentrações de MgSO₄ e CaCl₂ quando em meio contendo MnCl₂ 1mM. Na ausência de MnCl₂ a

concentração de proteínas foi prejudicada com o aumento nas concentrações de MgSO_4 e CaCl_2 (figura 30 B), num evento semelhante ao observado na atividade queratinolítica.

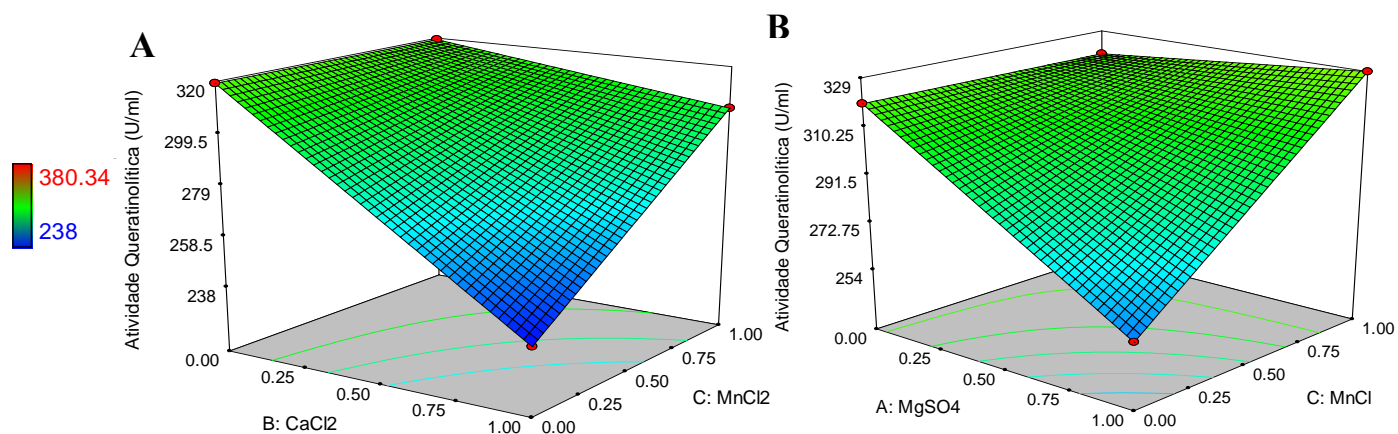


Figura 29: Superfície de resposta da atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR mostrando influência da interação entre concentrações de MnCl_2 e CaCl_2 (A), e entre MnCl_2 e MgSO_4 (B).

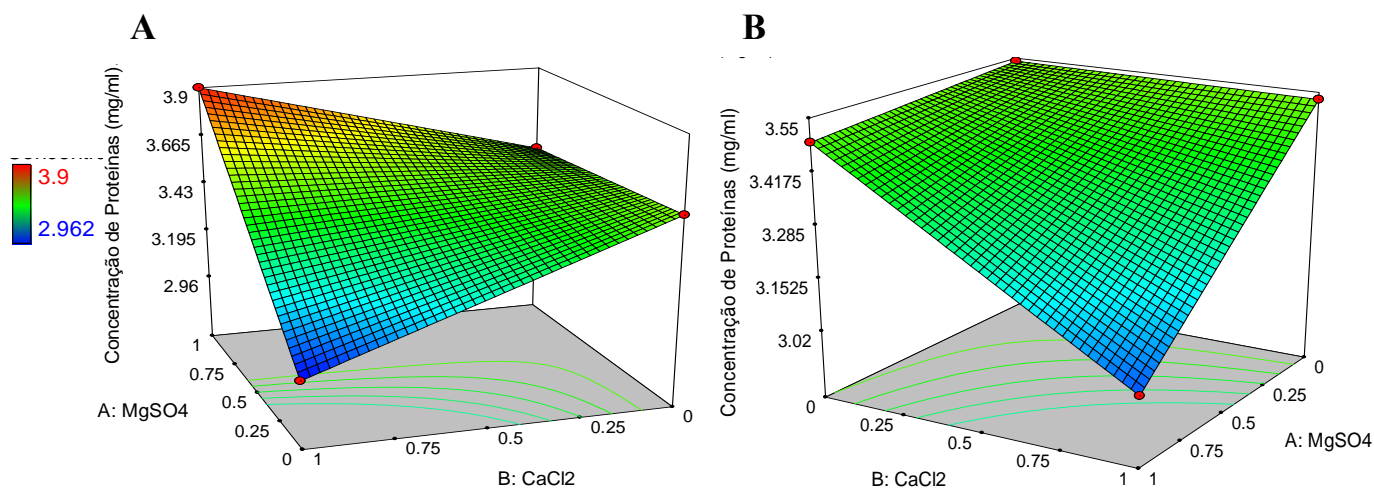


Figura 30: Superfície de resposta e curva de contorno da concentração de proteínas do meio de cultivo de *B. subtilis* AMR mostrando influência da interação entre concentrações de MgSO_4 , CaCl_2 , na presença (A) ou ausência (B) de 1mM de MnCl_2 .

A investigação da interação entre MnCl_2 e MgSO_4 , na ausência de CaCl_2 , mostrou que independente da concentração de MnCl_2 utilizada, o aumento na molaridade de MgSO_4 levou a um ligeiro decréscimo na concentração de proteínas no meio de cultura (figura 31 A), que foi de 3,545 mg/ml a $3,492 \pm 0,002$. Considerando que o desvio padrão do modelo foi de 0,14, essa diminuição na concentração de proteínas não é significativa, logo a adição destes sais não causa alterações na produção de proteínas, direta ou indiretamente, pelo *B. subtilis* AMR. Já na mistura MnCl_2 e CaCl_2 a 1mM, a concentração de proteínas foi de 2,963 mg/ml (figura 31 B), indicando que essa não é uma boa combinação de sais, mas a adição de MgSO_4 eleva a atividade a 3,9 mg/ml como já mostrado.

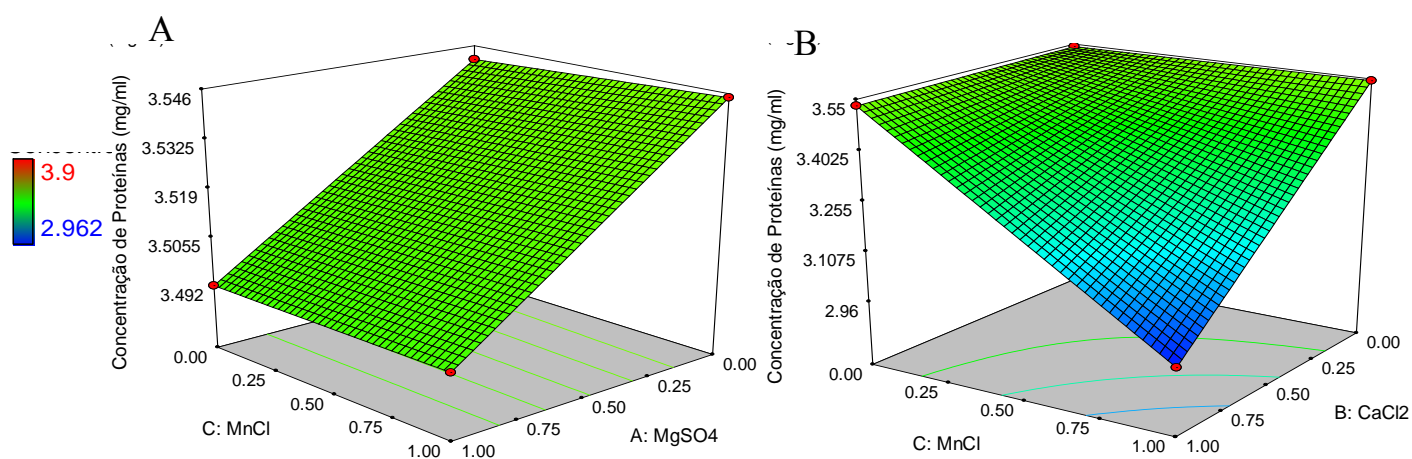


Figura 31: Superfície de resposta e curva de contorno da concentração de proteínas do meio de cultivo de *B. subtilis* AMR mostrando influência da interação entre concentrações de MnCl_2 e MgSO_4 (A) e MnCl_2 e CaCl_2 (B).

Quanto à influência dos sais na degradação de penas pelo microrganismo, foi observado que a mistura de CaCl_2 e MgSO_4 , a 1mM, aumentou o consumo de penas de 75,98% (sem sais no meio de cultura) para 85,27% (Figura 32 A), entretanto, quando MnCl_2 foi adicionado, a hidrólise do substrato caiu para

72,28% (figura 32 B). Quando MnCl_2 foi testado sozinho, o rendimento da degradação foi de 69%. Apesar de estimular a produção de queratinases, aparentemente causa uma pequena diminuição no rendimento em relação ao meio sem adição de sais (figura 32 A e B). *B. subtilis* AMR hidrolisou 77,07% das penas quando cultivado em meio contendo apenas CaCl_2 1mM, e no meio contendo MgSO_4 1mM, a hidrólise foi de 70,4%. A combinação de CaCl_2 com MnCl_2 e MgSO_4 com MnCl_2 não favoreceu o consumo de penas, que diminuiu para 65,68 e 59,61%, respectivamente (figura 32 B).

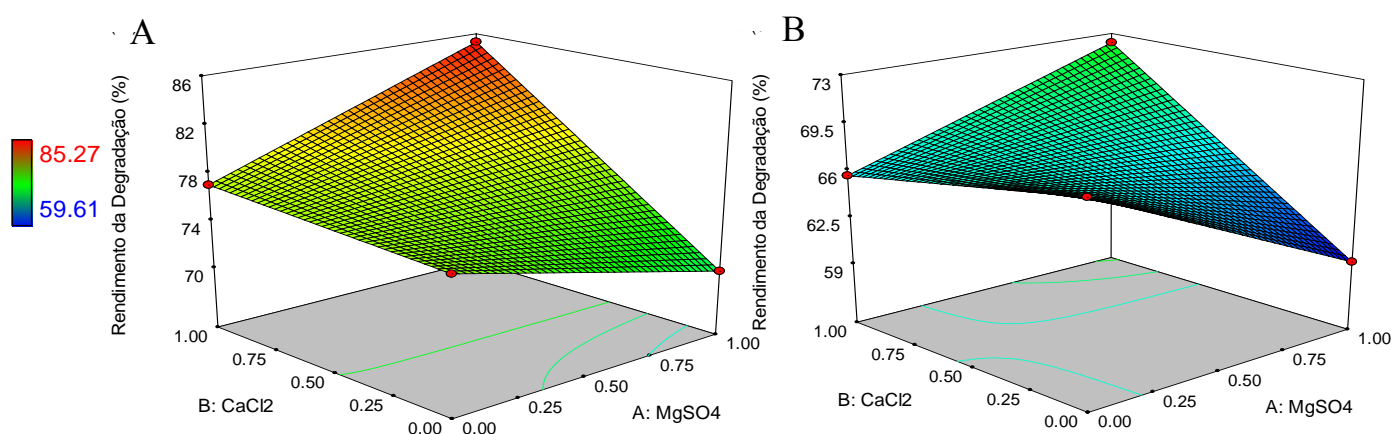


Figura 32: Superfície de resposta e curva de contorno do rendimento da degradação de penas quando *B. subtilis* AMR foi cultivado em meio contendo diferentes concentrações de MgSO_4 e CaCl_2 , ausência (A) ou na presença (B) de MnCl_2 .

A contagem final de células viáveis mostrou que MgSO_4 favoreceu o crescimento do microrganismo, cuja contagem subiu de $2,73 \times 10^8$ (sem sais adicionais) para $8,3 \times 10^9$ UFC/ml (figura 33 A). Cloreto de manganês não causou alteração significativa no crescimento (figura 33 B), enquanto CaCl_2 , diminuiu a contagem para $1,32 \times 10^7$ (figura 33 A e C).

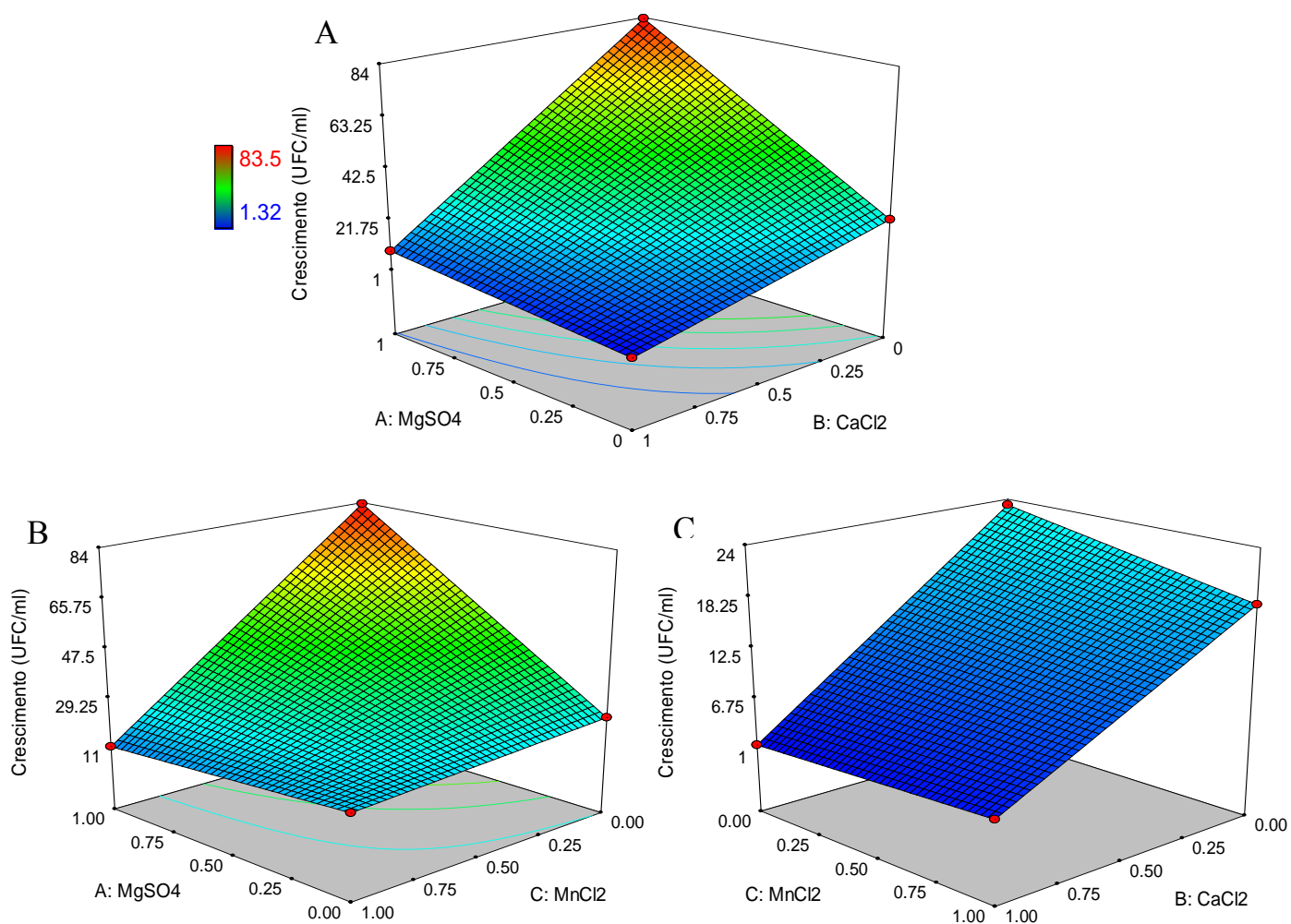


Figura 33: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MgSO₄ e CaCl₂ (A), MgSO₄ e MnCl₂ (B), e CaCl₂ e MnCl₂ (C), na contagem final de células viáveis em 10⁷ UFC/ml após 6 dias de cultivo.

O perfil de peptidases extracelulares mostrou que a adição de sais ao meio de cultivo não altera o perfil de bandas de maneira significativa, exceto para CuSO₄, cuja inibição foi marcante. As maiores diferenças encontram-se nas bandas de 70 e 77 kDa (figura 34)

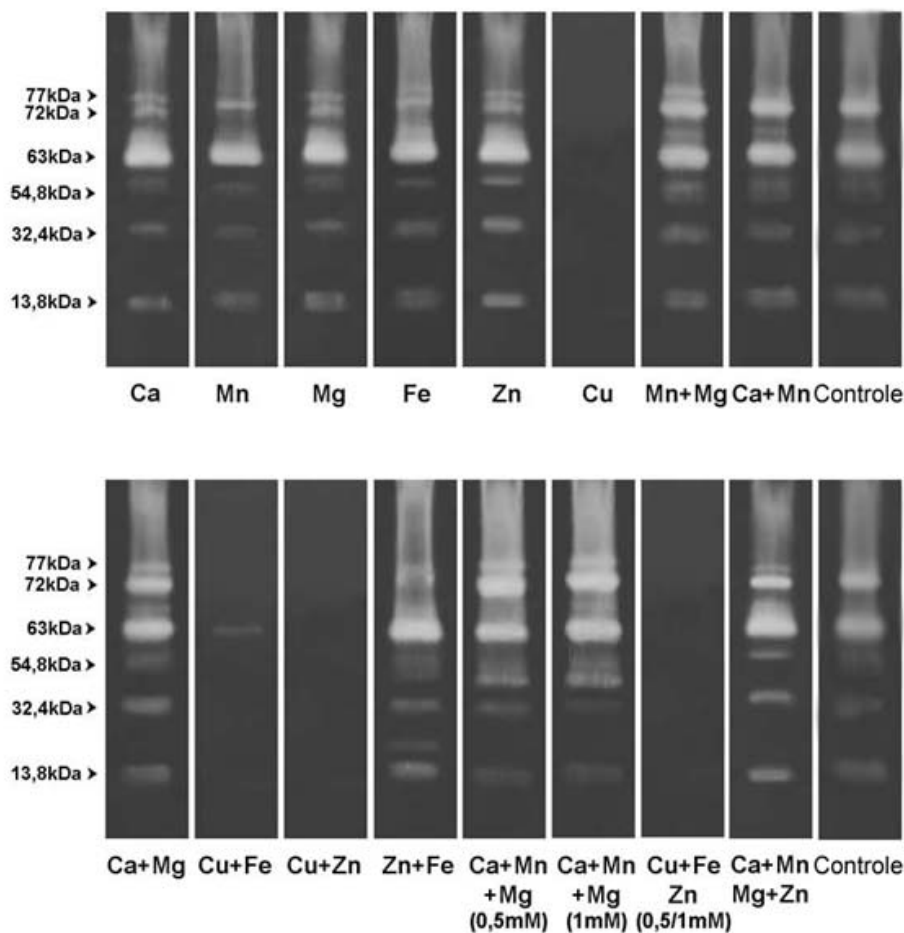


Figura 34: Análise zimográfica mostrando o efeito dos sais CaCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnCl_2 e ZnSO_4 sobre o perfil proteolítico de *B. subtilis* AMR.

Além de extrato de levedura a 0,01%, sacarose e glicose, ambos na concentração de 0,05%, também estimulam a atividade queratinolítica. Deste modo, a influência dos sais MgSO_4 , MnCl_2 e CaCl_2 também foram analisados nos meio contendo estas duas fontes de carbono suplementar usando planejamento experimental fatorial.

As respostas obtidas da influência de sais em meio contendo glicose como fonte adicional de carbono foram analisadas por ANOVA (tabela 19). Esta análise mostrou que para atividade queratinolítica e concentração de proteínas, o modelo

foi estatisticamente significativo, enquanto que para o rendimento da degradação o valor de p foi maior que 0,05. Para a atividade queratinolítica, os termos significativos foram, A (MnCl_2), B (MgSO_4), AB e AC (C – CaCl_2). Os termos significativos para a concentração de proteínas foram C, AB, AC e BC. Para o rendimento da degradação, apenas o termo A foi significativo. Os valores de R^2 encontrados para atividade queratinolítica, concentração de proteínas do sobrenadante de cultura e rendimento de degradação de penas foram 0,9958, 0,9976 e 0,9731. A análise de regressão dos resultados observados propiciou a obtenção das seguintes fórmulas:

$$Y_1 = 234,9 + 111,65*A - 25,9*B + 78,3*C + 46,2*A*B - 115,03*A*C - 65,45*B*C + 44,67*A*B*C$$

$$Y_2 = 7,581 - 0,71*A + 0,928*B + 0,413*C - 2,783*A*B + 3,667*A*C + 0,688*B*C + 2,189*A*B*C$$

$$Y_3 = 87,56 - 37,56*A - 22,06*B - 6,28*C + 32,5*A*B + 26,66*A*C + 26,78*B*C - 33,7*A*B*C$$

Nas equações, Y_1 corresponde a atividade queratinolítica, Y_2 a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura, e Y_3 ao rendimento de degradação das penas. A representa MnCl_2 , B, MgSO_4 e C representa CaCl_2 .

Tabela 19: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas e rendimento em meio contendo glicose a 0,05%

Termos	Queratinase (U/ml)	Proteínas (mg/ml)	Degradação de penas (%)
Soma dos quadrados	24641,36	35,16	1190,24
Graus de liberdade	7	7	7
Quadrado médio	3520,19	5,02	170,03
Valor de F	66,94	116,53	10,33
Prob>F	0.0148	0,0085	0,0910
Desvio padrão	7,5	0,21	4,06
Média	305,14	9,55	77,22
Coef. de variância	2,38	2,17	5,25
R ²	0,9958	0,9976	0,9731
R ² ajustado	0,9809	0,9890	0,8789
Precisão adequada	24,065	38,082	11,298

A tabela 20 mostra os valores observados nos experimentos e os valores preditos pelo modelo.

Tabela 20: Valores observados e preditos pelo delineamento experimental usando planejamento fatorial.

Experimento	MgSO ₄	CaCl ₂	MnCl ₂	Valores observados				Valores preditos			
				Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação	Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação		
1	-1	-1	-1	234,9	7,581	87,56	234,9	7,581	87,56		
2	-1	-1	1	346,55	6,871	50	346,55	6,871	50		
3	-1	1	-1	313,2	7,994	81,28	313,2	7,994	81,28		
4	-1	1	1	309,8	10,951	70,38	309,82	10,951	70,38		
5	1	-1	-1	209	8,509	65,5	209	8,509	65,44		
6	1	-1	1	366,85	5,016	60,44	366,85	5,016	60,44		
7	1	1	-1	221,85	9,610	86	287	9,61	86		
8	1	1	1	309,34	11,973	73,9	309,34	11,973	73,78		
9	0	0	0	344,14	12,060	94,74	288,938	10,7285	73,6125		
10	0	0	0	344,14	12,407	86,92	288,938	10,7285	73,6125		
11	0	0	0	356,7	12,074	92,7	288,938	10,7285	73,6125		

A superfície de resposta foi desenhada para analisar a interação entre os fatores selecionados e assim avaliar as melhores condições para a produção de queratinases e hidrolisados de queratina (avaliado de forma geral pela concentração de proteínas no sobrenadante de cultura). A produção máxima de queratinase alcançada foi 366,85 U/ml quando o meio de cultura testado continha MnCl₂ e MgSO₄ ambos a 1mM, seguido por 348,32 U/ml, quando os três sais foram testados na concentração de 0,5mM, e 346,65 U/ml quando apenas MnCl₂ foi testado (figura 35 A), sendo o desvio 7,5; esses valores são praticamente os mesmos. Entretanto, MgSO₄ usado separadamente levou à redução da atividade de 234,9 U/ml (sem sais) para 209 U/ml. Cloreto de cálcio testado separadamente

levou a um aumento na atividade de 1,33 vezes, e quando acrescido de MnCl_2 , a atividade permaneceu constante (figura 35 B). Porém, quando CaCl_2 foi testado junto com MgSO_4 , a atividade caiu para 221,85 (figura 35 C). Logo, em meio contendo glicose, MgSO_4 e a combinação deste com CaCl_2 diminui a atividade queratinolítica.

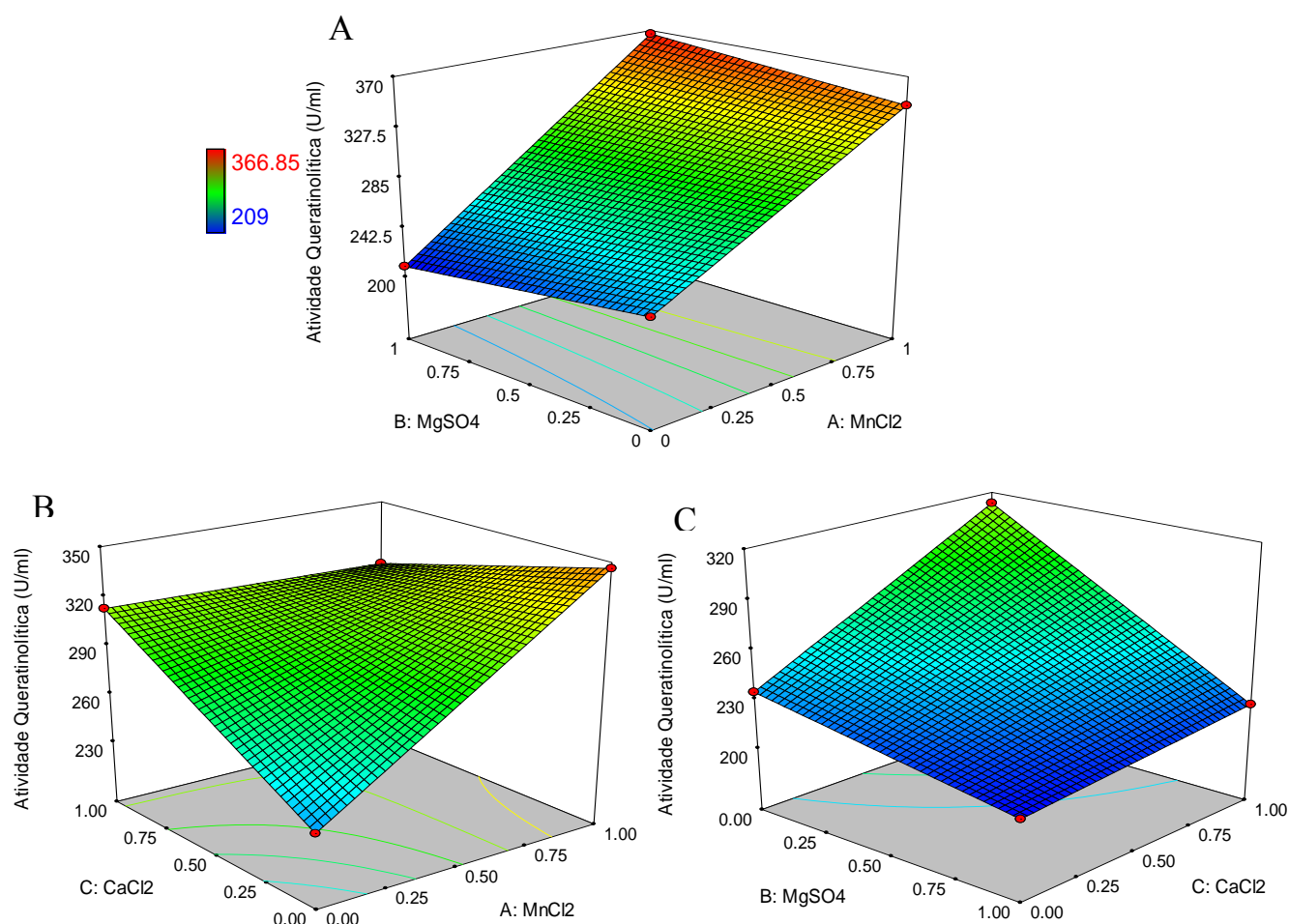


Figura 35: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MnCl_2 e MgSO_4 (A), MnCl_2 e CaCl_2 (B), e CaCl_2 e MnCl_2 (C) sobre a atividade queratinolítica do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR.

A maior concentração de proteínas foi encontrada nos meios contendo os três sais testados na concentração de 0,5 e 1mM (12,18 e 11,9783 mg/ml). Quando a influência entre MnCl_2 e MgSO_4 foi testada, observou-se que apesar de aumentar a produção de queratinases, diminuiu a concentração de proteínas no sobrenadante (figura 36 A), que foi de 5,016, contra 7,581 mg/ml obtidos quando na ausência de sais. Entretanto, MgSO_4 e CaCl_2 , assim como MnCl_2 e CaCl_2 aumentaram a concentração de proteínas, 10,951 e 9,610 mg/ml, respectivamente (figura 37 A e 36 B). Quando MgSO_4 e CaCl_2 foram testados juntos no meio de cultura observamos que, independente da concentração destes sais, a concentração de proteínas se mantém numa faixa entre 7,994 e 9,610 mg/ml, apresentando uma resposta de superfície quase plana (figura 37 A). Quando estes dois sais são avaliados na presença de MnCl_2 1mM, a atividade sobe acentuadamente com o aumento na concentração de CaCl_2 (figura 37 B).

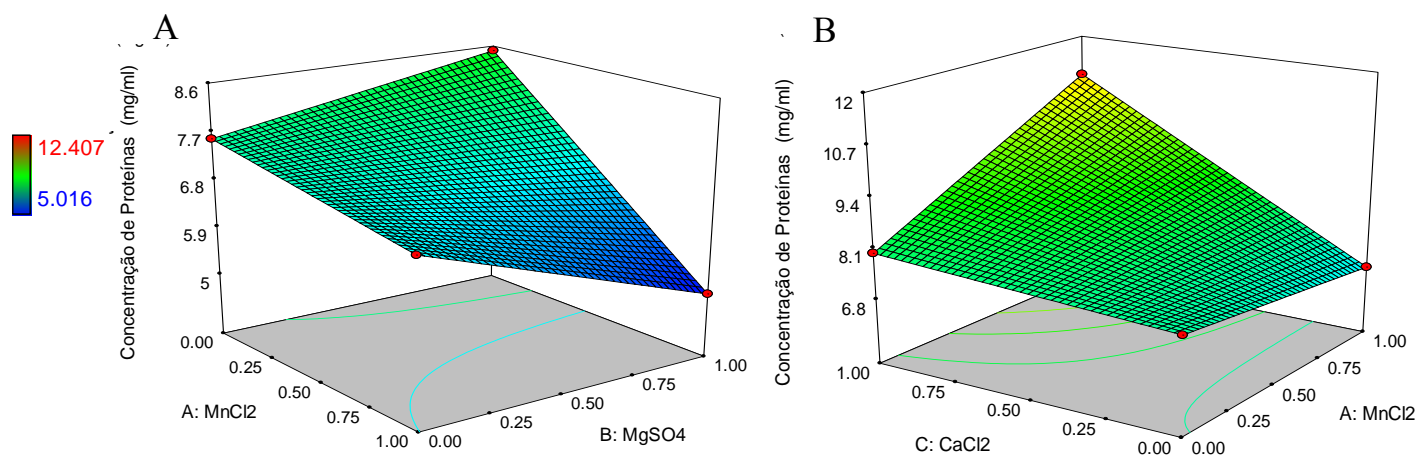


Figura 36: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MgSO_4 e MnCl_2 (A), e de CaCl_2 e MnCl_2 (B) sobre a concentração de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR.

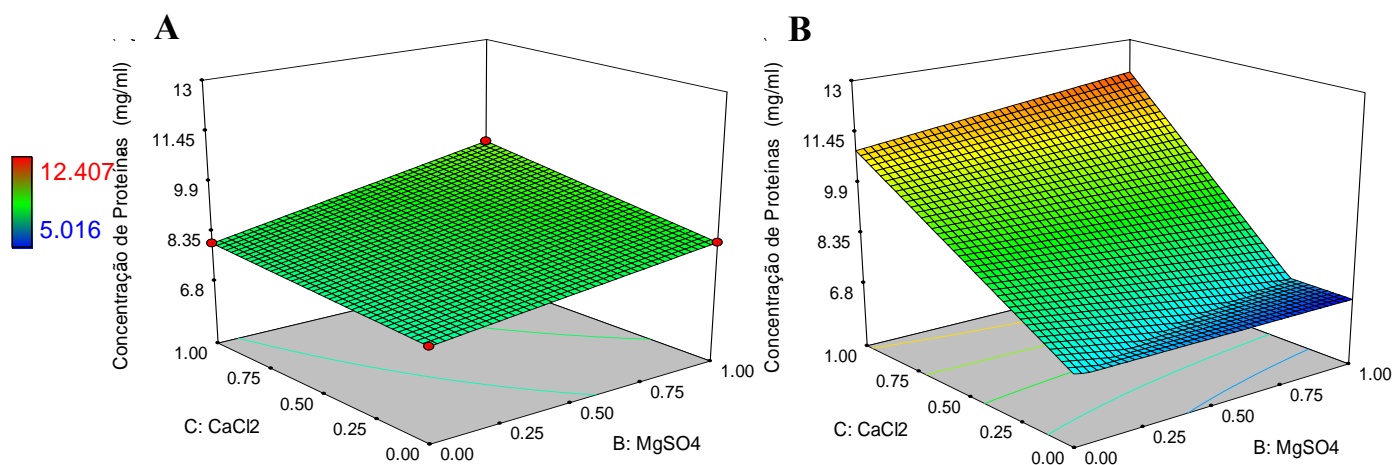


Figura 37: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MgSO₄ e CaCl₂ na ausência (A) ou presença de 1mM de MnCl₂ (B) sobre a concentração de proteínas de *B. subtilis* AMR.

Com relação à influência de sais no consumo de penas por *B. subtilis* AMR, foi observado que o rendimento da degradação não foi significativamente aumentado. Cloreto de manganês levou à redução da hidrólise, tanto isoladamente, como na presença de CaCl₂ e MgSO₄ (figura 38 A e B). Estes dois sais juntos não alteraram o rendimento, que foi de 86% (dado não mostrado), enquanto que na ausência de sais foi de 87,56%. Quando os três sais foram testados a 0,5mM, o consumo de penas foi de 89,81%. Considerando o desvio de 4,06, a adição de sal não deve ser feita caso o objetivo seja degradar penas. Como o objetivo deste experimento foi encontrar as melhores condições para produção de queratinase e hidrolisados de queratina, a melhor condição para tal é o acréscimo destes três sais na concentração de 0,5mM.

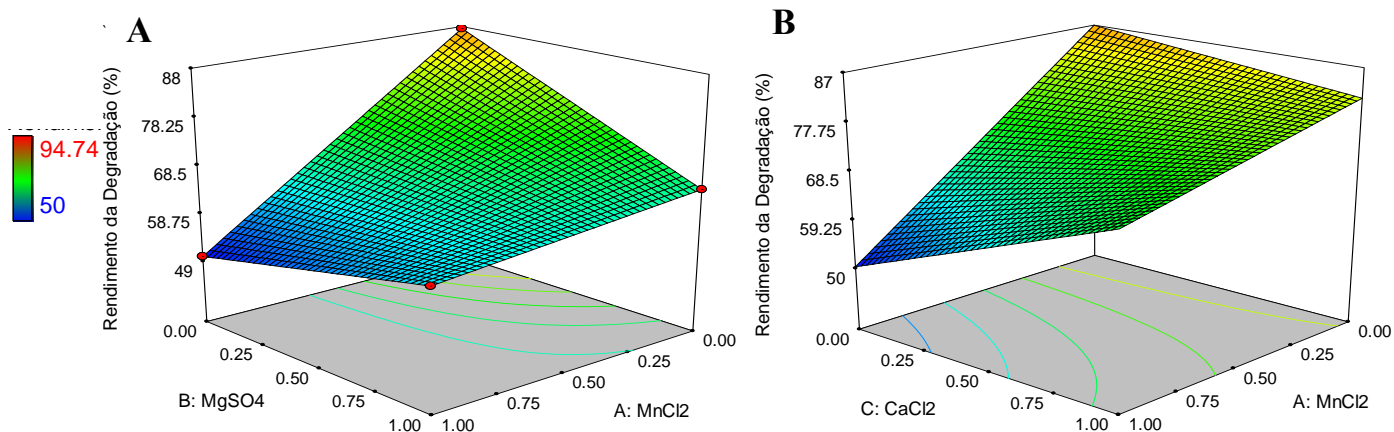


Figura 38: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MnCl₂ e MgSO₄ (A) e MnCl₂ e CaCl₂ (B) sobre a degradação de penas por *B. subtilis* AMR.

O efeito das concentrações dos sais MnCl₂, MgSO₄ e CaCl₂ sobre a produção de queratinases, a concentração de proteínas e degradação de penas foi avaliada em meio contendo penas como principal fonte de carbono e 0,05% de sacarose como fonte adicional. A interação entre esses sais, avaliada através do teste ANOVA, mostrou que o modelo é significativo para atividade queratinolítica apenas (tabela 21). O valor de R² para atividade queratinolítica foi de 0,9958, para a concentração de proteínas foi de 0,9734 e para rendimento da degradação foi de 0,9987, indicando que 99,58, 97,34 e 99,87% da variabilidade na resposta poderia ser explicado pelo modelo.

Tabela 21: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas e rendimento em meio contendo 0,05% de sacarose

Termos	Queratinase (U/ml)	Proteínas (mg/ml)	Degradação de penas (%)
Soma dos quadrados	28394,61	20,04	1479,56
Graus de liberdade	7	7	7
Quadrado médio	4056,37	2,86	211,37
Valor de F	68,17	4,60	10,45
Prob>F	0,0145	0,1900	0,0901
Desvio padrão	7,71	0,79	4,5
Média	332,28	9,42	80,72
Coef. de variância	2,32	8,37	5,57
R ²	0,9958	0,9416	0,9734
R ² ajustado	0,9812	0,7371	0,8802
Precisão adequada	25,291	7,864	9,646

As seguintes equações foram obtidas através da análise de regressão:

$$Y_1 = 259,2 + 40,54*A + 12,8*B + 93,8*C - 62,54000*A*B - 164,74*A*C + 23*B*C + 186,74*A*B*C$$

$$Y_2 = 11,277 - 3,058*A - 3,34*B - 1,478*C + 0,789*A*B + 2,828*A*C + 3,267*B*C - 0,559*A*B*C$$

$$Y_3 = 78,9 - 2,48*A - 22,78*B + 11,4*C - 0,96*A*B - 6,82*A*C + 20,82*B*C + 10,26*A*B*C$$

Nas equações, Y_1 corresponde à atividade queratinolítica, Y_2 à concentração de proteínas no sobrenadante de cultura, e Y_3 o rendimento de degradação das penas. A representa $MnCl_2$, B corresponde à $MgSO_4$ e C representa $CaCl_2$.

Com bases nestas fórmulas, os valores preditos foram calculados e estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22: Valores observados e preditos pelo delineamento experimental usando planejamento fatorial.

Experimento	Valores Observados			Valores Preditos					
	$MgSO_4$	$CaCl_2$	$MnCl_2$	Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação	Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação
1	-1	-1	-1	259,2	11,277	78,9	259,2	11,277	78,9
2	-1	-1	1	299,74	8,219	76,42	300,14	8,219	76,42
3	-1	1	-1	353	9,799	90,3	353	9,799	90,3
4	-1	1	1	228,8	9,596	81	228,8	9,569	81
5	1	-1	-1	272	7,973	56,12	272	7,937	56,12
6	1	-1	1	250,68	5,668	52,68	250	5,668	52,68
7	1	1	-1	388,8	9,726	88,34	388,8	9,726	88,34
8	1	1	1	314,67	10,089	87,06	388,84	8,173	88,34
9	0	0	0	403,2	9,929	91,46	375,07	8,602	80,36
10	0	0	0	398,94	11,451	96,64	375,07	8,602	80,36
11	0	0	0	413,86	10,335	87,68	375,07	8,602	80,36

Na concentração de 0,5mM para os três sais testados a atividade queratinolítica foi a maior observada (405,34 U/ml), seguida de 388,8 U/ml quando o microrganismo foi crescido em meio contendo 1mM de $MgSO_4$ e $CaCl_2$. A figura 39 A mostra a interação entre concentrações de $MgSO_4$ e $CaCl_2$. Na ausência destes

sais a atividade foi de 259,2 U/ml; os pontos vermelhos no gráfico indicam os valores encontrados no ponto central (quando os três sais foram testados na concentração de 0,5 mM). MnCl_2 , quando testado sozinho na concentração de 1mM, apresentou atividade queratinolítica de 299,74 U/ml, um valor um pouco mais alto que na ausência de sais (259,2 U/ml); entretanto, quando testado com CaCl_2 1mM ou MgSO_4 1mM, a atividade queratinolítica caiu para 228,8 e 250,68 U/ml, respectivamente (figura 39 B e C)

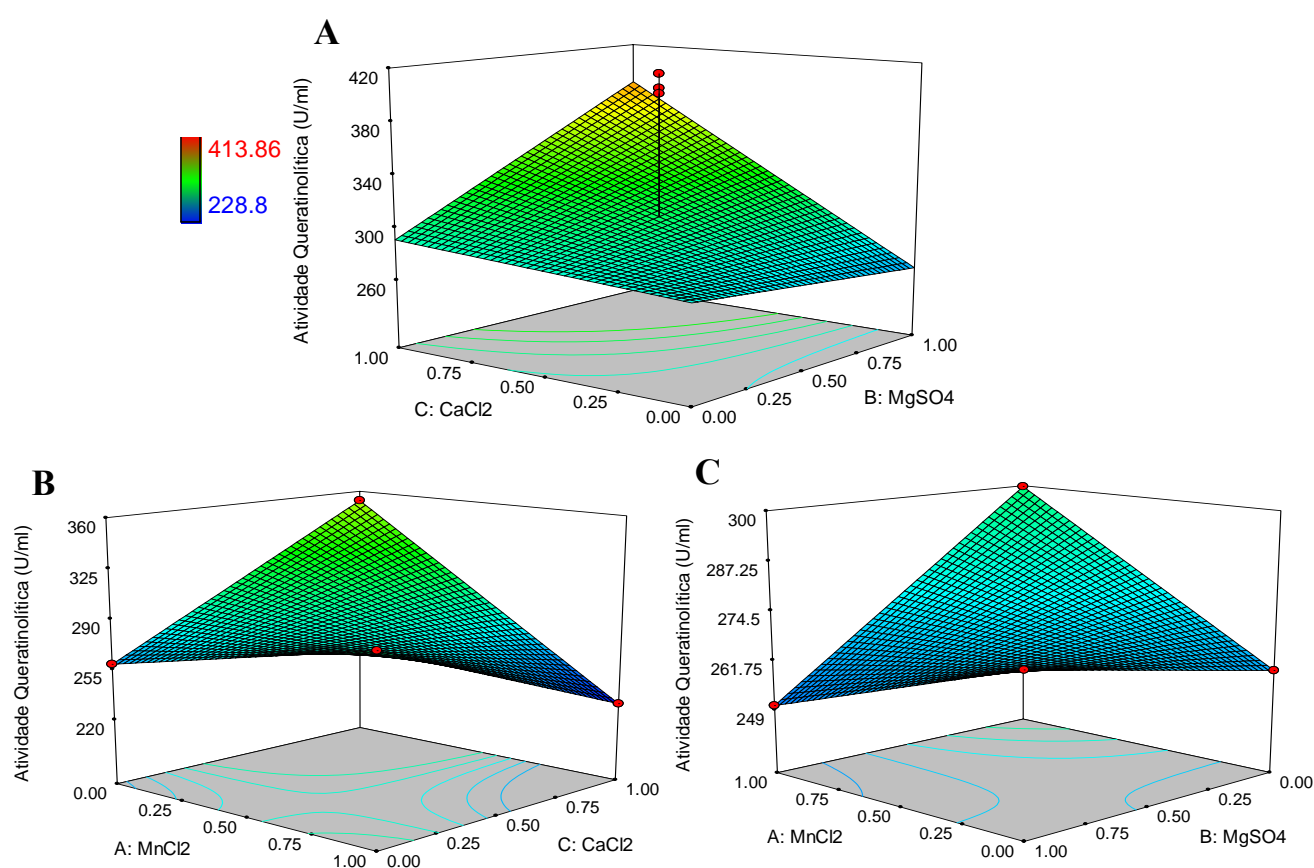


Figura 39: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de CaCl_2 e MgSO_4 (A), MnCl_2 e CaCl_2 (B) e MnCl_2 e MgSO_4 (C) sobre a atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR, em meio contendo 0,05% de sacarose.

A concentração de proteínas não apresentou muitas diferenças com a adição de sais no meio de cultura. Sem sal, a concentração foi de 11,227 mg/ml, enquanto

que em quase todos os testes a concentração variou entre 9,726, e 11,451 mg/ml (este observado no ponto central). Com sacarose no meio de cultura, a concentração de proteínas no meio foi muito mais alta do que quando as demais fontes adicionais de carbono foram utilizadas (7,581 mg/ml para glicose e 3,454 mg/ml para extrato de levedura).

O único ponto destoante foi observado para MnCl_2 e MgSO_4 utilizados a 1mM, quando a concentração de proteínas caiu para 5,668 mg/ml (figura 40 A). Apenas com MnCl_2 a concentração de proteínas foi de 7,973 e quando na presença de CaCl_2 sobe para 9,596 (figura 40 B). CaCl_2 e MgSO_4 , quando analisado juntos, apresentaram um perfil no gráfico de resposta de superfície semelhante ao observado para CaCl_2 combinado com MnCl_2 (figura 40 C).

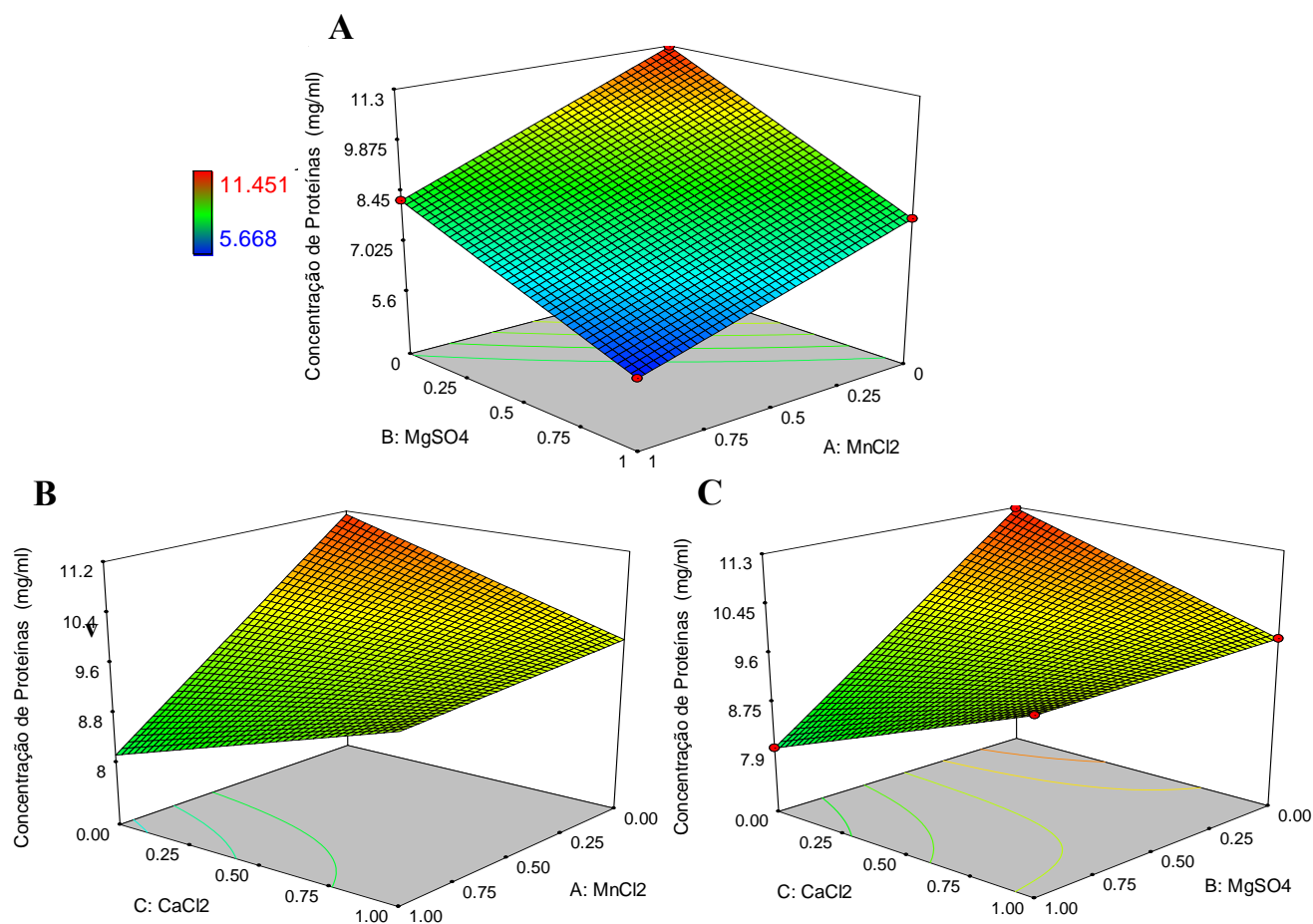


Figura 40: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MnCl_2 , MgSO_4 e CaCl_2 sobre a concentração de proteínas por *B. subtilis* AMR em meio contendo 0,05% de sacarose.

Quanto ao rendimento de degradação das penas no meio de cultura, a maioria dos valores variaram entre 81%, quando MnCl_2 e CaCl_2 foram adicionados a 1 mM no meio de cultura (figura 41 A), e 91,92% (média do ponto central), um valor muito próximo do encontrado quando os três sais foram testados a 1mM. Na ausência de sais a degradação foi de 78,9%. Valores menores foram observados quando MgSO_4 foi testado sozinho (56,12%) e quando este sal foi combinado a MnCl_2 (52,68%), como mostrado na figura 41 B. Quando apenas CaCl_2 foi adicionado ao meio, a degradação de penas foi de 90,3%, um valor próximo ao observado quando MgSO_4 foi testado separadamente ($88,34 \pm 4,5\%$) (figura 41 C).

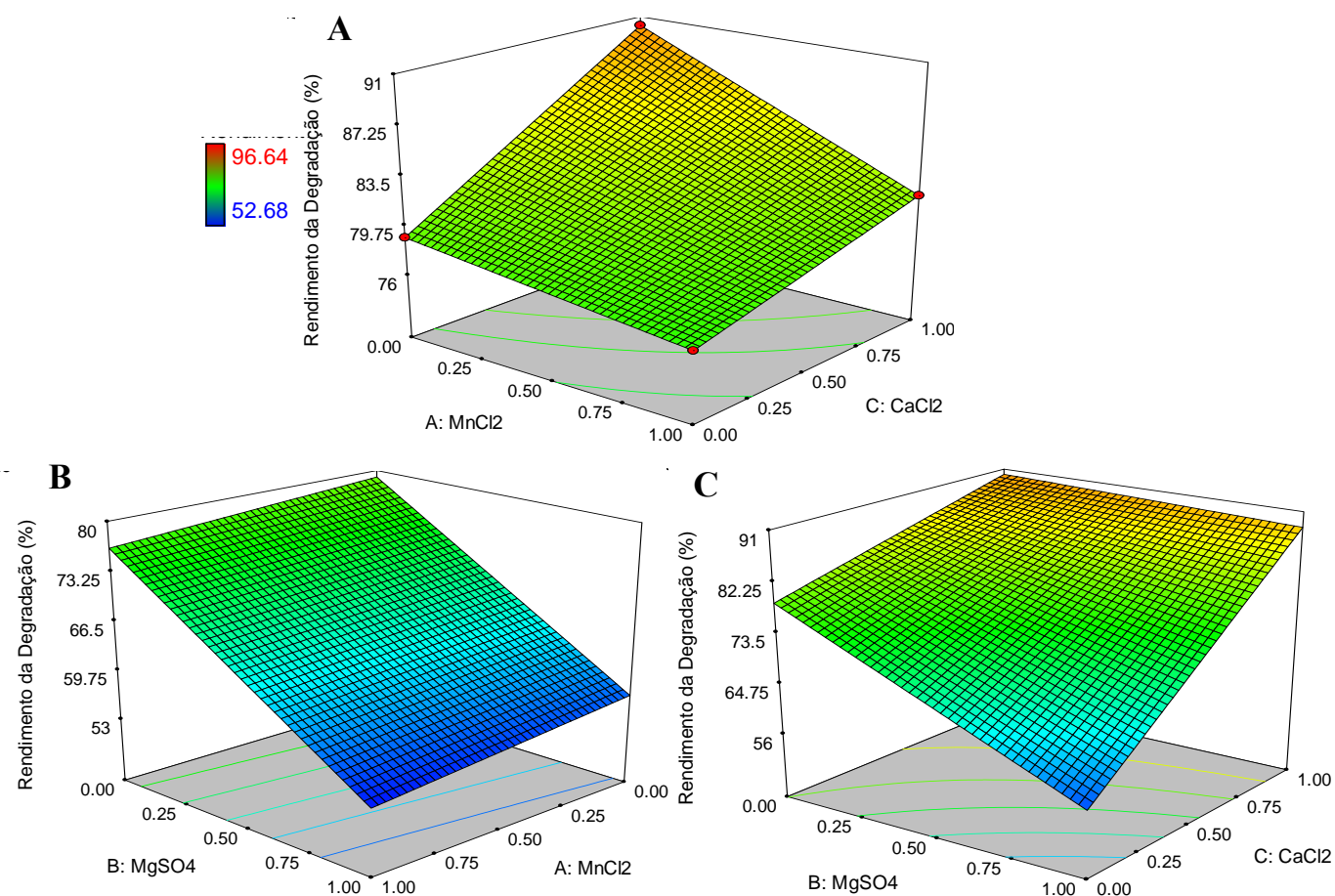


Figura 41: Superfície de resposta e curva de contorno da influência de MnCl_2 e CaCl_2 (A), MgSO_4 e MnCl_2 (B) e MgSO_4 e CaCl_2 (C) sobre a degradação de penas por *B. subtilis* AMR.

4.4.3. Estudo da influência da temperatura, do inóculo e da concentração de penas na produção de queratinases

Para avaliação da melhor contagem inicial de células (inóculo), temperatura de condução do processo e melhor concentração de penas, o planejamento experimental fatorial com três variáveis foi utilizado. Os três inóculos testados foram 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/ml (o inóculo foi feito de tal forma que a contagem inicial fosse esta), as concentrações de penas foram 0,5, 1 e 1,5%, e duas faixas de temperaturas, de 40 a 50°C e de ~25°C (temperatura ambiente) a 35°C.

Na primeira etapa, foi analisada a influência das diferentes concentrações de inóculo, de penas e das temperaturas de 40, 45 e 50°C. Os resultados obtidos, quando avaliados através de ANOVA utilizando limite de significância de 95%, mostraram que o modelo é significativo apenas para a resposta atividade queratinolítica, onde os termos significativos foram A (temperatura) e AC (C-inóculo). Concentração de proteínas e rendimento da degradação de penas apresentaram valores de p maiores que 0,05 (0,0760 e 0,2519, respectivamente), mas quando os termos foram analisados separadamente, a temperatura foi significativo. A temperatura de 50°C afetou negativamente a atividade das queratinases, a concentração de proteínas e o rendimento de degradação das penas. O valor de R^2 para atividade queratinolítica foi de 0,9836, para a concentração de proteínas foi de 0,9382, e para rendimento da degradação foi de 0,8492, indicando que 99,58, 93,82 e 84,92% da variabilidade na resposta poderia ser explicado pelo modelo (tabela 23).

Tabela 23: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas e rendimento para os resultados obtidos da influência da temperatura (40-50 °C), concentração de penas (0,5 – 1,5%) e inóculo (10^6 - 10^8 UFC/ml).

Termos	Atividade queratinolítica	Concentração de proteínas	Rendimento da degradação
Soma dos quadrados	96148,39	63,17	13789,83
Graus de liberdade	7	7	7
Quadrado médio	13735,48	9,02	1969,98
Valor de F	25,70	6,51	2,41
Prob>F	0,0111	0,0760	0,2519
Desvio padrão	23,12	0,03	11,94
Média	171,65	3,98	66,32
Coef. de variância	13,47	29,62	43,09
R ²	0,9836	0,9382	0,8492
R ² ajustado	0,9453	0,7940	0,4972
Precisão adequada	14,726	7,504	4,076

Com os dados obtidos da análise de regressão, as seguintes equações foram formuladas:

$$Y_1 = 689,04046 - 12,51699*A - 5,60465E-006*B + 458,33475*C + 1,22990E-007*A*B - 9,31406*A*C + 4,06525E-006*B*C - 8,59394E-008*A*B*C$$

$$Y_2 = 4,00663 - 0,063484*A - 8,50184E-008*B + 20,77909*C + 2,03384E-009*A*B - 0,39610*A*C + 6,29091E-008*B*C - 1,59697E-009*A*B*C$$

$$Y_3 = + 526,04814 - 10,53599*A - 2,42103E-006*B - 81,18384*C + 6,14949E-008*A*B + 2,00359*A*C + 2,03384E-006*B*C - 5,05859E-008*A*B*C$$

Nas equações, Y_1 corresponde à atividade queratinolítica, Y_2 à concentração de proteínas e Y_3 é o rendimento da degradação. A representa a temperatura, B o inóculo e C a concentração de penas no meio de cultura.

Os dados experimentais coletados e o valores preditos pelo modelos estão na tabela 24. Os valores preditos foram próximos, embora um pouco maiores, aos valores observados.

Tabela 24: Valores observados e preditos experimental usando planejamento fatorial.

experimento	Temperatura	inóculo	[penas]	Valores observados			Valores preditos		
				Atividade queratinolítica	Concentração de proteínas	Rendimento de degradação	Atividade queratinolítica	Concentração de proteínas	Rendimento de degradação
1	-1	-1	-1	222,14	3,863	94,98	230,876	3,930	104,12
2	-1	-1	1	308,54	8,617	93,95	317,276	8,864	103,06
3	-1	1	-1	200,267	3,031	100	194,126	3,519	106,96
4	-1	1	1	348,8	7,869	100	342,665	8,357	103,91
5	1	-1	-1	51,2	1,080	0	59,936	1,327	9,137
6	1	-1	1	43,6	2,037	18,5	52,336	2,284	27,60
7	1	1	-1	108,54	0,931	40,86	102,405	1,419	47,82
8	1	1	1	78,4	1,651	10,31	71,865	2,139	14,22
9	0	0	0	166,14	4,930	79,04	166,257	4,079	61,64*
10	0	0	0	194,94	4,982	95,93	166,257	4,079	61,64*
11	0	0	0	166,14	4,93	87,48	166,257	4,079	61,64*

*valores distantes dos observados

A análise da superfície de resposta da interação entre concentração de penas e inóculo (figura 42 A) mostrou que, quando os experimentos foram conduzidos a 40°C, a atividade queratinolítica foi máxima quando a concentração de penas no meio foi de 1,5% e de inóculo foi de 10^8 UFC/ml (figura 42 A), alcançando 348,8 U/ml; com inóculo de 10^6 UFC/ml a atividade foi um pouco menor (308,54 U/ml). À medida que a temperatura subiu até 50°C, a atividade queratinolítica caiu, chegando a 43,6 U/ml no inóculo de 10^6 e concentração de penas de 1,5%, e mesmo com um inóculo maior (10^8 UFC/ml), atividade foi quase a mesma ($51,2 \pm 7,35$ U/ml) (figura 42 B).

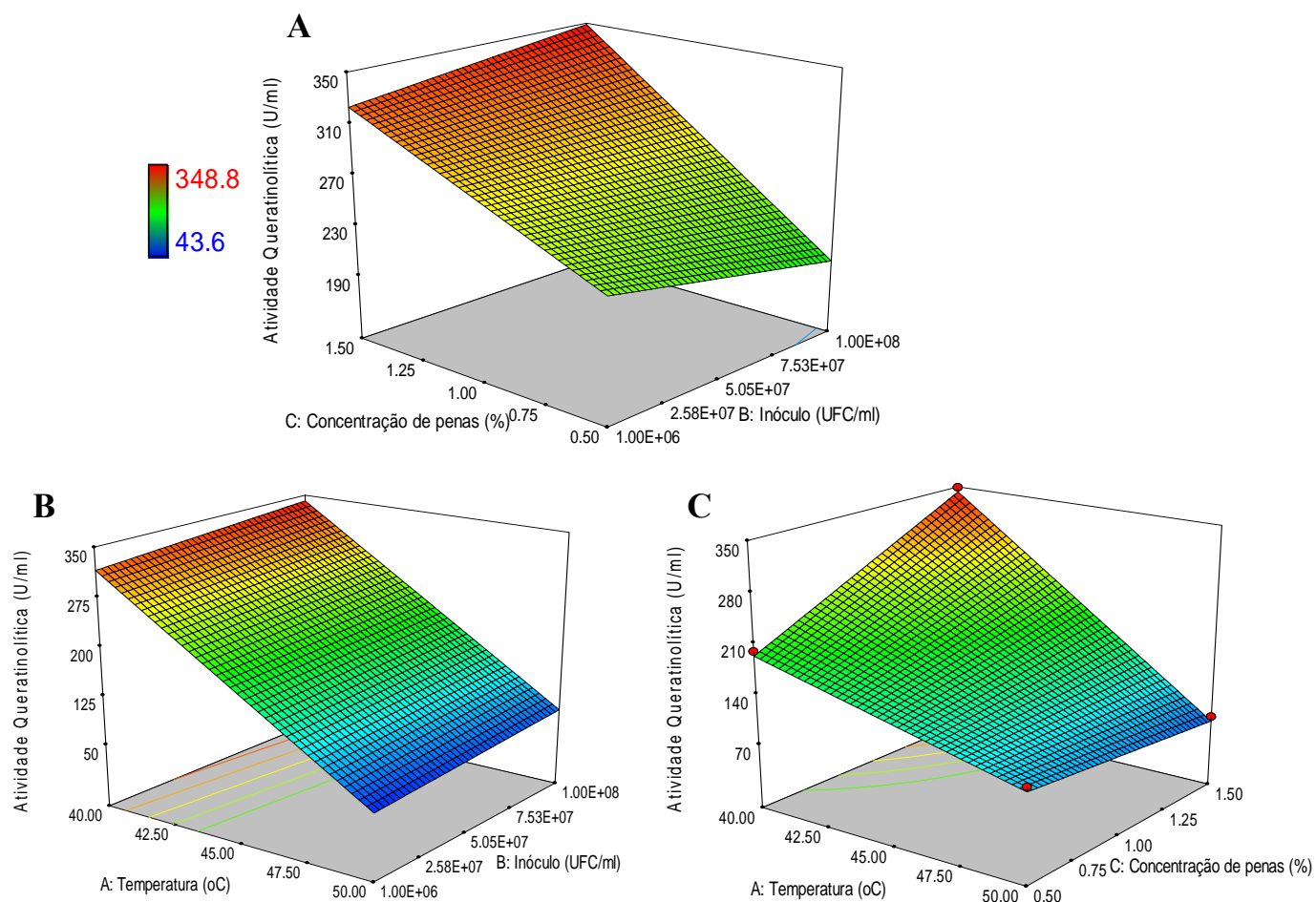


Figura 42: Superfície de resposta e curva de contorno da interação entre a concentração de penas e inóculo (**A**), temperatura e inóculo (**B**) e temperatura e concentração de penas (**C**) sobre a atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR.

Diferenças na quantidade de inóculo utilizada não causaram alterações consideráveis na concentração final de proteínas no meio de cultura de *B. subtilis* AMR (figura 43 A), que para 10^8 UFC/ml foi de 7,869 mg/ml e para 10^6 UFC/ml 8,617 mg/ml, quando a 40°C ; e a 50°C as concentrações foram de 2,037 e 1,651 respectivamente (figura 43 B). Uma vez afetada a atividade queratinolítica pelo aumento da temperatura, a concentração de proteínas também foi afetada (figura 43 A e C). A concentração inicial de penas iniciais no meio de cultura também afetou

a concentração de proteínas; 1,5% foi a que apresentou o melhor resultado, 7,869 e 8,617 mg/ml contra 3,863 e 3,031 mg/ml, respectivamente, quando as penas foram colocadas no meio a 0,5% (figura 43C).

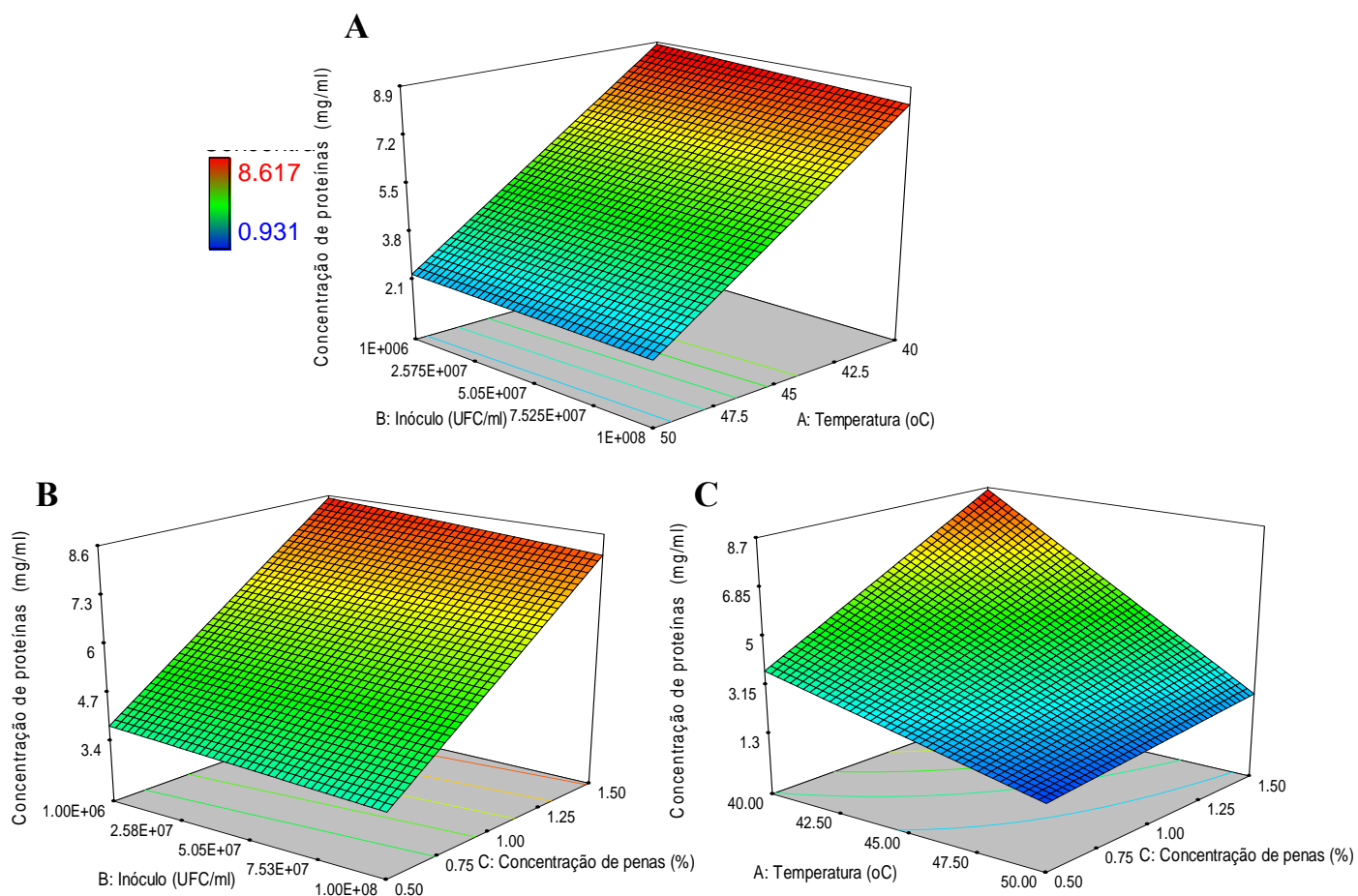


Figura 43: Superfície de resposta e curvas de contorno da interação entre temperatura e inóculo (A), inóculo e concentração de penas (B) e temperatura e concentração de penas (C) sobre a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR.

A degradação de penas pelo microrganismo alcançou 100% a 40°C, independente do inóculo ou da concentração de penas no meio (figura 44 A e B).

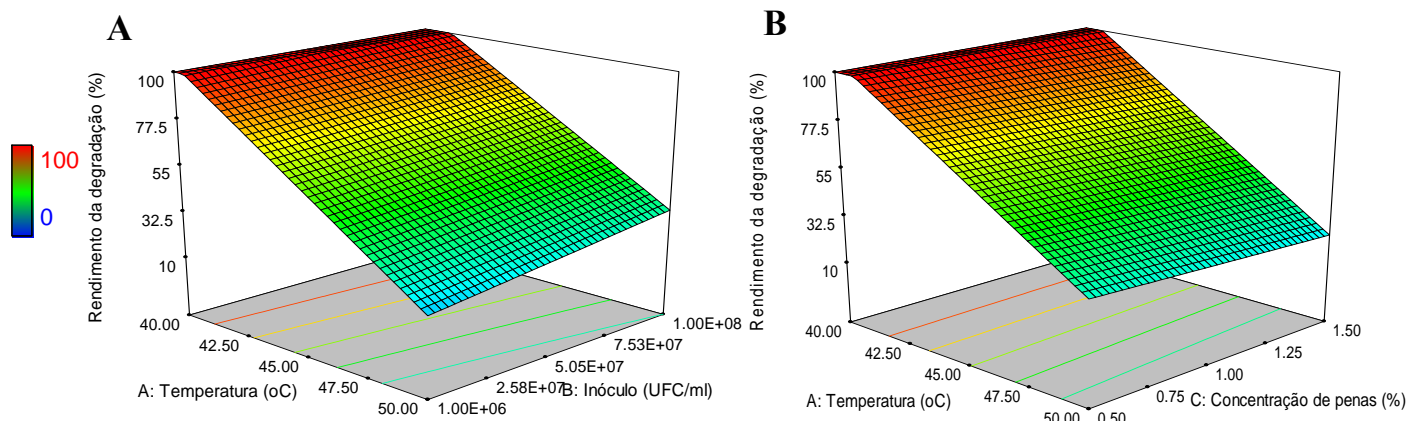


Figura 44: Superfície de resposta e curvas de nível da interação entre temperatura e inóculo (A) e entre temperatura e concentração de penas (B) sobre a degradação de penas por *B. subtilis* AMR.

Os resultados apresentados mostraram que a maior atividade queratinolítica alcançada foi de 348,54 U/ml quando o processo foi conduzido a 40°C, entretanto, atividades maiores poderiam ser encontradas a temperaturas menores. Desta forma, o experimento foi repetido utilizando as temperaturas de ~25°C (temperatura ambiente), 30°C e 35°C.

Os resultados obtidos para atividade queratinolítica, concentração de proteínas e rendimento de degradação foram analisadas por ANOVA. A análise de variância mostrou que os modelos para respostas analisadas não foram significativos (tabela 25). Porém, para as três respostas, a concentração de penas foi o único termo significativo. Os valores de R^2 encontrados foram: 0,9236 para atividade queratinolítica, 0,9168 para concentração de proteínas e 0,9535 para rendimento da degradação (Tabela 25).

Tabela 25: Análise de variância para atividade queratinolítica, concentração de proteínas e rendimento da degradação para os resultados obtidos da influência da temperatura (25-35°C), concentração de penas (0,5 – 1,5%) e inóculo (10^6 - 10^8 UFC/ml).

Termos	Atividade queratinolítica	Concentração de proteínas	Rendimento da degradação
Soma dos quadrados	19510,87	53,64	906,23
Graus de liberdade	7	7	7
Quadrado médio	2787,27	7,66	129,46
Valor de F	5,18	4,72	8,80
Prob>F	0,1020	0,1148	0,0507
Desvio padrão	23,19	1,27	3,84
Média	345,22	5,44	85,2
Coef. de variância	6,72	23,41	4,51
R ²	0,9236	0,9168	0,9535
R ² ajustado	0,7455	0,7728	0,8451
Precisão adequada	6,945	6,600	7,918

Através da análise de regressão dos dados experimentais, as seguintes fórmulas foram obtidas:

$$Y_1 = 125,15379 + 4,51682*A + 4,68316E-006*B + 265,72025*C - 1,49823E-007*A*B - 6,45049*A*C - 3,37025E-006*B*C + 1,16495E-007*A*B*C$$

$$Y_2 = - 5,76144 + 0,21428*A + 1,06569E-007*B + 13,64254*C - 3,22727E-009*A*B - 0,29260*A*C - 2,70404E-008*B*C + 4,98990E-010*A*B*C$$

$$Y_3 = 94,14086 + 0,26094*A + 1,41269E-007*B - 8,75586*C - 1,93939E-009*A*B - 0,32160*A*C - 1,54141E-007*B*C + 3,59596E-009*A*B*C$$

Nas equações, Y_1 corresponde à atividade queratinolítica, Y_2 à concentração de proteínas e Y_3 é o rendimento da degradação. A representa a temperatura, B o inóculo e C a concentração de penas no meio de cultura.

Os valores observados através de análises experimentais e os valores preditos pelo modelo estão na tabela 26.

Tabela 26: Valores observados e preditos experimental usando planejamento fatorial.

Experimento	Temperatura	Inóculo	[penas]	Valores observados			Valores preditos		
				Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação	Atividade Queratinolítica	Concentração de Proteínas	Rendimento de Degradação
1	-1	-1	-1	279,33	2,101	94	291,01	2,778	92,33
2	-1	-1	1	383,33	8,415	77,14	395,01	9,091	75,47
3	-1	1	-1	360	4,553	98,8	361,17	4,620	98,33
4	-1	1	1	418,67	9,423	75,28	419,84	9,491	75,11
5	1	-1	-1	291,33	2,751	95	303,01	3,428	93,33
6	1	-1	1	332	6,144	74,96	343,67	6,820	73,29
7	1	1	-1	281,33	2,255	99,36	282,51	2,322	99,19
8	1	1	1	392	4,698	76,52	393,17	4,766	76,35
9	0	0	0	364	6,576	79,02	335,99	5,508	83,93
10	0	0	0	346	6,306	81,02	335,99	5,508	83,93
11	0	0	0	349,33	6,623	84,4	335,99	5,508	83,93

Apesar dos modelos não se mostrarem significativos, o parâmetro concentração de penas teve significância, e foi possível construir as superfícies de respostas. Para atividade queratinolítica, foi observado que a maior atividade (418,67 U/ml) ocorreu quando o meio de cultura continha 1,5% de penas, inóculo inicial de 10^8 UFC/ml e o processo foi realizado a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), como mostra a figura 45 A e B. A concentração de proteínas também foi maior nas mesmas condições (9,423 mg/ml), como mostra as respostas de superfície da interação entre temperatura e concentração de penas com inóculo de 10^8 UFC/ml (figura 46 A) e entre inóculo e concentração de penas com temperatura de $\sim 25^\circ\text{C}$ (figura 46 B).

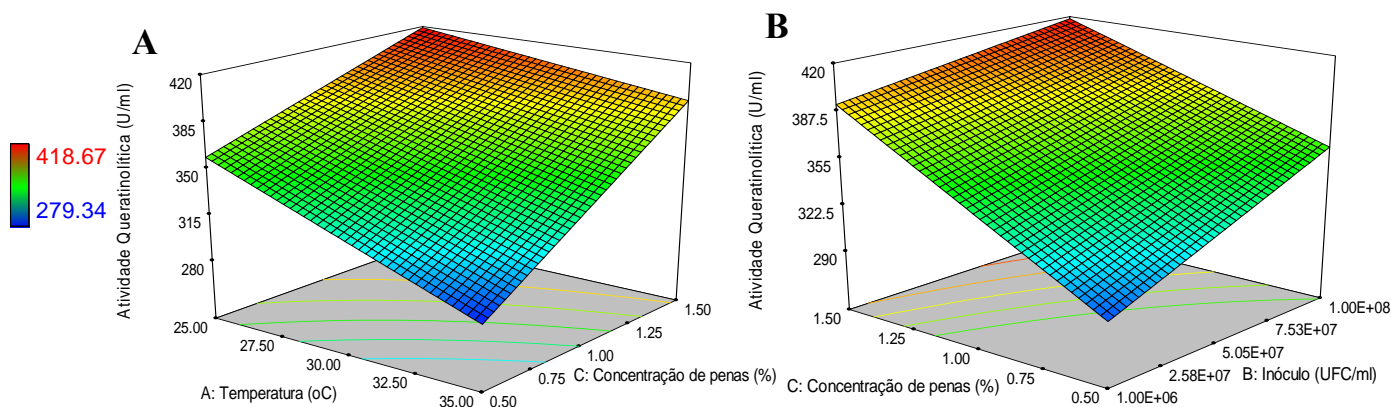


Figura 45: Superfície de resposta e curvas de nível da interação entre temperatura e concentração de penas (A) e entre a quantidade de inóculo e concentração de penas (B) sobre produção de queratinases por *B. subtilis* AMR.

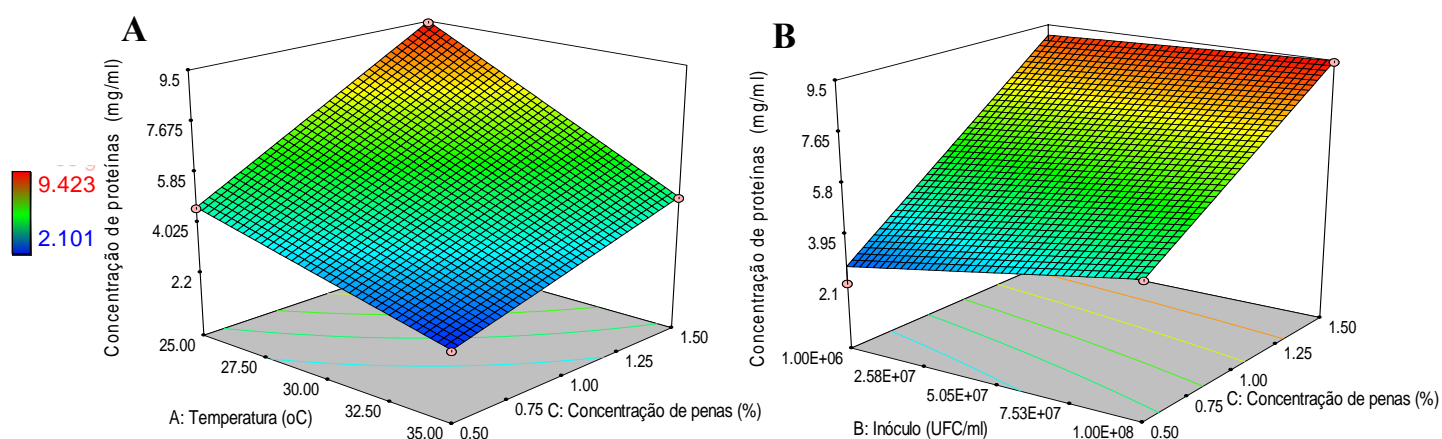


Figura 46: Superfície de resposta e curvas de nível da interação entre temperatura e concentração de penas (A), e entre quantidade de inóculo e concentração de penas (B) sobre a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR.

Com relação ao rendimento de degradação, a temperatura mostrou ter pouco efeito (figura 47 A), apresentando valores de 98,8 e 99,36% para as temperaturas de processo de 25 e 35°C, respectivamente, quando em meio contendo 0,5% de penas e inóculo de 10^8 UFC/ml. A presença de 0,5% de penas no meio de cultura levou a uma degradação maior que 1,5% (98,8 e 75,28 % respectivamente). O inóculo também teve pouco efeito sobre a degradação (figura 47 B). Quando em temperatura de 25°C e em meio contendo penas 1,5%, *B. subtilis* AMR degradou 75,28% do substrato quando inoculado a 10^8 UFC/ml, e 77,14% a 10^6 UFC/ml, sem diferença alguma considerando o desvio de 3,84 (figura 47 B). Com concentração de penas de 0,5% a diferença também foi mínima (99,36 e 94%, respectivamente).

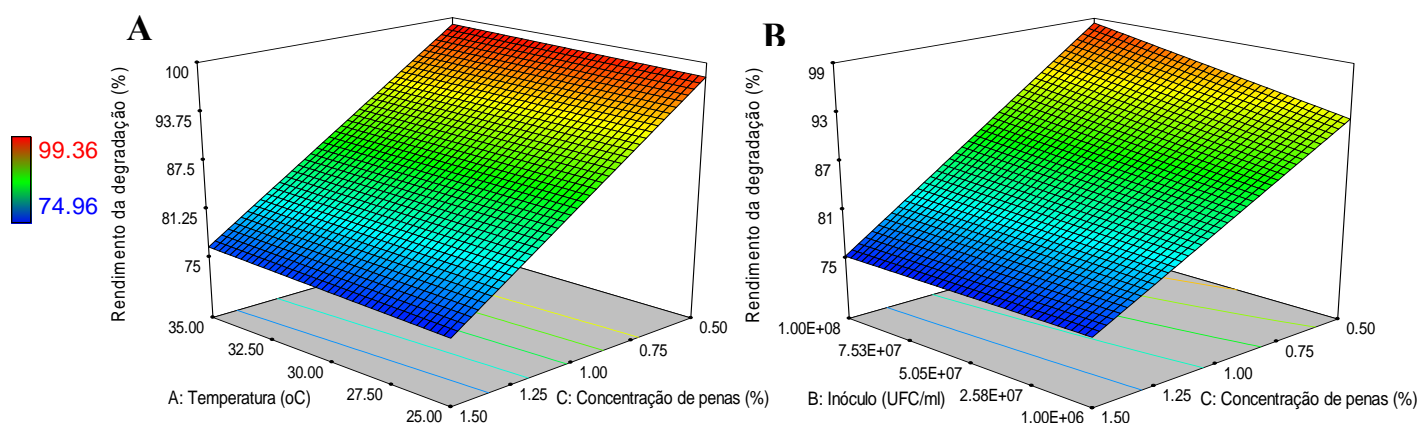


Figura 47: Superfície de resposta e curvas de nível da interação entre temperatura, quantidade de inóculo e concentração de penas sobre o rendimento da degradação de penas por *B. subtilis* AMR.

Em suma, a melhor temperatura para produção de queratina e proteínas por *B. subtilis* AMR foi 25°C; embora as diferenças nos valores entre 25-35°C não tenham sido significativas, 25°C se mostra mais apropriado por não requerer aquecimento. A quantidade de células iniciais também não foi estatisticamente significativo. O inóculo de 10^8 UFC/ml foi escolhido para os próximos experimentos. A melhor quantidade de penas no meio de cultura foi 1,5%.

4.4.4. Estudo da influência da fonte de nitrogênio suplementar na produção de queratinases

Diferentes fontes suplementares de nitrogênio [(NH₄)SO₄, NaNO₃, KNO₃, e uréia] em diferentes concentrações (0,6, 0,8 e 1,0%) foram testadas para averiguar seu efeito sobre a produção de queratinases e na concentração de proteínas solúveis no meio de cultura.

Nitrato de potássio na concentração de 0,8 e 1,0% aumentou a atividade queratinolítica em 129,8 e 150%, respectivamente, em relação ao controle (meio sem uma fonte de nitrogênio inorgânico), como representado na figura 48. Esta figura mostra que sulfato de amônio a 0,6% diminuiu a atividade queratinolítica, entretanto, quando sua concentração aumenta para 0,8%, há acréscimo na atividade, alcançando um valor ($354,45 \pm 11,67$ U/ml) próximo ao valor do encontrado no controle ($348,8 \pm 9,32$ U/ml). Quando a concentração de sulfato de amônio testada foi 1,0%, a atividade queratinolítica apresentada foi de $408,04 \pm 14,78$ (U/ml). Uréia inibiu a atividade de queratinase: o valor de atividade queratinolítica encontrado no sobrenadante de cultura usando uréia a 0,6% foi 4,29 vezes menor que no controle. Nitrato de sódio também reduziu a atividade de queratinase do microrganismo. Duas fontes de nitrato (nitrato de potássio e nitrato de sódio) foram testadas e os resultados obtidos foram consideravelmente distintos (figura 48).

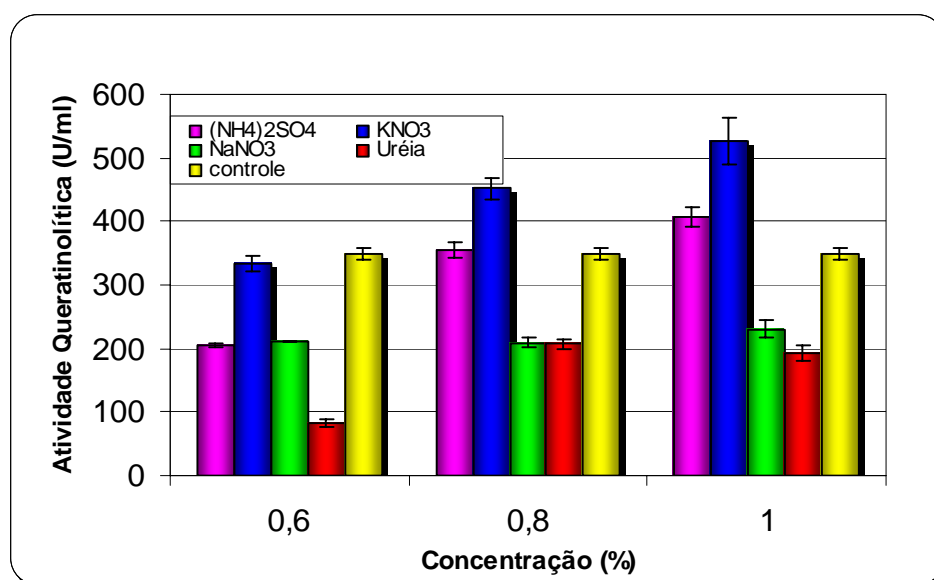


Figura 48: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR.

Apesar de algumas fontes de nitrogênio terem aumentado a atividade queratinolítica, a concentração de proteínas solúveis e o rendimento de degradação de penas não acompanharam este aumento (figuras 49 e 50, respectivamente). A concentração de proteínas do meio contendo 1,0% de nitrato de sódio corresponde a 66,59% do meio sem fonte de nitrogênio inorgânico, enquanto uréia teve uma concentração de proteínas 5,6 vezes menor que o controle (figura 49).

Com relação ao rendimento da degradação, nenhuma fonte de nitrogênio aumentou a degradação de penas (figura 50).

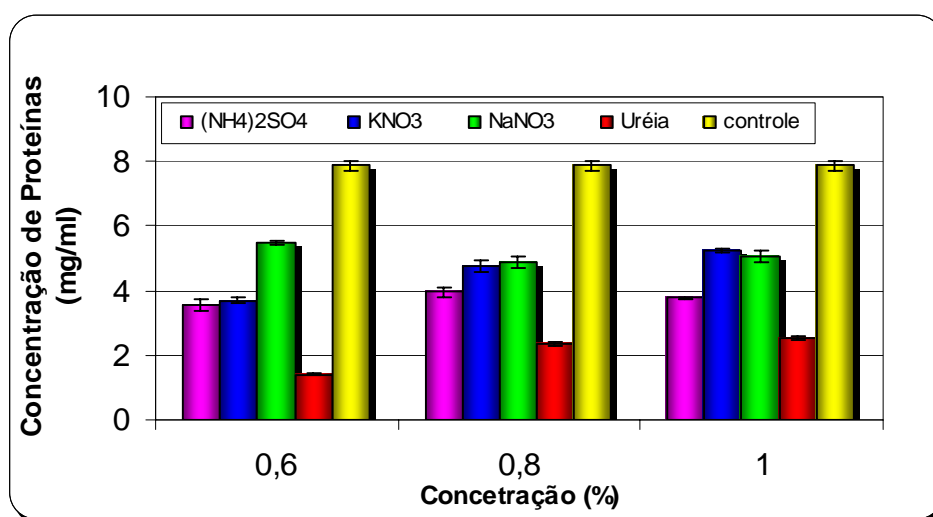


Figura 49: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre a concentração de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR.

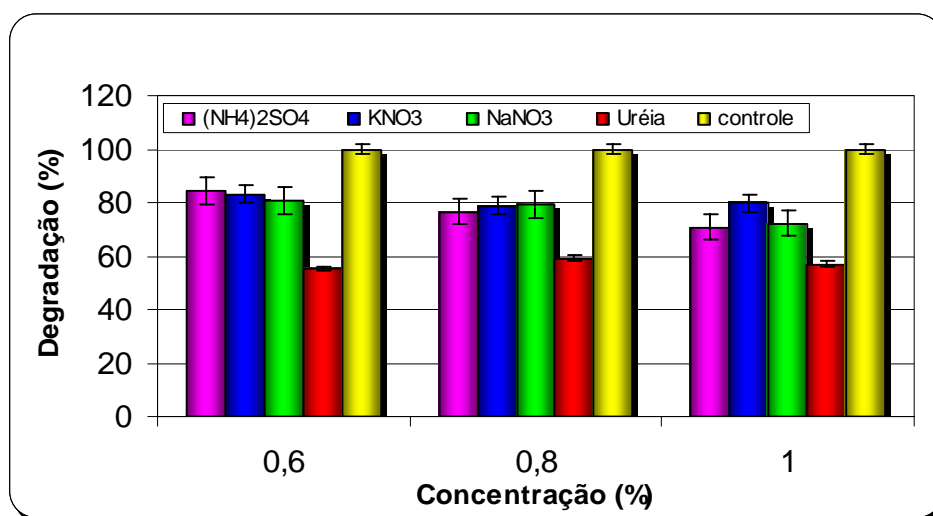


Figura 50: Efeito de diferentes fontes suplementares de nitrogênio sobre o rendimento da degradação de penas por *B. subtilis* AMR.

Como um dos principais objetivos deste trabalho é utilizar o hidrolisado de penas, mensurado através da determinação da concentração de proteínas, para incorporação em rações, a adição de uma fonte adicional de nitrogênio não se mostrou necessária.

4.4.5. Cinética de crescimento na presença de penas em condições otimizadas

Nos experimentos anteriores, foi determinado que para melhor produção de queratinases e hidrolisado de queratina o meio de cultivo de *B. subtilis* AMR deve ser suplementado com 0,05% de sacarose, conter MgSO₄, CaCl₂ e MnCl₂ na concentração de 0,5 mM e penas a 1,5%, partir de um inóculo de 10⁸ UFC/ml e que a fermentação deve ser conduzida à temperatura ambiente. Com base nestes dados foi realizada a cinética de crescimento e produção de enzimas e proteínas conforme descrito no item 3.10.

A atividade queratinolítica cresceu constantemente até 72 horas (303,4 U/ml), seguida de uma queda de 36 unidades registrada no tempo 80 horas, voltando a subir até atingir o máximo em 168 horas (454,56 U/ml), como mostra a figura 51. Concomitantemente, a concentração de proteínas também cresceu constantemente até 96 horas (10,870 mg/ml) com algumas pequenas quedas nos tempos 80, 120 e 144 horas, mas, de forma geral, manteve-se constante até 184 horas (12,445 mg/ml), como mostra a figura 52.

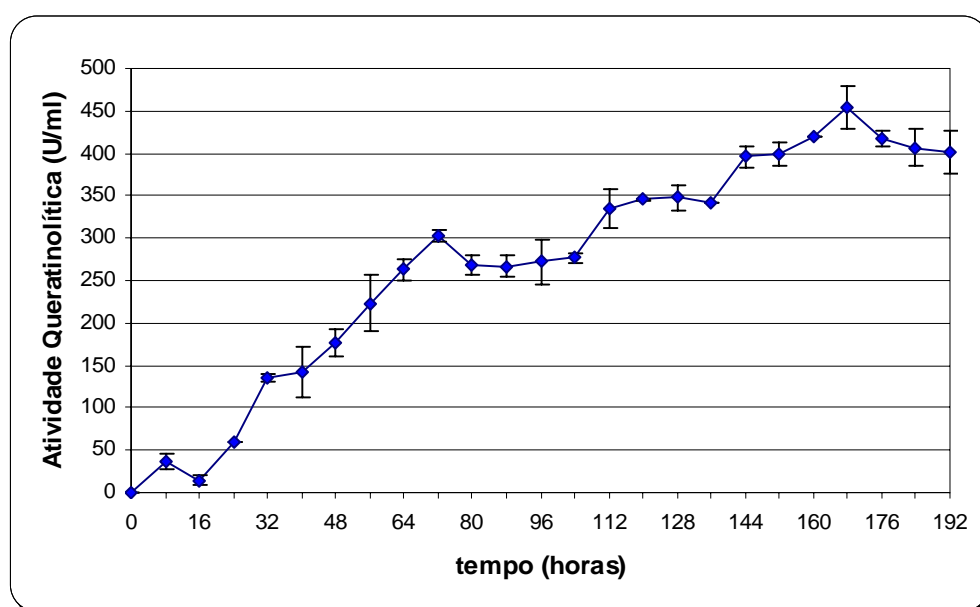


Figura 51: Cinética de produção de queratinases pela amostra *B. subtilis* AMR em meio penas otimizado

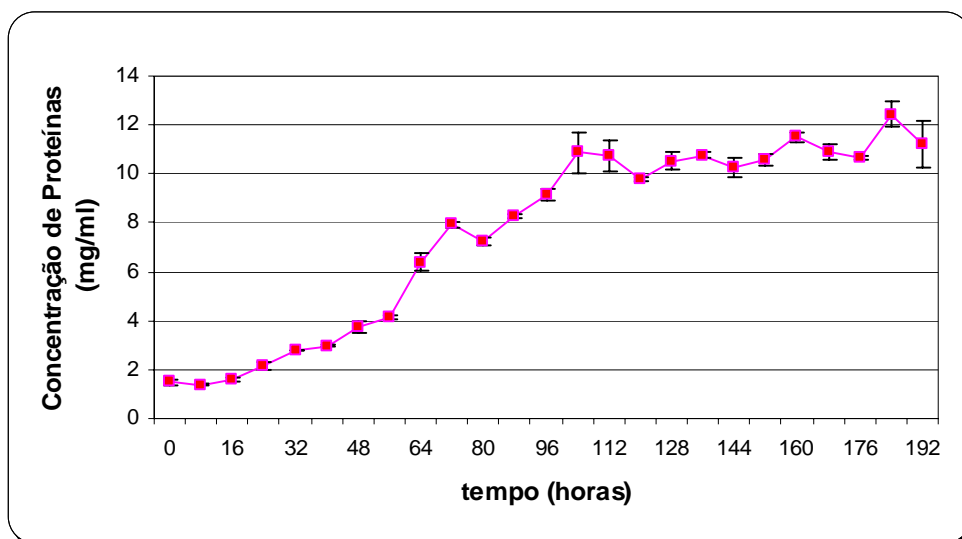


Figura 52: Cinética de produção de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio penas otimizado.

Quanto à atividade gelatinolítica, foi observado que houve aumento da atividade até 40 horas (457,35 U/ml), seguida de uma queda no tempo 48h, com 303,80 U/ml (Figura 53), voltando a subir em 72 horas (459,57 U/ml), acompanhando uma elevação na contagem de esporos do meio (figura 54), seguida de uma nova diminuição na atividade no tempo 80 horas, o mesmo ocorrendo com a contagem de esporos. Um perfil de picos de atividade é observado durante toda a cinética de produção de peptidases. O máximo de atividade foi observado em 160 horas (615,48 U/ml).

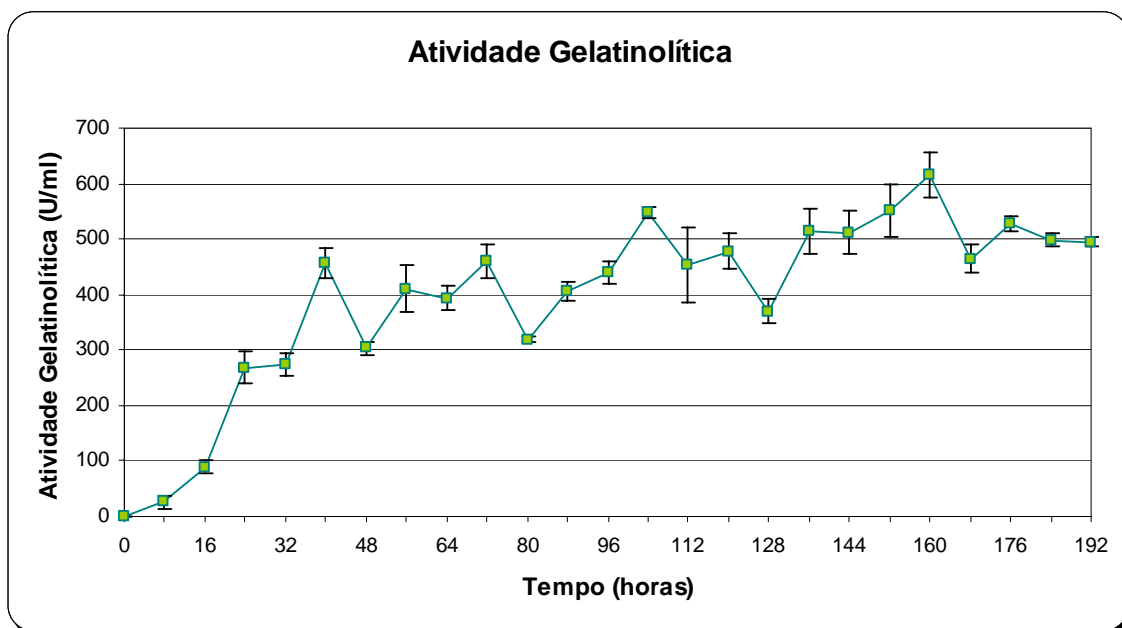


Figura 53: Cinética de produção de peptidases utilizando substrato gelatina pela amostra *B. subtilis* AMR em meio penas otimizado.

Foi observado que a produção de queratinase não está relacionada com o crescimento do *B. subtilis* AMR (figuras 51 e 54). O microrganismo não apresentou um ciclo de crescimento típico, entrando em fase estacionária de longa duração após 80 horas de cultivo.

A quantidade de células no meio permaneceu quase constante (começando com 4×10^8 e terminando com $2,7 \times 10^8$ UFC/ml), com ligeiras quedas e elevações, acompanhadas pela contagem de esporos. Esta se iniciou com 2×10^4 UFC/ml e subiu para $1,9 \times 10^5$ UFC/ml após 192 horas (figura 54 A). A dosagem da atividade de malato desidrogenase, uma enzima intracelular, mostrou que, apesar de baixa, a atividade desta enzima foi detectada. Este é um indicativo de que houve morte celular, também em um perfil de picos (figura 54 B), porém com um período de elevação entre 64 e 144 horas; curiosamente, a partir de 58 horas a contagem de esporos passa da ordem de 10^4 para 10^5 UFC/ml e se mantém constante.

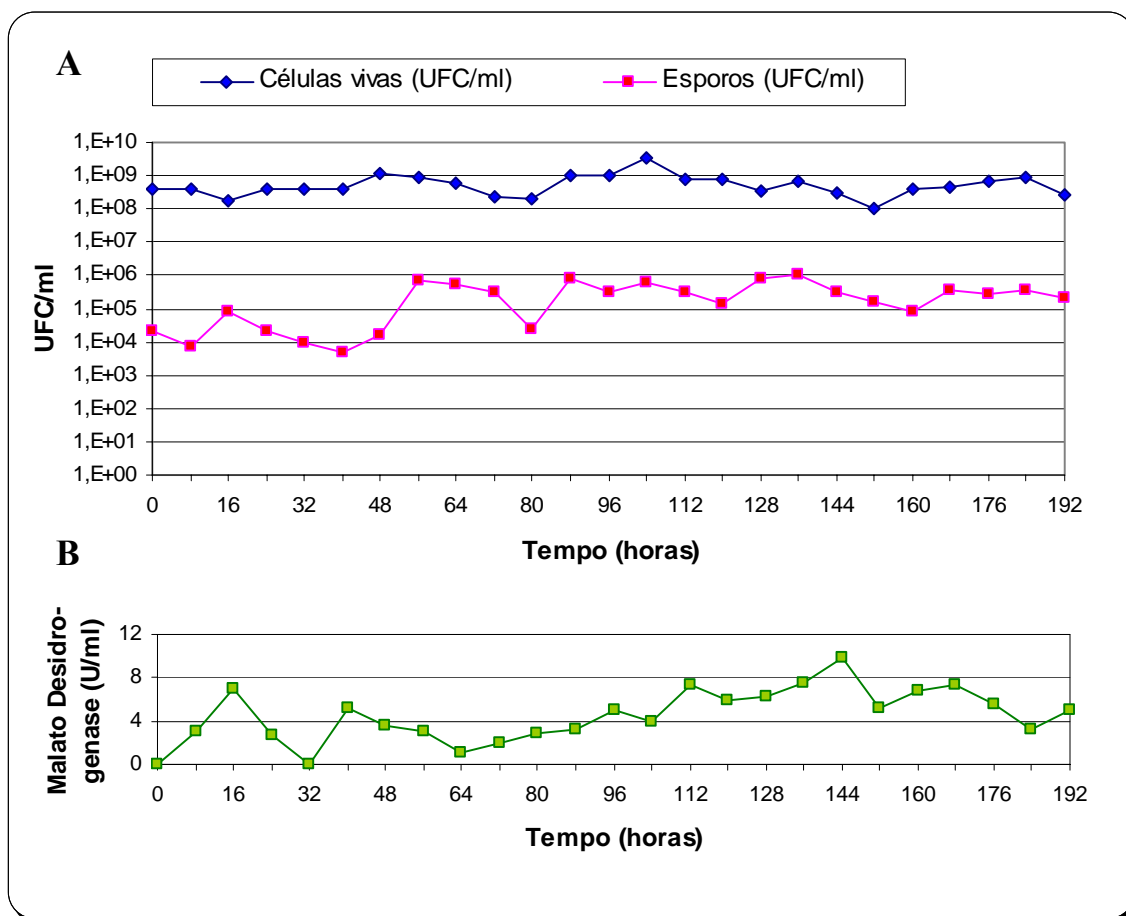


Figura 54: Cinética de crescimento da amostra *B. subtilis* AMR em meio penas. **A:** contagem de células vegetativas e esporos no meio de cultura durante 192 horas de fermentação. **B:** dosagem da atividade de malato desidrogenase do sobrenadante de cultura. Este experimento foi realizado em quadruplicata.

4.5. Otimização da produção de queratinases em farinha de penas

4.5.1. Efeito do pH na produção de queratinase e degradação de farinha de penas

A influência do pH do meio de cultura contendo farinha de penas sobre a atividade enzimática mostrou que o *B. subtilis* AMR produz mais queratinases e peptidases em meio neutro a levemente ácido (7,0-6,0). As atividades de

queratinase e gelatinase nestas condições foram quase as mesmas, sendo $468 \pm 40,72$ e $448,02 \pm 73,51$ U/ml em pH 6,0 e $487,2 \pm 16,62$ e $495,05 \pm 38,5$ U/ml em pH 7,0 (figura 55).

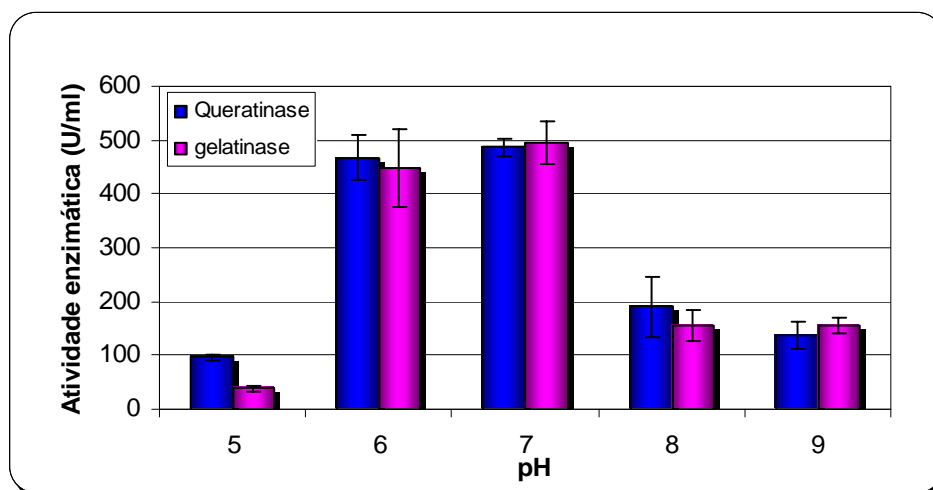


Figura 55: Efeito do pH sobre a atividade queratinolítica e gelatinolítica do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio contendo farinha de penas como única fonte de carbono e nitrogênio após 6 dias de cultivo.

Quanto à degradação da farinha de penas do meio, os mesmos valores de pH foram observados como melhores, sendo a degradação em pH 7,0 5% maior que em pH 6,0 (figura 56). Apesar dos valores de atividade enzimática e degradação terem ficado próximos nestas condições, a concentração final de proteína no meio de cultura em pH 7,0 foi 52% maior que em pH 6,0, 5,65 e 3,71 mg/ml, respectivamente (figura 57). A concentração de proteínas no meio de cultura antes do inóculo com microrganismo foi mensurada. Em todos os valores de pH testados foi utilizada a mesma quantidade de farinha de penas, entretanto foi observado que o aumento do pH permite uma melhor dissolução da farinha de penas, já que concentrações mais altas de proteínas solúveis foram detectadas em meios mais alcalinos (figura 57). Foi observado também que nos valores de pH 8,0 e 9,0, a

concentração de proteínas no final da fermentação foi menor que no momento inicial, indicando que o microrganismo consumiu essas proteínas solubilizadas.

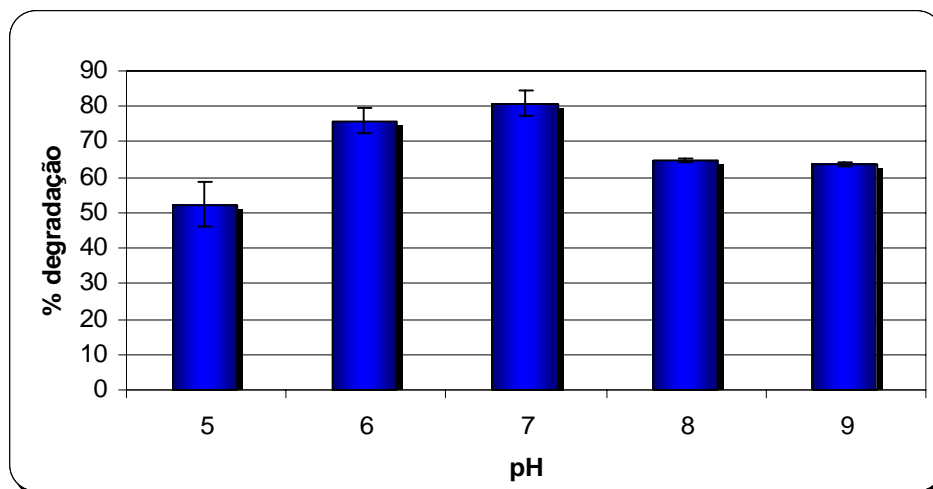


Figura 56: Efeito do pH do meio de cultivo sobre a degradação de farinha de penas por *B. subtilis* AMR após 6 dias de incubação.

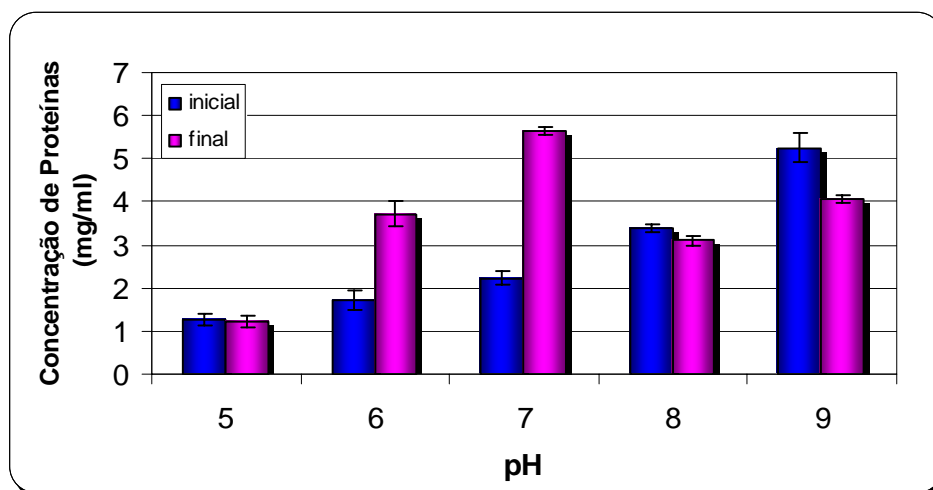


Figura 57: Efeito do pH do meio sobre a concentração de proteínas solúveis no sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio contendo farinha de penas como única fonte de carbono e nitrogênio após 6 dias de cultivo.

4.5.2. Efeito da concentração de farinha de penas na produção de queratinases e na degradação do substrato

Diferentes concentrações do substrato foram testadas (1-15%) para determinar a concentração máxima de farinha de penas que pode ser usada no meio de fermentação para a produção de queratinases e proteína hidrolisada.

Para a produção de queratinase, a melhor concentração de farinha no meio de cultura foi 2%, com $401,2 \pm 3,66$ U/ml (figura 58). A atividade nas concentrações próximas à melhor concentração foram consideravelmente menores, de $253,6 \pm 26,02$ U/ml em 1,5% e $210,01 \pm 17,73$ U/ml em 3%. Nas concentrações de 5 e 9 % de farinha de penas, o microrganismo também produziu alta atividade de queratinase ($332,5 \pm 17,32$ e $308,75 \pm 30,05$ U/ml).

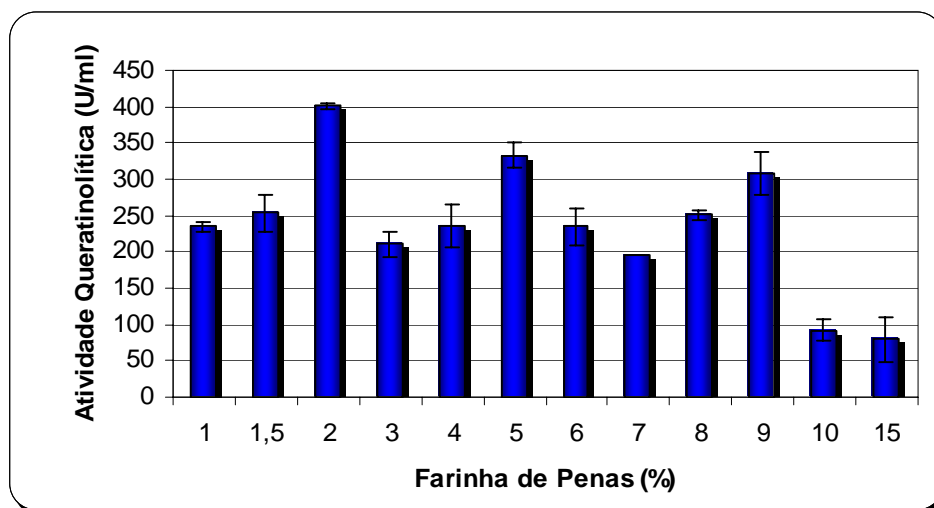


Figura 58: Efeito da concentração de farinha de penas sobre a produção de queratinases por *B. subtilis* AMR.

Entretanto, quanto à degradação do substrato farinha de penas do meio, a melhor concentração deste foi de 1% (figura 59) com 79,36%. Na concentração de 2%, melhor para a atividade queratinolítica, a degradação foi de 60,72%; embora aparentemente o rendimento da degradação pareça mais baixo, é preciso considerar que a quantidade de substrato no meio para ser degradado dobrou. Já quando a concentração de farinha de penas foi de 3%, a degradação foi quase duas vezes menor que na concentração de 2%.

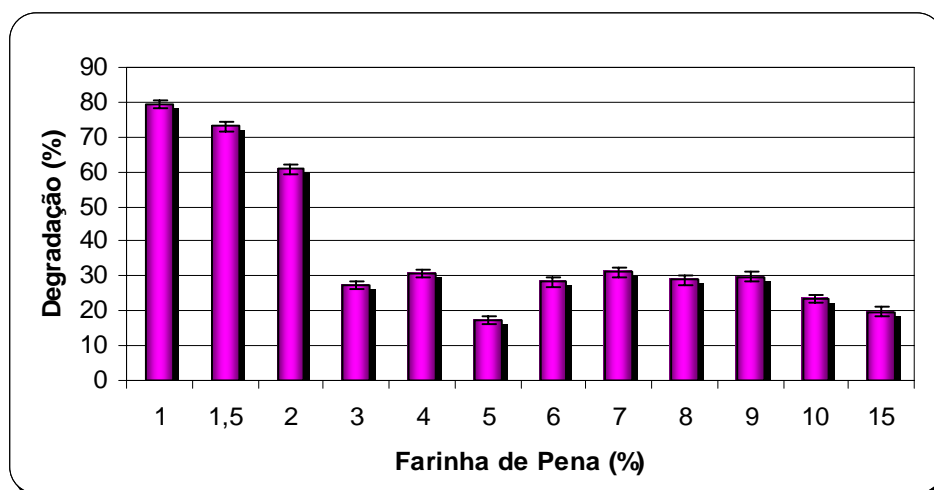


Figura 59: Degradação de farinha de penas durante o cultivo com *B. subtilis* AMR por 6 dias em meio contendo diferentes concentrações do substrato farinha de penas.

No meio de cultura com 2% de farinha de penas, foi observada a maior concentração de proteínas no sobrenadante (figura 60). A concentração de proteínas do meio de fermentação antes da adição do microrganismo também foi medida, através de dosagens, mostrando que há uma grande quantidade de proteínas solúveis no meio. Na concentração de 2% de farinha de penas a diferença entre a quantidade de proteína inicial e final foi de 6,47 mg/ml, seguida pela concentração de 1,5%, com 4,47 mg/ml. Em algumas concentrações de farinha de penas, em especial 10 e 15%, a concentração de proteínas no final da

fermentação foi menor que a do meio de cultura antes de adicionar o inóculo. Em 15% de farinha de penas, o déficit de proteínas solúvel foi de 6,5 mg/ml. Tendo em vista estes resultados, a melhor concentração de farinha de penas para a produção de queratinase e proteínas foi 2%, apesar de degradar 19% menos a farinha de que na concentração de 1% de farinha de penas do meio.

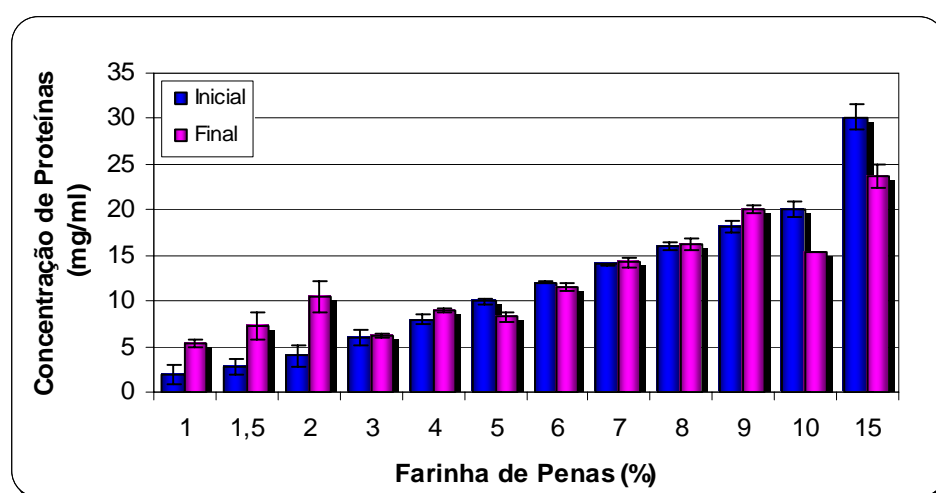


Figura 60: Determinação da concentração de proteínas no sobrenadante de *B. subtilis* AMR durante cultivo por 6 dias em meio contendo diferentes concentrações do substrato farinha de penas.

4.5.3. Efeito de fontes suplementares de carbono na produção de queratinases

As três fontes adicionais de carbono, extrato de levedura e sacarose, que propiciaram o aumento da atividade queratinolítica da amostra *B. subtilis* AMR em penas, e também caldo de cana-de-açúcar, foram adicionadas ao meio de cultura contendo 1% de farinha de penas. Após 6 dias de incubação, o sobrenadante de cultura foi utilizado para análises de atividade queratinolítica e determinação da concentração de proteínas.

Na ausência de sacarose, a atividade queratinolítica foi 16% maior que na presença de sacarose a 0,01%, a fonte suplementar de carbono que menos inibiu a atividade (figura 61). Sacarose 0,05% e caldo de cana 0,01% obtiveram as atividades de $205 \pm 14,14$ U/ml e $171,67 \pm 21,21$ U/ml, respectivamente. Aparentemente a adição de uma fonte suplementar de carbono tem efeito negativo sobre a atividade queratinolítica. O caldo de cana a 0,05% apresentou um desempenho 5,76 vezes menor que o controle (figura 61).

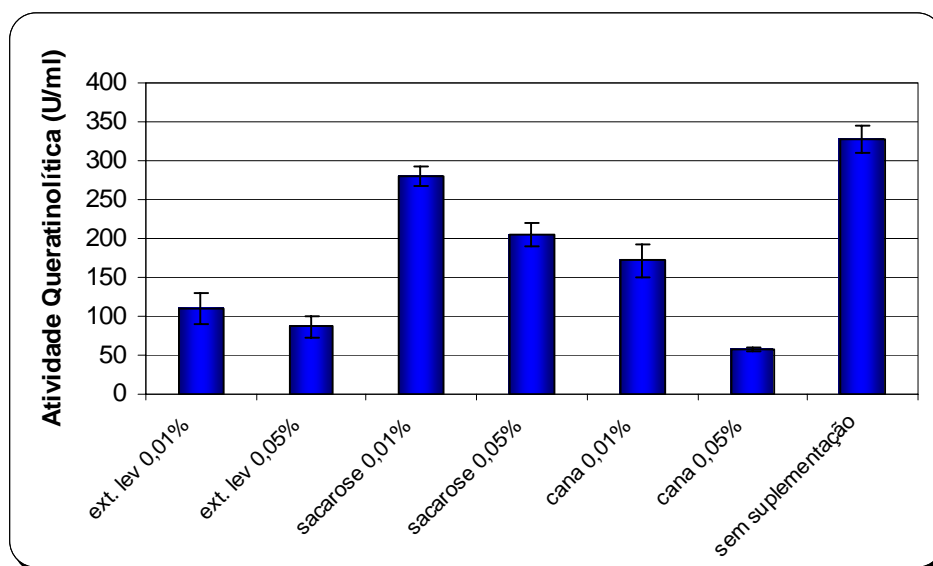


Figura 61: Atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR em meio farinha de penas acrescido de diferentes fonte de carbono adicional.

Entretanto, a determinação da concentração de proteínas do sobrenadante de cultura mostrou que a concentração final de proteínas foi próxima quando a sacarose foi adicionada nas concentrações de 0,01 e 0,05% e caldo de cana adicionado a 0,01% (figura 62), sendo aproximadamente 1,6 vezes maiores que no meio controle. Em todos os meios testados a concentração de proteína final foi maior que a dosagem inicial.

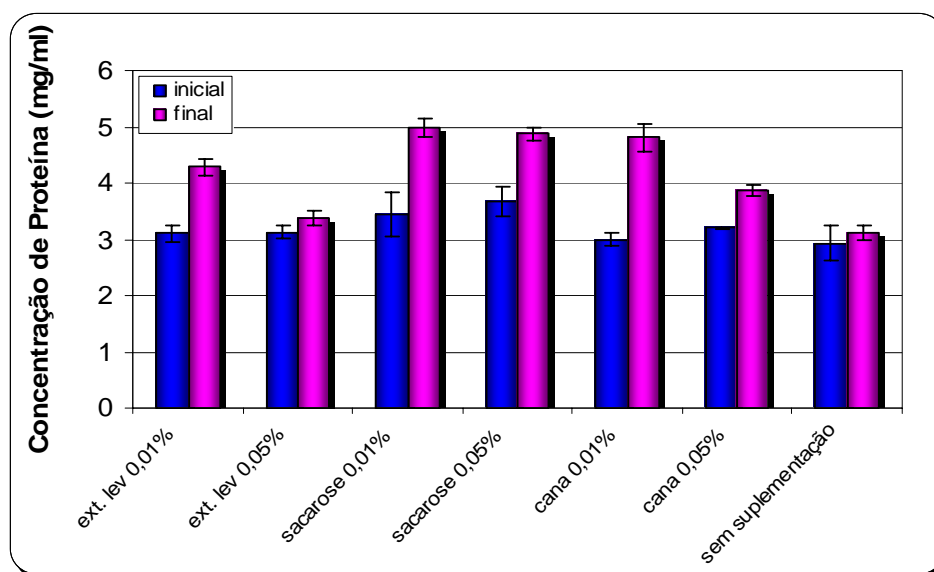


Figura 62: Concentração de proteínas solúveis no sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio farinha de penas acrescido de diferentes fonte de carbono.

Quanto à degradação da farinha de penas pelo microrganismo, os valores encontrados foram próximos, variando de 63,49% (para extrato de levedura 0,05%) a 78,88% , para sacarose 0,01% (gráfico 63).

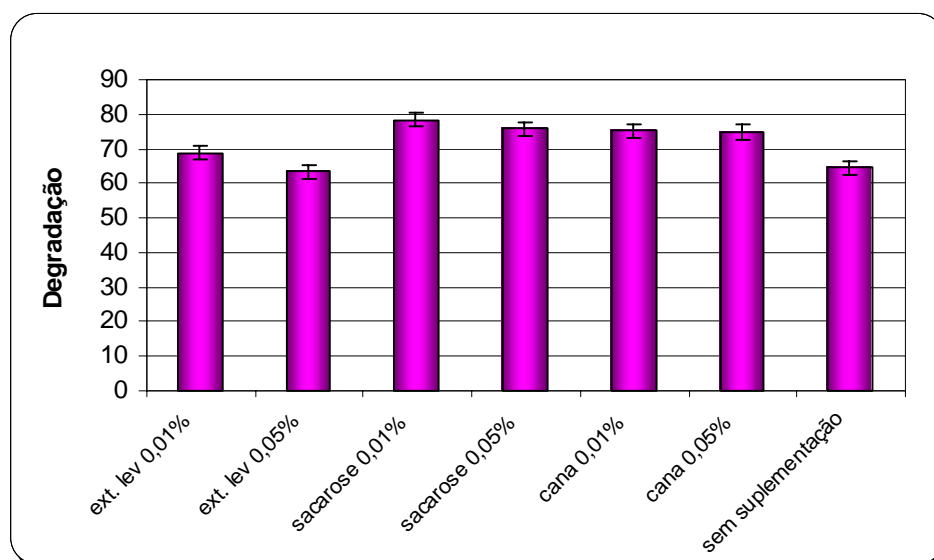


Figura 63: Degradação de farinha de penas do meio de cultura de *B. subtilis* AMR utilizando diferentes fontes de carbono adicional.

Sacarose se mostrou a melhor fonte de carbono suplementar quanto ao aumento na degradação de farinha de penas e na concentração de proteínas no sobrenadante de cultura.

4.5.4. Efeito da concentração de farinha e sacarose na produção de queratinases

Tendo sido averiguado que a adição de sacarose não aumenta a atividade queratinolítica, mas eleva a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura, e que a faixa entre 1-2% de farinha de penas no meio de cultivo é a mais favorável para a atividade queratinolítica, a concentração de sacarose e de farinha de penas foram avaliadas conjuntamente buscando as melhores condições para a produção de queratinases. Diferente dos experimentos anteriores, neste o tempo de incubação de 6 dias foi estendido e o sobrenadante de cultura foi também analisado após 10 dias de incubação, para determinar se o aumento no tempo de incubação aumentaria a concentração de proteínas e a atividade queratinolítica.

A atividade queratinolítica foi maior em 10 dias em quase todas as condições testadas (figura 64). A atividade queratinolítica foi maior quando farinha de penas foi empregada a 2% na ausência de sacarose, confirmando experimentos anteriores, após 10 dias de cultivo ($550,53 \pm 6,21$ U/ml).

Quando o microrganismo foi crescido em 2% de farinha de penas sem fonte adicional de carbono por 10 dias e com sacarose 0,05% por 6 dias, a concentração de proteínas no sobrenadante de cultura foi máxima quando comparadas com as demais condições ($12,54 \pm 1,25$ mg/ml e $13,11 \pm 0,65$ mg/ml, respectivamente). Farinha de penas a 2% apresentou concentração de proteínas mais alta que nas demais concentrações do substrato, e a adição de sacarose não parece ser relevante quanto ao aumento de proteínas no sobrenadante nesta concentração. Entretanto, quando o meio continha 1% de farinha de penas a concentração de proteínas

aumentou com o acréscimo de sacarose, 1,2 e 1,9 vezes, respectivamente, para as concentrações de sacarose de 0,01 e 0,05% em 10 dias de cultivo (figura 65).

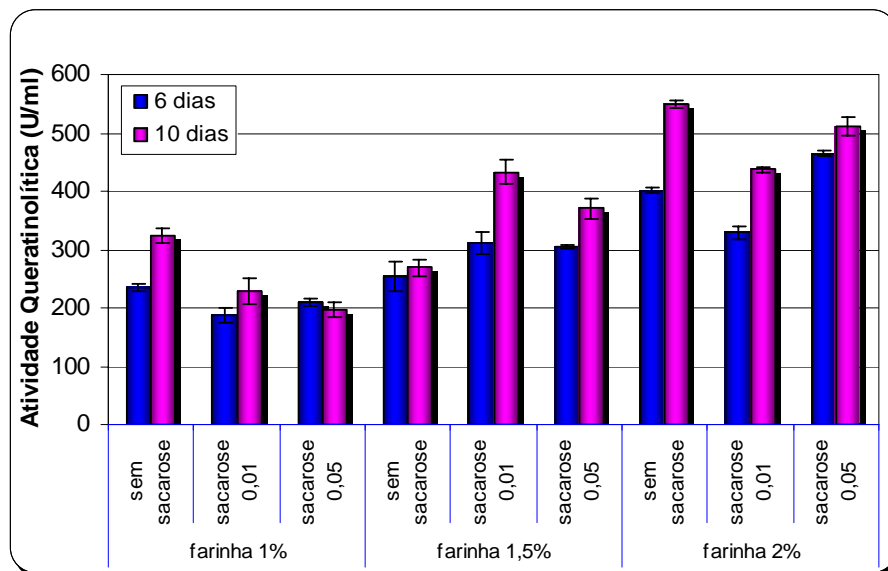


Figura 64: Atividade queratinolítica do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio contendo diferentes concentrações de farinha de penas e sacarose após 6 e 10 dias de incubação.

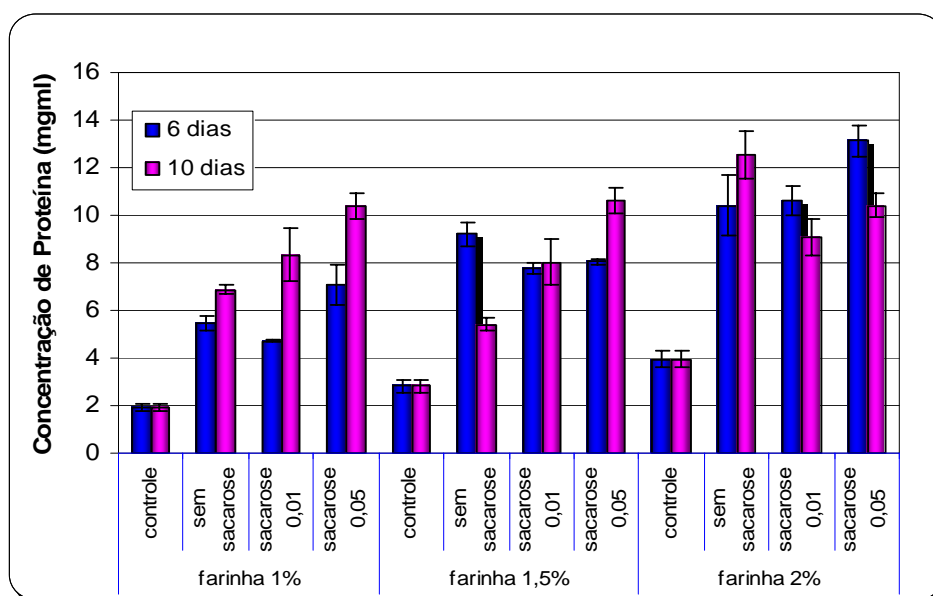


Figura 65: Determinação da concentração de proteínas do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio contendo diferentes concentrações de farinha de penas e sacarose após 6 e 10 dias de cultivo.

A adição de sacarose não aumentou a degradação de farinha de penas quando esta foi utilizada nas concentrações de 1,5 e 2%. Já quando 1% de farinha de penas foi testado, a degradação do substrato diminuiu quando sacarose foi acrescida no meio a 0,01 e 0,05%, mas não significativamente ($p > 0,05$) (figura 66).

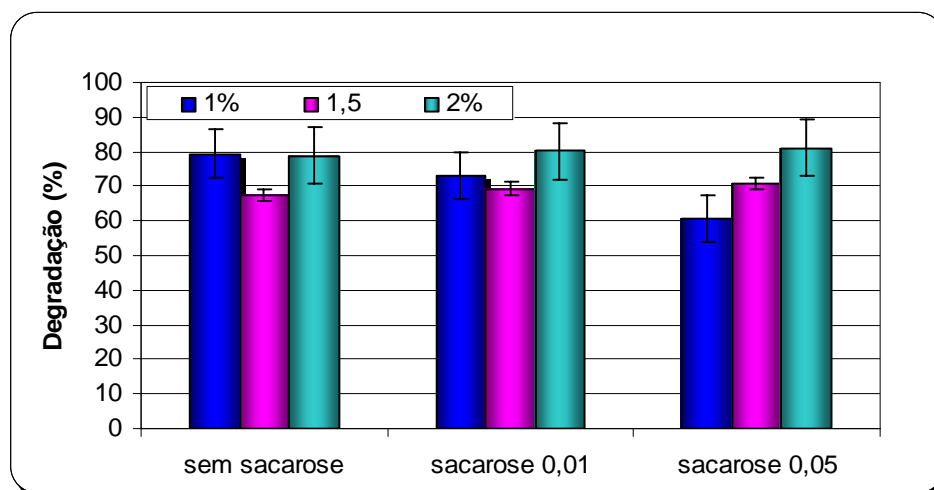


Figura 66: Determinação da degradação de farinha de penas por *B. subtilis* AMR em meio contendo diferentes concentrações de farinha de penas e sacarose.

4.6. Extrusão termoplasmática e caracterização dos produtos obtidos por extrusão

Ao sobrenadante de cultura do microrganismo *B. subtilis* AMR crescido em meio contendo 1% de penas suplementado com 0,01% de extrato de levedura, cultivado por 4 dias, com concentração de proteínas de 3,47mg/ml, foi acrescentado à farinha de milho (a 26%) de forma que o sobrenadante seja o meio líquido da mistura.

Na extrusão foi utilizada uma matriz circular de 3 ou 4 mm e a taxa de alimentação foi de 5 kg/h, aproximadamente. O material extrusado foi coletado depois que o processo atingiu o equilíbrio, acompanhado pela leitura do torque do extrusor. Durante o processo, o expandido foi cortado em tamanho aproximado 2-

5,0 cm de comprimento (figura 67) seguido de desidratação a 75°C até que a umidade final alcançasse 3 a 7%.



Figura 67: Extrusado obtido a partir de farinha de milho e sobrenadante de cultura de *B. subtilis* como meio líquido.

O extrusado foi moído e avaliado quanto à quantidade de cinzas, extrato etéreo, nitrogênio total e umidade. As mesmas análises foram realizadas para a farinha de milho utilizada (controle). A tabela 27 mostra os resultados obtidos pela caracterização química e física do produto de extrusão obtido com o sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR e da farinha de milho, mostrando que exceto pela umidade, o extrusado apresentou valores maiores que a farinha de milho.

Tabela 27: Caracterização físico e química da farinha de milho e do extrusado obtido pela adição do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR à farinha de milho.

	Farinha de milho	Extrusado
Cinzas (g/100g)	0,17 ± 0,02	0,72 ± 0,02
Extrato Etéreo (g/100g)	0,9 ± 0,01	1,42 ± 0,02
N Total (g/100g)	1,08 ± 0	1,19 ± 0
Umidade (g/100g)	12,63 ± 0,14	10,18 ± 0,02

4.7. Degradação enzimática de penas e farinha de penas e determinação da digestibilidade *in vitro*

O extrato enzimático bruto de *B. subtilis* AMR obtido de penas e farinha de penas foi incubado com penas ou farinha de penas como descrito no item 3.14.

Quando as penas, previamente autoclavadas, foram utilizadas como substrato da degradação enzimática, observou-se que não houve diminuição significativa de proteínas ao longo dos 4 dias de reação, com máximo de concentração de proteínas após o quarto dia, quando penas foram utilizadas a 4% (8,416 mg/ml), como mostra a figura 68. Na mistura de reação com penas a 5%, a concentração de proteínas após 24 horas foi de 7,178 mg/ml, um valor duas vezes maior que a concentração de proteínas do extrato enzimático (3,55mg/ml).

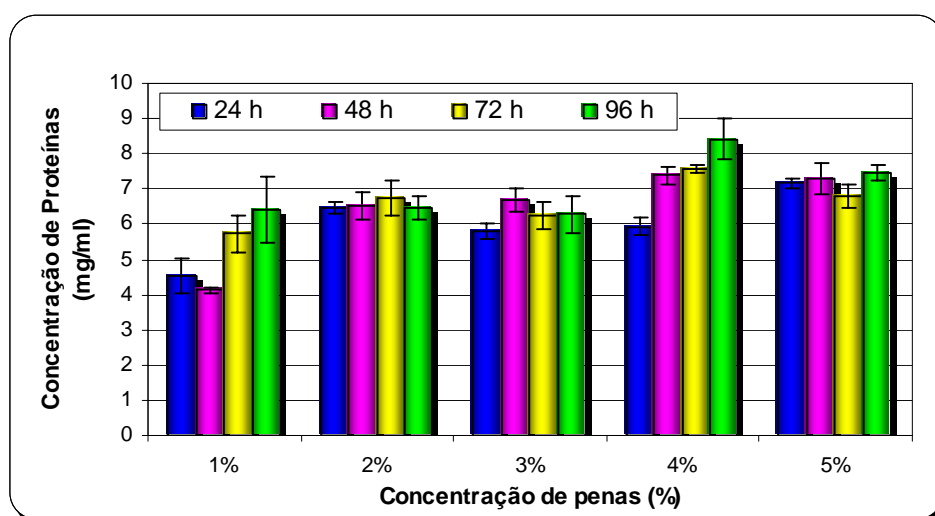


Figura 68: Concentração de proteínas da mistura de reação da degradação enzimática de penas (estéreis).

O mesmo experimento foi conduzido para a avaliar a degradação enzimática de farinha de penas, utilizando como extrato enzimático o sobrenadante de *B. subtilis* AMR cultivado na presença deste substrato.

A dosagem de proteínas do sobrenadante da mistura de reação mostrou que, ao longo dos dias, a concentração de proteínas aumentou (figura 69), com máximo de 16,665 mg/ml no terceiro dia na mistura de reação contendo 5% de farinha de penas e mantendo-se constante, o que poderia indicar a inibição das enzimas (ou parte delas), pelo produto. Nesta concentração de farinha de penas (5%) a concentração inicial de proteínas foi de 3,153mg/ml e logo após 24 horas de degradação, a concentração subiu para 11,232mg/ml. Altas concentrações de proteínas também foram alcançadas após 4 dias de reação, quando foram utilizadas farinha de penas a 3 e 4% (15,735 \pm 0,444 e 15,575 \pm 0,151 mg/ml, respectivamente). Com 1 e 2% de farinha de penas como substrato da reação, o aumento da concentração de proteínas não foi tão evidente (figura 69).

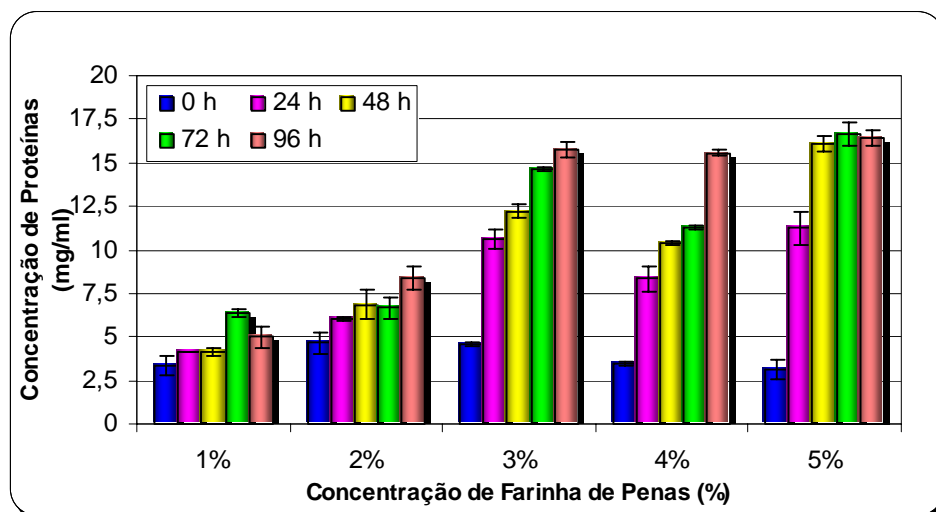


Figura 69: Concentração de proteínas da mistura de reação da degradação enzimática de farinha de penas.

A medida que a concentração de farinha penas aumentou na mistura de reação, a perda de peso da farinha no final do processo foi menor. Na mistura de reação contendo 1% de farinha de penas a perda de peso (rendimento da degradação) foi de 42%, um valor bem alto, considerando que na degradação microbiana degradação fica em torno de 70% (figura 70). Já com penas, a pesagem após 4 dias de incubação mostrou que houve perda de peso de até $13,25 \pm 0,58$ % e $11,96 \pm 2,39$ % (na mistura contendo 4% e 1% de penas, respectivamente). Em todas as concentrações de penas utilizadas na mistura de reação, a perda de peso foi próxima a 11% (figura 70).

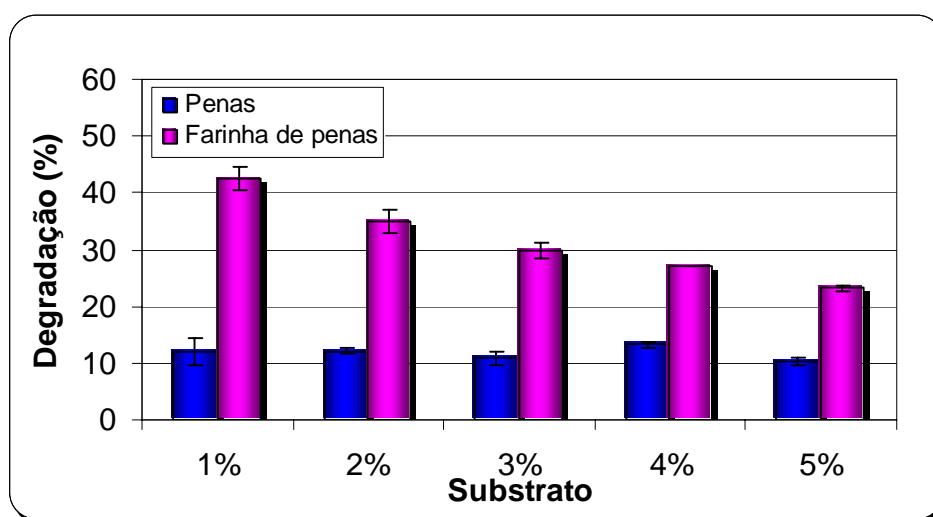


Figura 70: Rendimento da degradação de penas e farinha de penas submetidas à degradação enzimática.

Esperava-se que a digestibilidade (degradação com pepsina e pancreatina) das penas aumentasse, entretanto apenas quando 1% de penas foi utilizada como substrato de reação (0,0421) que a digestibilidade foi um pouco maior que das penas sem qualquer tratamento (controle – 0,0314) (figura 71). Algo parecido ocorreu com farinha de penas. Observou-se que a digestibilidade desta farinha de penas diminuiu ligeiramente (figura 71), não

havendo diferenças significativas entre os valores observados para as diferentes concentrações de farinha de penas utilizadas (figura 71).

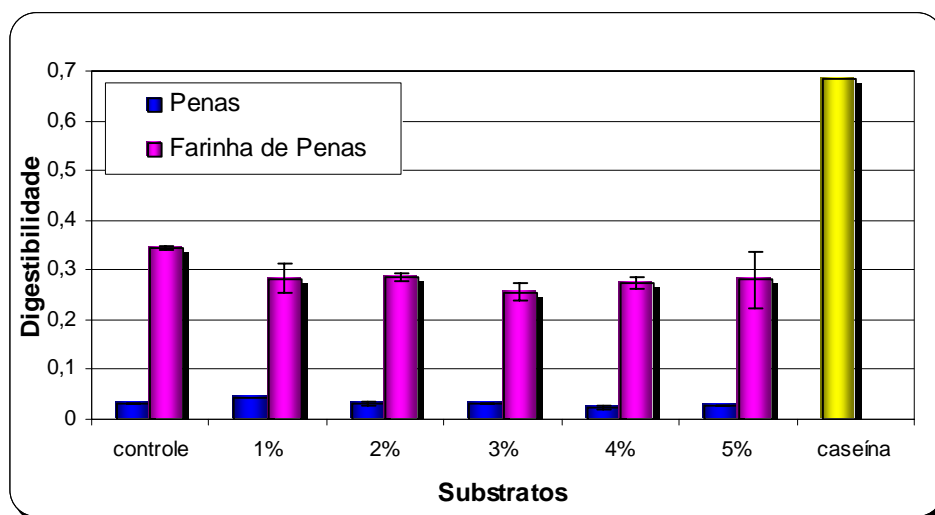


Figura 71: Digestibilidade *in vitro* das penas (estéreis) e farinha de penas submetidas à degradação enzimática.

A degradação enzimática das penas poderia ser realizada para a obtenção de hidrolisados de queratina, mas como o rendimento da degradação das penas é baixo e as penas restantes não se tornaram mais digeríveis, concluiu-se que as queratinases e demais peptidases produzidas pelo *B. subtilis* não são eficientes na degradação de penas e que a presença do microrganismo é necessária para a degradação deste substrato. Entretanto, a digestão enzimática da farinha de penas se mostra promissora para a obtenção de proteínas. A otimização de parâmetros como pH e temperatura, assim como adição de agentes redutores pode aumentar a degradação da farinha.

V. DISCUSSÃO

Peptidases são as enzimas industriais mais importantes, correspondendo a cerca de 50% do total do mercado de enzimas (Hadj-Ali *et al.*, 2007). Estas enzimas ocupam uma posição importante, não só no campo comercial, como também nos processos fisiológicos (Rao *et al.*, 1998). Elas desempenham uma grande variedade de funções, e estão envolvidas na fisiologia das células normais, assim como em condições anormais (patologias), o que as torna alvos potenciais para novas terapias, como por exemplo, no combate a doenças como câncer e AIDS (Rao *et al.*, 1998). Comercialmente, elas têm diversas aplicações em indústrias de detergentes e de alimentos, na indústria farmacêutica, de couro, seda e para recuperação da prata usada em filmes de raio-X (Hadj-Ali *et al.*, 2007).

A demanda industrial de preparações altamente ativas de enzimas proteolíticas com especificidade adequada, estabilidade a amplas faixas de pH e temperatura, íons metálicos, surfactantes e solventes orgânicos, estimula a pesquisa por novas fontes de enzimas e por processos de obtenção com alta produtividade (Hadj-Ali *et al.*, 2007). Estas características são encontradas nas peptidases produzidas por microrganismos como fungos e bactérias, tornando-os as principais fontes de enzimas comerciais, correspondendo a dois terços da produção mundial de peptidases (Gupta, Beg & Lorenz, 2002). Dentre as enzimas proteolíticas microbianas, destacam-se as peptidases alcalinas e neutras, a maioria produzida por membros do gênero *Bacillus*, muito usadas na indústria de detergentes (alcalinas), alimentos e bebidas (neutras). As peptidases alcalinas são responsáveis por 35% das vendas das enzimas microbianas (Rao *et al.*, 1998; Hadj-Ali *et al.*, 2007).

Muitas peptidases do tipo serina peptidases alcalinas de *Bacillus* spp. têm sido caracterizadas e são comercialmente utilizadas, entre elas a Subtilisina Calsberg e a Alcalase de *B. licheniformis* e Subtilisina Novo

produzida por *B. amyloliquefaciens* (estas três produzidas pela Novo Nordisk, Dinamarca), que têm sido empregadas em formulações de detergente e no processamento de seda. A Novozyme 243 (Novo Nordisk, Dinamarca) de *B. licheniformis* é utilizada em pastas de dentes como clareador dental. Outros exemplos incluem a subtilisina de *B. alcalophilus*, comercializada pela Gist-Brocades (Países Baixos), usada na formulação de detergentes, a “Enzeco high alkaline protease - L FG” (Enzyme Development, EUA), de *B. licheniformis*, aplicada na indústria de alimentos e a peptidase denominada comercialmente de “Biopraxe concentrate” (Nagase Biochemicals, Japão), produzida por *B. subtilis* e que é utilizada em cosméticos e fármacos (Gupta, Beg & Lorenz, 2002; Hadj-Ali *et al.*, 2007). A queratinase microbiana Versazyme, obtida de *B. licheniformis* PWD-1, tem sido comercializada para aplicação em rações animais para aumentar a digestibilidade de proteínas. Dados estes exemplos, é fácil compreender por que *Bacillus* spp. são um dos mais importantes grupos de microrganismos industriais (Çalik & Özdamar, 2001).

Bacillus spp. são conhecidos pela produção de diversas outras enzimas extracelulares: α -amilases (Çalik & Özdamar, 2001), uma enzima envolvida na conversão de amido a oligossacarídeos, como a produzida por *B. licheniformis*, com potencial aplicação na liquefação de amido, indústria de papel, alimentícia e farmacêutica (Haq *et al.*, 2003); pectinases, uma enzima que hidrolisa a pectina, um polissacarídeo estrutural heterogêneo de alto peso molecular, como as pectinases produzidas por *Bacillus pumilus* dcsr1 e *Bacillus* sp. DT7 (Kashyap, Soni & Tewari, 2003; Sharma & Satyanarayana, 2006); endoxilanases, como a produzida por *B. pumilus*, que degradam a xilana, o polissacarídeo não-celulolítico mais abundante na madeira (Poorna & Prema, 2003); quitinases, como a expressa por *B. cereus* QQ308, que degrada

quitina e possui ação antimicrobiana, no caso, ação anti-fúngica em patógenos de plantas (Chang, Chen & Jao, 2007); entre outras.

Espécies de *Bacillus subtilis* são amplamente usadas no biocontrole de doenças de plantas, por que eles têm um sistema secretor bem desenvolvido produzindo diversos metabólitos secundários com um grande espectro de atividade antibiótica (Liu *et al.*, 2007). Dentre esses metabólitos, pode-se citar a fengicina e a baccisulina, esta com ação fungicida e produzida pela cepa *B. subtilis* B-916 (Liu *et al.*, 2007). Outra cepa, *B. subtilis* RB14-CS, produz o antibiótico inturina A (um pequeno peptídeo com < 2000 Da), um forte inibidor de patógenos de plantas que pode ser utilizado na diminuição de produtos químicos na agricultura (Mizumoto, Hirai & Shoda, 2007)

B. subtilis também produz um biosurfactante, a surfactina, um lipopeptídeo cíclico composto por um heptapeptídeo e um ácido graxo. Este surfactante tem sido descrito com várias atividades, como anti-micoplasma, anti-viral, anti-fibrinogênico, anti-hipercolesterolêmico, anti-inflamatório e anti-tumoral (Kim *et al.*, 2007). Biosurfactantes também podem ser aplicados em uma série de aplicações em substituição aos surfactantes sintéticos, como os biosurfactantes produzidos por *B. licheniformis* J51, *B. subtilis* 20R e *B. subtilis* R1 (Joshi *et al.*, 2007). É também documentada a produção de bacteriocinas por *Bacillus*. Bacteriocinas são peptídeos com ação antibiótica produzidos por bactérias. Dentre as bacteriocinas de *Bacillus*, pode-se citar a subtilosina A de *B. subtilis* (Shelburne *et al.*, 2007).

A descoberta de novas cepas bacterianas que produzem enzimas com propriedades que podem ter valor industrial é extremamente importante (Tari, Genckal & Tokatli, 2006).

Em nosso laboratório, a pesquisa das queratinases iniciou-se com o isolamento de microrganismos queratinolíticos de resíduos avícolas, como

penas decompostas e restos de farinhas de penas, materiais basicamente compostos por queratina. Observou-se que um grande número dos isolados eram bastonetes Gram-positivos esporulados, características do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos. Oito destes microrganismos foram submetidos a provas bioquímicas e avaliação citomorfológica, confirmando que se tratavam de bactérias do gênero *Bacillus*. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que descrevem um grande número de *Bacillus* spp. com habilidade para degradar penas (Suh & Lee, 2001; Ramnani & Gupta, 2004; Kojima *et al.*, 2007; Park & Son, 2007).

O local de isolamento dos microrganismos queratinolíticos freqüentemente é nos resíduos avícolas, como por exemplo: *Bacillus megaterium* F7-1 (Park & Son, 2007), *B. pseudofirmus* FA30-01 (Kojima *et al.*, 2007), *B. subtilis* KS1 (Suh & Lee, 2001), *Vibrio* sp. kr-2 (Grazziantin *et al.*, 2007), *Chryseobacterium* sp. kr6 (Riffel *et al.*, 2003). Kim, Lim & Suh (2001) isolaram três espécies de *Bacillus* com atividade queratinolítica nestes resíduos, *B. pumilus*, *B. cereus* e *B. subtilis*; assim como neste trabalho, também isolou-se três espécies de *Bacillus*, cinco cepas de *B. subtilis* (AMR, SLC, FP4E, FP4C e PP3), 2 cepas de *B. licheniformis* (ABV e B1) e 1 cepa de *B. cereus* (B2).

Outro lugar bastante importante no isolamento de microrganismos queratinolíticos é o solo. Microrganismos queratinolíticos como *Chryseobacterium indologenes* TKU014 (Wang *et al.*, 2007), *Stenotrophomonas* sp. D-1 (Yamamura *et al.*, 2002a), *Scopulariopsis brevicaulis* (Anbu *et al.*, 2007), *B. pumilus* FH9 (El-Refai *et al.*, 2005) foram isolados do solo.

Outros locais de isolamento incluem a lama da beira de lagos alcalinos, onde foram encontrados *B. pseudofirmus* AL-89 e *Nesterenkonia halobia* AL-

20 (Gessesse *et al.*, 2003); cama de frango, onde os fungos *Alternaria tenuissima*, *Acremonium hyalinulum*, *Curvularia brachyspora* e *Beauveria bassiana* foram identificados (Marcondes *et al.*, 2007); couro de búfalo em abatedouro, onde uma cepa de *B. cereus* foi descrita MCM B-326 (Nilegaonkar *et al.*, 2007) e lixo de abatedouro, córregos geotérmicos e solfataras, onde foram isolados respectivamente *Streptomyces* spp. (Tatineti *et al.*, 2007), *Fervidobacterium islandicum* AW-1 e *Clostridium sporogenes* *bv. pennovorans* *bv. nov.* (Ionata *et al.*, 2006), mostrando que microrganismos queratinolíticos podem ser encontrados em diferentes ambientes sob diferentes condições.

De forma geral, neste trabalho as espécies de *Bacillus* degradaram melhor penas que farinha de penas. Outros microrganismos na literatura foram analisados quanto à hidrólise de diferentes substratos queratinizados: *B. pumilis* F3-4 degradou farinha de penas melhor que penas (97 e 75%, respectivamente), apresentando diferenças de acordo com a origem das penas, se de pato ou galinha (81 e 75%), ocorrendo o inverso com *B. megaterium* F7-1, 86% e 100%, respectivamente (Park & Son, 2007). Em relação a unhas, cabelos e lã, tanto para o *B. pumilis* F3-4 quanto *B. megaterium* F7-1 o rendimento da degradação foi baixo (Son *et al.*, 2007; Park & Son, 2007). Diferenças na hidrólise são, provavelmente, derivadas da composição química e estrutura molecular das queratinas (Son *et al.*, 2007). Alguns microrganismos queratinolíticos são caracterizados por degradar completamente penas, entre eles pode-se citar *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (48h em anaerobiose) (Nam *et al.*, 2002), *B. megaterium* F7-1 (7 dias) (Park & Son, 2007) e *B. pumilus* FH9 (penas previamente picadas em pequenos fragmentos em 48h) (El-Refai *et al.*, 2005). No trabalho, as cepas de *B. subtilis* AMR, FP4E e PP3 apresentaram um rendimento superior a 90% em

7 dias quando cultivadas com penas inteiras, alcançando 100 % durante os experimentos de otimização da produção de queratinases com *B. subtilis* AMR.

Todas as cepas de *Bacillus* estudadas no presente trabalho foram capazes de utilizar penas e produzir queratinases, não só detectáveis em dosagens com substrato queratina, como através de zimografia. Foi realizada a zimografia com gelatina como substrato para avaliação das peptidases gerais produzidas pelos microrganismos e com substrato queratina para avaliação do perfil queratinolítico.

Nos últimos anos, muitos trabalhos analisando queratinases através de zimografia com diversos substratos têm sido publicados. Quando o sobrenadante de cultura de *B. cereus* MCM B-326 (Nilegaonkar *et al.*, 2007) foi analisado por zimografia com substrato caseína, duas bandas de ~45 e 36 kDa foram detectadas, e essas queratinases se mostraram capazes de degradar pêlo de búfalo, mas não o colágeno, o que as torna propícias para atividade na etapa de depilação do couro. Para determinar o número de peptidases produzidas por *B. cereus* quando crescido em meio contendo cabelos, Souza *et al.* (2007) analisaram o sobrenadante de cultura em gel com substrato caseína, e observaram que este microrganismo apresentou apenas uma peptidase; e após purificação, a massa molecular foi determinada como 45,6 kDa, um resultado de acordo com a literatura, que indica que o massa molecular das peptidases de *B. cereus* são geralmente inferiores a 50 kDa (Souza *et al.*, 2007). Entretanto, os dados demonstraram através de zimogramas com gelatina e queratina que *B. cereus* B2 expressa uma enzima de aproximadamente 200kDa, um valor alto se comparado às demais queratinases (tabela 28). Apenas poucas queratinases até o momento foram detectadas

nesta faixa, como por exemplo, a queratinase de 240 kDa produzida por *Kokuria rosea* (Bernal, Cairo & Coello, 2005).

B. pumilus (Kumar *et al.*, 2007) apresentou uma banda de ~65 kDa com substrato gelatina, o mesmo substrato utilizado por Riffel *et al.* (2007). Eles isolaram uma bactéria queratinolítica (*Chryseobacterium* sp. kr6) de resíduos avícolas que apresentou, no sobrenadante de cultura (quando cultivado em meio contendo penas), 4 peptidases com atividade gelatinolítica em gel. Quando purificadas, apenas uma foi detectada com atividade queratinolítica, com massa de 64 KDa, totalmente inibida por 1,10-fenantrolina e com inibição quase total por EDTA e EGTA, classificada como metalopeptidase. Gelatina também foi o substrato empregado para detecção da queratinase de *Fervidobacterium islandicum* AW-1, que quando analisada em condições não desnaturantes apresentou uma zona clara migrando acima de 200 kDa; quando a enzima foi desnaturada e novamente aplicada em gel, duas peptidases foram observadas; uma com peso > 200 kDa e outra com 97kDa, indicando que esta queratinase não é monomérica (Nam *et al.*, 2002). A queratinase de *Streptomyces* sp. (Tatineni *et al.*, 2007), em zimografia com gelatina, apresentou uma banda de ~ 44 kDa. Gelatina parece ser o melhor substrato para visualização de peptidases de microrganismo queratinolíticos.

Substratos alternativos, como a farinha de penas, também foram incorporados à malha de gel de poliacrilamida. A queratinase purificada de *B. pseudofirmus* FA30-01, quando analisada em zimograma com farinha de penas, mostrou uma zona clara migrando a 27,5 kDa (Kojima *et al.*, 2007). Há poucos trabalhos que incorporam queratina em gel, entre eles destaca-se o trabalho de Bernal, Cairo e Coello (2005), onde a queratinase com maior massa molecular, produzida por *Kokuria rosea*, foi descrita.

A tabela 28 mostra algumas peptidases e suas respectivas massas moleculares; como observado, as queratinases descritas até o momento na literatura tem, em geral, massa molecular entre 25 e 65 kDa.

As cepas de *B. subtilis* isoladas produziram múltiplas bandas tanto com substrato gelatina como queratina. Até o momento, nenhum microrganismo queratinolítico foi descrito produzindo mais que três queratinases (tabela 28).

Bacillus subtilis secreta pelo menos oito peptidases extracelulares no final da fase exponencial de crescimento. Duas peptidases principais são produzidas durante o começo da fase de esporulação, a serina-peptidase alcalina subtilisina (AprE), e uma peptidase neutra (NprE). As peptidases secundárias incluem a Epr, bacilopeptidase F (Bpr), metalopetidase (Mpr), peptidase neutra B (NprB) e uma peptidase extracelular associada à parede (WprA). A expressão destas enzimas proteolíticas parece ser fortemente regulada, e acredita-se que sua principal função seria suprir aminoácidos para o crescimento via degradação por enzimas extracelulares (Park *et al.*, 2004). Muitas peptidases produzidas por *B. subtilis* já foram descritas. Em nossos experimentos, as cinco cepas de *B. subtilis* apresentaram no sobrenadante de cultura 7-8 peptidases quando avaliadas por zimograma com substrato gelatina, todas com atividade de serina peptidase.

Tabela 28: Bacilos queratinolíticos, suas queratinases e classificação enzimática

<i>Bacillus</i> spp.	Local de isolamento	Massa molecular (kDa)	Classificação enzimática	Referências
<i>Bacillus subtilis</i> AMR	Resíduo avícola	15, 63, 80 e 100	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus subtilis</i> SLC	Resíduo avícola	10, 30, 54 e 80	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus subtilis</i> FP4E	Resíduo avícola	15, 30, 60, 80 e 100	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus subtilis</i> PP3	Resíduo avícola	15, 30, 60, 80, 100	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus subtilis</i> FP4C	Resíduo avícola	45, 70 e 80	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus licheniformis</i> ABV	Resíduo avícola	60 e 80	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus licheniformis</i> B1	Resíduo avícola	65, 80, 76 e 140	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus cereus</i> B2	Resíduo avícola	200	Serina peptidases	Mazotto <i>et. al.</i> , 2008 *
<i>Bacillus cereus</i>	lã	45,6	Metalopeptidase	Souza <i>et. al.</i> , 2007
<i>Bacillus pumilus</i>	Resíduo líquido de curtume	65	Serina peptidase	Kumar <i>et al.</i> , 2007
<i>B. cereus</i> MCM-326	Couro de búfalo	45 e 36	metalopeptidases	Nilegaonkar <i>et al.</i> , 2007
<i>B. pseudofirmus</i> FA30-01	Resíduo avícola	27,5	Serina peptidase	Kojima <i>et al.</i> , 2007
<i>Chryseobacterium indologenes</i> TKU014	solo	56, 40 e 40	Metalopeptidases	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Resíduo avícola	64	Metalopeptidase	Riffel <i>et al.</i> , 2007
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Córrego aquecido	>200	Serina peptidase	Nam <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium sporogenes</i> bv. <i>Pennovorans</i> bv. nov.	Sedimento sulfatário	28,7	?	Ionata <i>et al.</i> , 2006
<i>Microbacterium</i> sp. kr 10	Resíduo avícola	42	Metalopeptidase	Thys & Brandelli, 2006
<i>B. subtilis</i> KS-1	Resíduo avícola	25,4	Serina peptidase	Suh & Lee, 2001
<i>Streptomyces</i> sp.	Resíduo de abatedouro	~44	Serina peptidase	Tatineni <i>et al.</i> , 2007
<i>Scopulariopsis Brevicaulis</i>	Solo de aviário	36 e 39	Serina peptidases	Anbu <i>et al.</i> , 2005
<i>Lysobacter</i> NCIMB 9497	Coleção de cultura	148	Metalopeptidase	Allpress, Mountain & Gowland, 2002
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sedimento marinho	60	Metalopeptidase	Farag & Hassan, 2004

* Dados não publicados

Quanto à classificação enzimática relacionada ao sítio catalítico das queratinases, foram encontradas em nossas amostras apenas serina peptidases. Estas são as mais frequentemente caracterizadas em microrganismos queratinolíticos, embora metalopeptidases também tenham sido recentemente encontradas (Thys & Brandelli, 2006), como mostra a tabela 28. As queratinases produzidas por *B. cereus* (Souza *et al.*, 2007) e *Microbacterium* spp. kr10 (Thys & Brandelli, 2006) foram inibidas por 1,10-fenantrolina e EDTA, indicando se tratar de metalopeptidases. *B. pumilus* (Kumar *et al.*, 2007) e *Streptomyces* spp. (Tatineni *et al.*, 2007) apresentaram queratinases que foram totalmente inibidas por PMSF (serina peptidase) e parcialmente com EDTA, indicando que as queratinases produzidas por estes microrganismos são serina peptidases que contém íons divalentes atuando na estabilidade da enzima. Resultado semelhante foi observado para as duas peptidases de *B. subtilis* AMR, que migram na faixa de 72,8 e 54,8 kDa nos zimogramas, e também são serina peptidases inibidas por EDTA. O *B. subtilis* PPE teve a sua atividade aumentada na presença deste quelante. Já as enzimas de *B. cereus* MCM B-326 (Nilegaonkar, *et al.*, 2007) e a queratinase de 148 kDa de *Lysobacter* NCIMB 9497 (Allpress, Mountain & Gowland, 2002) tiveram inibição total por EDTA e não foram inibidas por PMSF, indicando que se tratam de metalopeptidases, enquanto a queratinase de *B. subtilis* KS-1 foi inibida apenas por PMSF, como as queratinases de todos os *Bacillus* spp. que foram isolados.

As diferenças encontradas sobre a atividade queratinolítica no gênero *Bacillus* spp. e mesmo entre outras bactérias são provavelmente devido a diferenças nas metodologias, substratos empregados nos zimogramas e também na forma de expressão da atividade enzimática.

Devido a seu grande potencial de aplicação em processos industriais, foi um dos objetivos deste trabalho o desenvolvimento de um meio otimizado para produção das queratinases por *B. subtilis* AMR. Os experimentos se iniciaram com a escolha do melhor meio de propagação do inóculo para avaliar se o meio em que o inóculo é preparado interfere na fermentação com as penas. Observou-se que, independente da presença de penas no meio, não há diferenças significativas durante a fermentação. Entretanto, quando diferentes meios de propagação de inóculo foram testados para *B. subtilis* SLC, observou-se que o desempenho do microrganismo quando propagado em meio contendo 1% de penas foi melhor que nos meios extrato de levedura ou contendo penas moídas (dados não mostrados, Cedrola *et al.*, 2008 manuscrito em preparação). De uma forma geral, os microrganismos queratinolíticos são propagados em meios ricos sem queratina, como caldo nutriente (Ramnani & Gupta, 2004; Allpress, Moutain & Gowland, 2002; Park & Son, 2007; Son *et al.*, 2007) e BHI (Thys & Brandelli, 2006), antes de serem transferidos para os meios de fermentação. Por ser um meio rico, o inóculo necessário pode ser alcançado em um tempo inferior aos meios com penas. Entretanto, alguns autores fazem um pré-inóculo em meio com o mesmo substrato que o meio de fermentação, por exemplo, *Chryseobacterium* spp., que antes de ser inoculado no meio de fermentação contendo 1% de penas, é pré-inoculado em um meio com composição idêntica por 18h (Riffel *et al.*, 2007). A mesma técnica foi empregada para *Bacillus pseudofirmus* AL-89 e *Nesterkonionia* spp. AL-20, com período de pré-incubação de 48h (Gessesse *et al.*, 2003).

A análise das peptidases e queratinases expressas no meio de preparo de inóculo foi realizada para determinar quais peptidases estavam sendo produzidas pelo microrganismo antes da passagem do meio. A zimografia do sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR crescido em meio extrato de

levedura (um meio sem queratina) mostrou a presença de 4 bandas em gelatina (63, 72,8, 77 e 80 KDa). Como o meio contém peptona, não é possível afirmar se ou quais enzimas são de natureza constitutiva. Com o substrato queratina incorporado ao gel, observaram-se duas bandas, de massa próximo a 80 kDa. Como o meio em que o microrganismo foi cultivado não continha qualquer fonte de queratina, há a possibilidade destas duas queratinases serem constitutivas. Poucos microrganismos queratinolíticos também apresentaram atividade queratinolítica, avaliada através de dosagens, quando cultivados na ausência de uma fonte de queratina, entre eles pode-se citar o *B. cereus* MCM B-36, que produz duas enzimas com capacidade depilatória em meio contendo caseína (Nilegaonkar *et al.*, 2007). Entretanto, de forma geral a produção de queratinases é induzida por substratos queratinizados como penas. Quando *B. megaterium* F-7 foi incubado sem penas nenhuma atividade queratinolítica foi detectada (Park & Son 2007), o mesmo ocorrendo para *Chrysosporium georgiae* (El-Naghy *et al.*, 1998).

A otimização é um dos critérios mais importantes no desenvolvimento de processos microbianos (Anbu *et al.*, 2007). Para a indústria é extremamente importante que as formulações dos meios sejam otimizadas de forma a apresentarem a maior produtividade com o menor custo (Tari, Genckal & Tokatli, 2006). Está bem documentado que o substrato e a composição do meio, assim como as condições de operação (pH, temperatura, taxa de transferência de oxigênio, etc), regulam a síntese de peptidases extracelulares por microrganismos (Çalik & Özdamar, 2001; Tari, Genckal & Tokatli, 2006).

Uma das variáveis avaliadas para a cepa AMR foi a influência de uma fonte adicional de carbono sobre a produção das queratinases e hidrolisados de queratina. Foi observado que das seis fontes (glicose, sacarose, milhocina, caseína, gelatina e extrato de levedura) testadas em duas concentrações

diferentes (0,01 e 0,05%), sacarose a 0,05% foi a que mais estimulou a produção de queratinases, seguida por glicose a 0,05%.

A investigação das melhores condições nutricionais para a produção de queratinases por *Bacillus pumilis* F3-4 mostrou que a adição de glicose ao meio com penas (0,2%) estimulou a produção de queratinase (Son *et al.*, 2007), assim como também foi observado no presente trabalho. Esta cepa de *B. pumilis* também teve seu crescimento aumentado 3,4 vezes por este carboidrato; resultado semelhante foi demonstrado pelo *B. subtilis* AMR, que teve sua contagem final de células 6,4 vezes maior quando glicose a 0,05% foi acrescentado. O efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, xarope de glicose, xarope de frutose, maltose, glicose-frutose, amido de milho, amido de tomate, melão e soro de leite) sobre a produção de peptidases alcalinas por *Bacillus* spp. L21, uma bactéria isolada de rejeitos altamente alcalinos de couro, foi avaliada e observou-se que para a cepa L21, a melhor fonte de carbono para produção das peptidases foi glicose-frutose e maltose (Tari, Genckal & Tokatli, 2006).

Em *Bacillus* spp., glicose parece afetar a produção de peptidases positivamente. Çalik & Özdamar (2001) investigaram a influência de diferentes fontes de carbono (glicose, acetato, succinato, malato e citrato) sobre a via metabólica que leva à produção de serina peptidases alcalina e peptidase neutra em *Bacillus*. Eles observaram que a glicose aumentou a produção destas enzimas.

Gessesse *et al.* (2003) isolaram duas bactérias, *Bacillus pseudofirmus* AL-89 e *Nesterkonia* sp. AL-20 e também avaliaram o efeito de fontes adicionais de carbono, verificando que a glicose quase dobrou a produção enzimática para a cepa AL-89; já para a cepa AL-20, a melhor fonte foi peptona, e a glicose causou inibição da atividade. A adição de glicose é

contraditória quanto à indução da produção de queratinases. Para alguns microrganismos ela induz a produção, como para *Chrysosporium georgiae* (El-Naghy *et al.*, 1998) e *B. licheniformis* RG1 (Ramnani & Gupta, 2004), enquanto que para outros reprime, como *Trichophyton simii* (Singh, 1997) e *Malbranchea gypsea* (Singh, 1999).

Há um grande número de estudos conduzindo a otimização de diferentes parâmetros com diferentes microrganismos usando a metodologia de superfície de resposta. Em geral, não há um meio definido para a produção de peptidases, isso porque cada microrganismo é único no requerimento para a máxima produção de enzima. Desta forma cada um deles deve ser considerado separadamente e os requerimentos devem ser otimizados adequadamente (Tari, Genckal & Tokatli, 2006).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é um método estatístico que utiliza dados quantitativos de um desenho experimental adequado para determinar e simultaneamente solucionar equações multivariadas (Montgomery, 2001). Ela é usada para o estudo do efeito de vários fatores influenciando a resposta pela variação dele simultaneamente e requer um número de experimentos limitado. A otimização de componentes pela metodologia clássica que permite a análise de uma variável por vez, além de consumir muito tempo (quando muitas variáveis são avaliadas), dificulta o estudo da interação entre as variáveis testadas (Rodrigues & Iemma, 2005).

Desta forma, foi usada metodologia de análise de superfície para determinar a melhor composição de sais para a produção de queratinase e hidrolisado de queratina por *B. subtilis* AMR, e determinou-se que a melhor produtividade ocorreu quando a mistura dos sais CaCl_2 , MnCl_2 e MgSO_4 na concentração 0,5 mM junto com sacarose 0,05% foi acrescentada ao meio com penas. Sulfato de cobre se mostrou extremamente inibitório para o

crescimento e atividade queratinolítica de *B. subtilis* AMR. A susceptibilidade de microrganismos ao cobre é bem conhecida, e acredita-se que esse metal reage com as proteínas se ligando aos grupos –SH das enzimas, levando à sua inativação (Yoon *et al.*, 2007).

Entre os componentes do meio de cultura, os compostos inorgânicos podem contribuir para a estrutura dos metabólitos e e/ou atuar como co-fatores das enzimas. Conseqüentemente, os íons afetam fortemente a formação de bioprodutos por induzir as vias metabólicas e mudar fluxos metabólicos (Çalik *et al.*, 2004).

B. pumilis F7-3 teve sua produção aumentada pela presença de $MgSO_4$ (Son *et al.*, 2007) e nenhum outro sal foi testado junto a este. Observou-se que no *B. subtilis* AMR, $MgSO_4$ não foi capaz de aumentar a atividade, apenas quando combinado a $CaCl_2$ e $MnCl_2$. *B. cereus* MCM B-326, quando cultivado em meio com diferentes íons metálicos separadamente, mostrou aumento na produção com quase todos os sais testados ($CaCO_3$, que aumentou quase 10 vezes a atividade, $CaCl_2$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $NaCl$) e ligeira inibição por $MnSO_4$ (Nilegaonkar *et al.*, 2007). Çalik *et al.* (2004) avaliaram a produção de uma serina peptidase alcalina de *B. licheniformis* na presença de Mg^{2+} e Mn^{2+} , e observaram que $MnCl_2$ inibiu a produção da enzima a partir da concentração de 0,6mM; dados semelhantes foram observados para cepa AMR, que quando $MnCl_2$ 1mM foi testado separadamente, a atividade diminuiu (de 319,34 caiu para 286 U/ml). Os resultados mostraram que a adição de sais separadamente não favorece a atividade queratinolítica, mas quando os três ($MnCl_2$, $MgSO_4$ e $CaCl_2$) foram colocados juntos no meio de fermentação na concentração de 0,5 mM e 1mM, a produção de queratinases aumentou da mesma forma.

Çalik *et al.* (2004) também observaram que, quando na presença de MgSO_4 , a atividade da peptidase de *B. licheniformis* caiu mais do que com MnCl_2 , mas o crescimento celular aumenta, confirmando mais uma vez nossos dados, nos quais com MgSO_4 a atividade da cepa AMR caiu para 255 U/ml, e a contagem de células de $2,7 \times 10^8$ subiu para $8,3 \times 10^8$ UFC/ml.

A suplementação do meio de fermentação de *B. subtilis* AMR com nitrato de sódio e uréia causou um decréscimo da atividade queratinolítica detectada no sobrenadante de cultura, enquanto a adição de sulfato de amônio e nitrato de potássio aumentou a atividade. Cloreto de amônio causou a inibição da produção de queratinases por *B. pumilis* F3-4 (Son *et al.*, 2007), enquanto que para *B. pumilis* FH-9 o efeito foi oposto (El-Refai *et al.*, 2005). Neste microrganismo, sulfato de amônio e nitrato de prata tiveram efeito inibitório. Fontes de nitrogênio inorgânico muitas vezes diminuem a produção de peptidases, como por exemplo, sulfato de amônio, nitrato de amônio e fosfato de amônio, que reduziram a atividade enzimática de *B. cereus* MCM B-326 (Nilegaonkar *et al.*, 2007). Porém, nitrato de potássio ou nitrato de sódio não alteraram significativamente a atividade nesta cepa, assim como uréia e fontes inorgânicas de nitrogênio não afetaram a produção de queratinases por *B. megaterium* F7-1 (Park & Son, 2007).

Utilizando o delineamento experimental, Ramnani & Gupta (2004) visaram otimizar a produção de queratinases de *B. licheniformis* RGI. Eles concluíram que, dentre os parâmetros avaliados, a cepa RGI teve a máxima atividade alcançada em glicose 1%, peptona 1%, 0,05% de glutatona, e penas a 0,5%. Nestes experimentos eles utilizaram um inóculo de $1,5 \times 10^{14}$ UFC/ml. No presente trabalho, 10^8 UFC/ml de contagem inicial foi o melhor inóculo para a produção de queratinases e hidrolisados de queratina, apesar de com 10^6 UFC/ml a produção de queratinase não ficar significativamente prejudicada.

Inóculos de 10^9 e 10^{10} UFC/ml foram testados experimentalmente (dados não mostrados), e os resultados para este inóculo foram muito próximos ao observado para 10^8 UFC/ml. Para a preparação de 10^{10} UFC/ml de inóculo, uma grande quantidade de meio de propagação de células foi necessária, e desta forma, os resultados deveriam ser muito mais altos para justificar o uso de um inóculo bem mais dispendioso. Quanto ao uso de glutatona no meio de cultura, os autores sugeriram uma possível função em manter os grupos tióis reduzidos no meio. Eles observaram que glicose aumenta a produção da queratinase e esta parece uma constante entre os trabalhos sobre otimização da produção de queratinases de *Bacillus* spp..

A temperatura ótima para a produção de queratinases por *B. subtilis* AMR foi a temperatura ambiente. Embora esta apresente a maior atividade queratinolítica e concentração de proteínas, a degradação de penas foi de 75,28%, quando a concentração de penas foi 1,5% e o inóculo de 10^8 UFC/ml, enquanto que a degradação a 40°C foi de 100% independente da quantidade de inóculo. A produção de queratinases e hidrolisados de queratina por um microrganismo mesofílico pode ser interessante do ponto de vista industrial, uma vez que consome menos energia que microrganismos termofílicos.

Muitos microrganismos queratinolíticos são mesofílicos, com ótimo de temperatura para a produção de queratinases entre 20-37°C; entre eles pode-se citar: *B. megaterium* F7-1 (Park & Son, 2007); *Chryseobacterium* spp. kr6 (Brandelli & Riffel, 2005); *B. cereus* (Kim, Lim & Suh, 2001); *Stenotrophomonas* sp. D-1 (Yamamura *et al.*, 2002a), com a menor temperatura descrita para queratinolíticos (20°C); *B. pumilus* (Kumar *et al.*, 2007). Entretanto, alguns microrganismos queratinolíticos são termofílicos, como *B. subtilis* e *B. pumilus*, que tiveram ótimos de temperatura a 55°C para o crescimento e 40°C para produção (Kim, Lim & Suh, 2001); e

Fervidobacterium islandicum AW-1, que cresceu e produziu queratinases a 70°C (Nam *et al.*, 2002).

Após terem sido determinadas as melhores condições para a produção de queratinases, o microrganismo foi cultivado neste meio melhorado e uma cinética de atividade e de crescimento foi realizada, e observou-se que o crescimento bacteriano não acompanha a produção de queratinases. O máximo de atividade foi alcançada em 168 h, durante a fase estacionária de longa duração. Dados semelhantes foram observados para o fungo *Trichophyton simii* (Singh, 1997) e para *Chryseobacterium* spp. kr6 (Riffel *et al.*, 2003). Entretanto, não é o evento mais comum nas cinéticas de produção e crescimento de microrganismos queratinolíticos.

Quando *B. cereus* (Souza *et al.*, 2007) foi cultivado em meio contendo lã como fonte de carbono e nitrogênio, foi observado um aumento da atividade enzimática acompanhada de um aumento no crescimento. Este não é o único relato de *Bacillus* crescendo sobre α -queratina: *B. pumilus* (Kumar *et al.*, 2007), um microrganismo isolado de curtume com potencial aplicação na depilação de couro, quando teve seu crescimento monitorado junto à atividade queratinolítica, teve um comportamento similar ao do *B. cereus*. O mesmo ocorre com *B. cereus* MCM B-326, quando o máximo de produção enzimática ocorreu no meio da fase log em meio farinha de soja e amido. *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. pumilus* (Kim, Lim & Suh, 2001), assim como *Fervidobacterium islandicum* AW-1 (Nam *et al.*, 2002), tiveram a maior atividade queratinolítica detectada no final da fase de crescimento e começo da fase estacionária.

Quando *B. megaterium* F7-1 foi cultivado em meio contendo 0,1% de penas, a máxima atividade de queratinase ocorreu no quinto, coincidindo com o final da fase de crescimento (Park & Son 2007), enquanto que para *B. subtilis* AMR, o final desta fase foi em 48 horas (entre o quarto a quinto dia),

mas não coincidiu com a maior atividade queratinolítica observada (em 168 horas). Esta ocorreu durante a fase estacionária de longa duração.

Estudos recentes têm demonstrado que o crescimento bacteriano tem cinco fases (Finkel, 2006): a fase lag, a fase log ou de crescimento exponencial, a fase estacionária, a fase de morte e a fase estacionária de longa duração. A fase estacionária de longa duração parece começar após 80 h de incubação para *B. subtilis* AMR, e foi durante esta fase que foi observado a maior atividade queratinolítica, gelatinolítica e concentração de proteínas no sobrenadante de cultura. Esta é uma fase dinâmica na qual as taxas de “nascimento” e “morte” estão equilibradas. Culturas de longa duração têm a capacidade de suportar um certo número de células, assim, se novas células surgem, outras devem morrer (Finkel, 2006). Foi observado que a fase estacionária de longa duração pode se estender por meses e até anos (Finkel, 2006).

Já a atividade gelatinolítica de *B. subtilis* AMR pode estar relacionada com a esporulação. A regulação da síntese de peptidases tem sido extensivamente estudada em *B. subtilis* e tem sido mostrado que a biosíntese de serina peptidases alcalinas e peptidases neutras são dependentes da indução da esporulação e da concentração das fontes de carbono e nitrogênio. A esporulação em *B. subtilis* é iniciada quando uma diminuição no nucleotídeo guanina e subsequente ativação do produto do gene *spoOA*, que por sua vez inibi a síntese do produto do gene *abrB*. (Çalik & Özdamar, 2001). O produto deste gene reprime a síntese de peptidases durante a fase exponencial de crescimento, mas um decréscimo na guanosina trifosfato não é o suficiente para estimular a produção de peptidases na presença de altas concentrações de fontes de carbono e nitrogênio. O sinal da via transducional, que informa à célula sobre o status nutricional e, assim, influencia a produção de

exoproteínas, é definida por pelo menos 4 genes denominados *degS*, *degU*, *degR* e *degQ*. Outros genes regulatórios que também foram investigados por estarem envolvidos na síntese de serina peptidases alcalinas são: *sensS*, *sin*, *hpr* e *pai*. Como mencionado, a síntese de peptidases é complexa, respondendo a muitos estímulos ambientais, que são controlados por muitos produtos de genes (Çalik & Özdamar, 2001).

Em relação ao melhor pH, foi determinado que o pH 8,0 foi o melhor para produção de queratinases e em meio penas por *B. subtilis* AMR. Já quando o substrato utilizado foi farinha de penas, o melhor pH foi 7,0. A maioria dos microrganismos queratinolíticos usa penas como substrato no meio de cultura e possui ótimo de produção da enzima em meio neutro a alcalino, como por exemplo: *B. megaterium* F7-1 (pH 7,0 a 11,0) cultivado em meio contendo penas (Park & Son 2007), *B. pumilus* e *B. pumilus* FH9 (pH 8,0) usando pêlo bovino como substrato e penas, respectivamente (El-Refai *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007), *B. cereus* MCM B-326 e *Bacillus* sp. FK 46 (pH 9,0) em meio contendo amido e farinha de soja e penas (Nilegaonkar *et al.*, 2007; Suntornsuk & Suntornsuk, 2003); *B. cereus* e *B. subtilis* (7,0), sendo este último bastante resistente a diferentes valores de pH, uma vez que sua atividade se manteve alta numa faixa de pH 5 a 9 (Kim, Lim & Suh, 2001). Já o *B. pumilus* apresentou melhor atividade nos valores de pH 5 e 6 (Kim, Lim & Suh, 2001).

A produção de queratinases parece ser dependente da concentração de substrato do meio. Quando crescido em meio contendo penas, a melhor atividade foi detectada quando as penas foram utilizadas a 1,5%, resultado semelhante ao encontrado para *B. pumilus* FH-9 (El-Refai *et al.*, 2005). Quando crescido em meio farinha de penas a concentração ótima foi de 2%, enquanto que para *Microbacterium* spp. kr10 a melhor concentração de

farinha de penas foi 1,25%. A produção de queratinases por *B. megaterium* F7-1 também foi afetada pela concentração de penas, subindo até a concentração de 1,6%, seguida de queda com 1,8% (Park & Son, 2007). *P. pumilus* FH-9 também teve queda na atividade com 2% de penas no meio de cultura (El-Refai *et al.*, 2005), resultados semelhantes foram observados por Suntornsuk & Suntornsuk (2003), que afirmaram que altas concentrações de penas (3 e 5%) podem causar inibição ou repressão pelo substrato. Park & Son (2007) acreditam que altas concentrações de penas possam prejudicar a oxigenação do meio e assim o crescimento da bactéria.

A produção de farinha de penas é uma realidade para muitas empresas e devido a isto o uso deste produto como substrato para o crescimento da cepa AMR foi avaliado. A digestão da farinha de penas por microrganismos pode disponibilizar os aminoácidos da farinha, melhorando seu valor nutricional (Tatineni *et al.*, 2007). Quando o microrganismo foi crescido neste substrato, foi observado que a adição de sacarose leva à diminuição na atividade queratinolítica, entretanto, eleva a concentração de proteínas. Este aumento na concentração de proteínas pode ser justificado por uma maior produção de proteínas pela própria bactéria e por peptidases menos específicas que as queratinases estarem degradando a farinha de penas, lembrando que na farinha de penas, a queratina está degradada e/ou modificada pelo aquecimento sob pressão ao qual foi submetida.

Pena é o substrato para crescimento e produção de queratinases mais empregados na literatura, entretanto, alguns trabalhos adotaram a farinha de penas como substratos. De Azeredo *et al.* (2006) cultivou o actinomiceto *Streptomyces* spp. 594 em meio contendo 1% de farinha de penas em fermentação em estado líquido e em fermentação semi-sólida, e constatou que este substrato estimula a produção de peptidases pelo microrganismo.

Microbacterium sp. kr 10 (Thys & Brandelli, 2006) também foi cultivado em farinha de penas.

A principal característica das penas é o alto grau de pontes dissulfeto, que confere à queratina resistência à digestão enzimática (Son *et al.*, 2007). Como apontado na introdução desta tese, há dois mecanismos, até o momento, descritos para a hidrólise de queratina pelos microrganismos, e em ambos a presença do microrganismo parece importante na degradação deste substrato, ou produzindo sulfeto, ou fornecendo um potencial de oxi-redução para enzimas como a dissulfeto redutase. Em todo caso, a redução das pontes dissulfeto parece desempenhar um papel chave na degradação. Observou-se que a hidrólise da pena não é alcançada com sucesso na ausência do microrganismo, pois o sobrenadante de cultura contendo as enzimas não foi suficiente para alcançar mais que 13% de degradação das penas, talvez por que o potencial redutor do sobrenadante de cultura tenha sido esgotado, ou as enzimas inibidas pelo produto da hidrólise. Afirmações sobre o mecanismo de hidrólise da queratina pelo *B. subtilis* AMR ainda são precipitadas. Na literatura tem sido reportada a presença de grupos sulfidril no sobrenadante de bactérias queratinolíticas, entre elas membros do gênero *Bacillus*, como *B. pumilis* F3-4 (Son *et al.* 2007) e *B. pumilus* (Kumar *et al.*, 2007), sugerindo que estes microrganismos reduzem pontes dissulfeto através do processo de sulfitolise. Grupos sulfidril também foram detectados no sobrenadante de cultura de *Fervidobacterium islandicum* AW-1; sua concentração foi monitorada e observou-se que houve aumento na detecção destes grupos, acompanhando o crescimento do microrganismo. Quando a enzima desta bactéria foi incubada com queratina na presença de DTT, um agente redutor, a atividade queratinolítica foi alta, enquanto que sem DTT não foi detectada atividade. As enzimas de *F. islandicum* AW-1 incubada com penas

autoclavadas, na presença de DTT, degradaram as penas com mais rapidez do que durante o cultivo do microrganismo com as penas, sugerindo que a redução das pontes dissulfeto é importante.

Penas autoclavadas (na concentração de 0,1%) também foram tratadas com o sobrenadante de cultura de *B. megaterium* F7-1 (Park & Son, 2007) por até 36 h a 30°C e 200 rpm. Park & Son (2007) conseguiram 24% de degradação, aparentemente um resultado maior que o observado para o extrato enzimático de AMR (13%), porém a concentração de penas utilizada neste experimento foi 10 vezes maior que a usada para *B. megaterium* F7-1. Após o máximo de degradação alcançada em 24h, a degradação se manteve estável quando 5% de penas foi utilizada no meio de reação. A adição de mercaptoacetato à mistura de reação da queratinase de *Microbacterium* spp. kr 10 com penas moídas aumentou a concentração de proteínas na mistura, indicando que facilitou a hidrólise da queratina das penas pela queratinase. A atividade queratinolítica de *B. subtilis* KS-1 também aumentou (1,6 vezes) na presença de DTT (Suh & Lee, 2001). Entretanto, quando a degradação enzimática utilizando extrato enzimático da cepa AMR foi realizada com farinha de penas a 1%, houve 42% de degradação de farinha de penas sem qualquer acréscimo de agente redutor.

Os resultados obtidos com os experimentos de digestão enzimática, empregando farinha de penas, demonstraram que a mesma pode ser utilizada se o objetivo for a obtenção de proteínas solúveis, entretanto, o substrato excedente no final do processo não pode ser aproveitado em rações uma vez que a digestibilidade continua muito baixa.

Os dados apresentados neste trabalho mostraram a utilização de um subproduto (penas) através de fermentação microbiana e o melhoramento da produtividade enzimática e de hidrólise de queratina. Também mostrou-se que

produtos de baixa digestibilidade como farinha de penas podem ser submetidos à hidrólise microbiana para aumento da qualidade do produto, com obtenção de hidrolisados protéicos. O objetivo principal foi melhorar a produção das queratinases e da concentração das proteínas, o que foi alcançado com sucesso, em especial com relação à obtenção de proteínas solúveis a partir de penas, que antes dos experimentos era de aproximadamente 4mg/ml e após os melhoramentos no meio de fermentação alcançou 12mg/ml. Esta proteína solúvel pode ser aplicada em ração, e é passível de incorporação em alimentos extrusados. O hidrolisado também encontra aplicação em cosméticos. Em meio contendo penas foi detectada uma grande expressão de peptidases, que podem ser usadas na indústria de alimentos, detergente, têxtil e couro e são obtidas em um meio muito barato, além de combater um problema ambiental gerado pela atividade avícola, tão explorada no Brasil.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados concluímos que:

- Dentre os isolados de *Bacillus* queratinolíticos estudados, as cepas AMR, FP4E e PPE apresentaram alta atividade queratinolítica, mas AMR apresentou maior concentração de proteínas no sobrenadante de cultura.

- As peptidases e queratinases detectadas em zimogramas das cepas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus* são todas serina peptidases.

- O meio de propagação de inóculo não influenciou a fermentação por *B. subtilis* AMR e em meio extrato de levedura o microrganismo produziu duas queratinases.

- A melhor fonte adicional de carbono para a produção de queratinases e proteínas em meio contendo penas como principal fonte de carbono é a sacarose 0,05%.

- Em meio contendo 1% de penas e 0,01% de extrato de levedura, o acréscimo de qualquer concentração de CuSO_4 afeta negativamente a atividade queratinolítica, bem como a concentração final de proteínas, a degradação de penas e o crescimento. FeSO_4 não apresentou vantagens que justifiquem seu acréscimo no meio. Independente da fonte adicional de carbono no meio de cultura, a adição de MgSO_4 , MnCl_2 e CaCl_2 , nas concentrações de 0,5 e 1mM aumentou a atividade queratinolítica. Sulfato de zinco também estimulou a produção de queratinases, mas não como MgSO_4 , MnCl_2 e CaCl_2 , e quando testados os quatro sais juntos, a atividade queratinolítica, concentração final de proteínas e rendimento da degradação de penas do sobrenadante de cultura caiu ligeiramente.

- A melhor concentração de penas no meio de fermentação é 1,5%, com inóculo de 10^6 - 10^8 UFC/ml, e a melhor temperatura de condução do processo foi a temperatura ambiente. O microrganismo também produziu alta atividade queratinolítica em temperaturas até 40°C

- A produção de queratinases e proteínas por *B. subtilis* AMR não requer uma fonte de nitrogênio inorgânico.

- Os máximos de atividade queratinolítica, gelatinolítica e concentração de proteínas no sobrenadante de cultura foram alcançados entre seis e sete dias, durante a fase estacionária de longa duração.

- O melhor pH para a produção de queratinases e proteínas em meio contendo farinha de penas foi pH 7,0.

- A melhor concentração de farinha de penas para a produção de queratinases e proteínas é 2%.

- A produção de queratinases e proteínas por *B. subtilis* AMR em meio contendo farinha de penas não requer suplementação com outra fonte de carbono.

- O sobrenadante de cultura de *B. subtilis* AMR em meio contendo penas ou farinha de penas pode servir de meio líquido para a produção de alimentos extrusados.

- A degradação enzimática das penas com extrato enzimático bruto de *B. subtilis* AMR não é tão eficiente quando a degradação obtida pelo microrganismo e não aumenta consideravelmente a digestibilidade. Entretanto, a digestão enzimática da farinha de penas se mostra promissora para a obtenção de proteínas. A otimização de parâmetros com pH e temperatura, assim como adição de agentes redutores, pode aumentar a degradação da farinha enzimaticamente.

***VII. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

AACC. **American Association of Cereal Chemistry**. Approved methods of AACC. 9.ed. St. Paul: AACC, 1995.

ALIBARDI, L., SAWYER, R. H. **Cell structure of developing downfeathers in the zebra finch with emphasis on barb ridge morphogenesis**. Journal Anatomical Society, 208, 621–642, 2006.

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

ANBU, P., GOPINATH, S. C. B., HILDA, A., LAKSHMIPRIYA, T. & ANNADURAI. **Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity**. Enzyme and Microbial Technology, 36, 639-347, 2005.

ANBU, P., GOPINATH, S. C. B., HILDA, A., LAKSHMIPRIYA, T. & ANNADURAI. **Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis***. Bioresource Technology, 98, 1298-1303, 2007.

AOAC. **Official methods of analysis**. 17.ed. Gaithersburg: AOAC, International, 2000.

APPLE, J. K., BOGER, C. B., BROWN, D. C., MAXWELL, C. V., FRIESEN, K. G., ROBERTS, W. J. & JOHNSON, Z. B. **Effect of feather meal on live animal performance and carcass quality and composition of growing-finishing swine**. J. Anim. Sci, 81, 172-181, 2003.

ARAÚJO, L. F., JUNQUEIRA, O. M., ARAÚJO, C. S. S., ARTONI, S. M. B. & FARIA FILHO, D. E. **Diferentes Critérios de Formulação de Rações para Frangos de Corte no Período de 1 a 21 Dias de Idade**. Revista Brasileira de Ciência Avícola, 4 (3), 195-202, 2002.

BELLAVER, C. **Ingredientes de origem animal destinadas a fabricação de rações**. Simpósio sobre Ingredientes na Alimentação animal, 1-23, 2001

BERNAL, C., CAIRÓ, J. & COELLO, N. **Purification and characterization of a novel exocellular keratinase form *Kocuria rosea***. Enzyme and Microbial Technology, 38 (3), 49-54, 2005.

BÖCKLE, B., GALUNSKY, B., MULLER, R. **Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530**. Applied and Environmental Microbiology, 61, 3705-3710, 1995.

BON, E. P. & VERMELHO, A. B. **Queratinases. Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** 1ªed. Editado por Legis Summa, Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

BRANDELLI, A. & RIFFEL, A. **Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers.** Electronic Journal of Biotechnology, ISSN: 0717-3458, 2005.

BRESSOLIER, P., LETOUNEAU, F., URDACI & VERNEUIL, B. **Purification and characterization of Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*.** Applied and Environmental Microbiology, 65,2570-2576, 1999.

BROUTA, F., DESCAMPS, F., MONOD, M., VERMOUT, S., LOSSON, B. & MIGNON, B. **Secreted metalloendopeptidase gene family of *Microsporum canis*.** Infection and Immunity, 70, 5676-83, 2002.

BRUMANO, G., GOMES P. C., ROSTAGNO, H. S., ALBINO L. F. T, SCHMIDT, M. & GENEROSO, R. A. R. **Aminoácidos digestíveis verdadeiros de alimentos protéicos determinados em galos cecectomizados.** Revista Brasileira de Zootecnia., 35 (6), 2290-2296, 2006.

BRUSH, A. H. **On the origin of feather.** Journal of Evolutionary Biology, 9, 131-142, 1996.

BURTT, E. H. & ICHIDA, J. M. **Keratinase produced by *Bacillus licheniformis*.** United States Patent, 5,877,000, 1999.

ÇALIK, P. & ÖZDAMAR, T. **Carbon source affect metabolic capacities of *Bacillus* species for production of industrial enzymes: theoretical analyses for serine and neutral proteases and α -amylase.** Biochemical Engineering Journal, 8, 61-81, 2001.

ÇALIK, P., BILIR, E., ÖZÇELİK, İ.Ş., ÇALIK, G. & ÖZDAMAR, T. **Inorganic compounds have dual effect on recombinant protein production: influence of anions and cations on serine alkaline protease production.** Journal of Applied Microbiology, 96, 194-200, 2004.

CHANG, W., CHEN, Y. & JAO, C. **Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes.** Bioresource Technology, 98, 1224-1230, 2007.

CHIBA, L. I, IVEY, H. W., CUMMINS, K. A. & GAMBLE, B. E. **Hydrolyzed feather meal as a source of amino acids for finisher pigs.** Animal Feed Science Technology, 57, 5-24, 1996.

- CHITTE, R. R., NALWADE, V. K. & DEY, S. **Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD 8.** Letters in Applied Microbiology, 28 (2), 131-136, 1999.
- CUNNINGHAM, K. D., CECAVA, M. J. & JOHNSON, T. R. **Flows of Nitrogen and Amino Acids in Dairy Cows Fed Diets Containing Supplemental Feather Meal and Blood Meal.** Journal of Dairy Science., 77, 3666-3675, 1994.
- D'AGOSTINI, P., GOMES, P. C., ALBINO, L. F. T., ROSTAGNO, H. S. & SÁ, L. M. **Valores de Composição Química e Energética de Alguns Alimentos para Aves.** Revista Brasileira Zootecnia, 33 (1), 128-134, 2004.
- DALEV, P. G. **Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate.** Bioresource Technology, 48, 265-267, 1994
- DALEV, P., IVANOV, I. & LIUBOMIROVA. **Enzymatic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value.** Journal of Science Food Agricultural, 73, 242-244, 1997.
- DALEV, P. **Utilization of biodegradable keratin and collagen-containing wastes through enzymatic treatment.** Wolfsburg. Orbiti Association, 2000.
- DAYANANDAN, A., KANAGARAJ, J., SOUNDERRAJ, L., GONINDARAJU, R. & RAIJKUMAR, G. S. **Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach.** Journal of Cleaner Production, 11, 533-536, 2003.
- DE AZEREDO, L. A. I., DE LIMA, M. B., COELHO, R. R. R. & FREIRE, D. M. G. **A Low-Cost Fermentation Medium for Thermophilic Protease Production by *Streptomyces* sp. 594 Using Feather Meal and Corn Steep Liquor.** Current Microbiology, 53, 335-339, 2006.
- DE TONI, C. H., RICHTER, M. F., CHAGAS, J. R., HENRIQUES, J. A., TERMIGNONI, C. **Purification and characterization of an alkaliphilic serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanhomona maltophilia* strain.** Canadian Journal of Microbiology, 48 (4), 342-348, 2002.
- EL-NAGHY, M. A., EL-KTATNY, M. S., FADI-ALLAH, E. M. & NACER, W. W. **Degradation of chicken feathers by *Chrysosporium georgiae*.** Mycopathologia, 14 (2), 77-84, 1998.
- EL-REFAI, H. A., ABDELNABY, M. A., GABALLA, A., EL-ARABY, M. H. & ABDEL FATTAH, A. F. **Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity.** Process Biochemistry, 40, 2325-2332, 2005.

- EVANS, K. L., CROWDER, J. & MILLER E. S. **Subtilisins of *Bacillus* ssp. Hydrolyse keratin and allow growth on feathers.** Canadian Journal of Microbiology, 46, 1004-4011, 2000.
- FARAG, A. M. & HASSAN, A. H. **Production, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*.** Enzyme and Microbiol Technology, 34, 85-93, 2004.
- FINKEL, S. E. **Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype.** Nature Reviews/ Microbiology, 4, 113-120, 2006.
- FRASER, R. D. B., MACRAE, T. P. & ROGER, G. **Keratin: their composition, structure and biosynthesis.** Edited by Thomas, C.C., Springfield., Illinois, EUA, 1972.
- FRASER, R. D. B. & PARRY, D. A. D. **The molecular structure of reptilian keratin.** International Journal of Biological Macromolecules, 19, 207-211, 1996.
- FRIEDRICH, A. B. & ANTRANIKIAN, G. **Keratin degradation by *Fervidobacterium pennovarans*, a novel thermophilic anaerobic specie of the order *Thermotogales*.** Applied and Environmental Microbiology, 75, 2878-2883, 1996.
- FRIEDRICH, J. & KERN, S. **Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microspor*.** Journal of molecular Catalysis, 21, 35-37, 2003.
- GARCIA, C. E. R., YOUSSEF, E. Y., VECCHIA, F. D., PINHEIRO, J. W. & SHIMOKOMAKI, M. **Aggregando valor a avicultura de postura.** Anuário 2002 da Avicultura Industrial. Edição 1096, São Paulo, Brasil, 2003.
- GESSESSE, A., HATTI-KAUL, R., GASHE, B. A., MATIASSON, B. **Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather.** Enzyme and Microbial technology, 32, 519-524, 2003.
- GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos.** 5^o ed. Editado por Interamericana Rio de Janeiro, Brasil, 1981.
- GRADIŠAR, H., KERN, S. FRIEDRISH, J. **Keratinase of *Doratomyces microspor*.** Applied Microbiology Biotechnology, 53, 196-200, 2000.
- GRAZZIONTI, A., PIMENTEL, F. A., SANGALI, S., JONG, E.V., BRADELLI, A. **Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2.** Bioresource Technology, 98, 3172-3175, 2007.
- GRYWNOWICZ, G., LOBARZEWSKI, J., WAWRZKIEWICZ, K. & WOLSKI, T. **Comparative characterization of proteolytic enzymes from *Trichophyton gallinae* and**

Trychophyton verrucosum. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 27, 319-328, 1989.

GUPTA, R., BEG, Q. K. & LORENZ, P. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications**. Applied Microbiology Biotechnology, 59, 15-32, 2002.

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

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

HADJ-ALI, N. EL, AGREBI, R., GHORBEL-FRIKHA, B., SELLAMI-KAMOUN, A., KANOUN, S. & NASRI, M. **Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1**. Enzyme and Microbial Technology, 40, 515-523, 2007.

HAQ, I., ASHRAF, H., IQBAL, J. & QADEER, M. A. **Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium**. Bioresource Technology, 87, 57-61, 2003.

HARRAP, B. S. & WOODS, E. F. **Soluble derivatives of feather keratin**. Biochemical Journal, 92, 8-18, 1964.

HARRAP, B. S. & WOODS, E. F. **Species differences in the proteins of feather**. Comparative Biochemistry and Physiology 20, 449-460, 1967

HATTORI, M., YOSHIURA, K., NEGI, M. & OGAWA, H. **Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans***. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 22, 175-183, 1984.

HEUSSEN, C. & DOWDLE, E. B. **Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates**. Analytical Biochemistry, 102, 196-202, 1980.

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, 47, 199-208, 2001.

IGNATOVA, I., GOUSTEROVA, G., SPASSOV, G. & NEDKOV, P. **Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool thermophilic**

actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. Canadian Journal of Microbiology, 45, 217-222, 1999.

IONATA, E., CANGANELLA, F., BIANCONI, G., BENNO, Y., SAKAMOTO, M., CAPASSO, A., ROSSI, M. & LA CARA, F. **A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. *pennavorans* bv. *nov.*, a thermotolerant organism isolated from solfataric muds**. Microbiological Research, 163 (1), 105-112, 2006.

JONES, L. B., FONTAMINI, D., JARVINEN, M., E PEKKARINEN, A. **Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin**. Analytical Biochemistry, 263, 214-220, 1998.

JOO, H. & CHANG, C. **Production of an SDS-stable alkaline protease form an alkaophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive**. Enzyme and Microbiol Technology, 38, 176-183, 2006.

JOSHI, S., BHARUCHA, C., JAH, S., YADAY, S., NERURKAR, A. & DESAI, A. J. **Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions**. Bioresource Technology, 99 (1), 195-199, 2007.

KAUL, S. & SUMBALI, G. **Keratinolysis by poultry farm soil fungi**. Mycopathologia, 139, 137-140, 1997.

KASHYAP, D. R., SONI, S. K. & TEWARI, R. **Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation**. Bioresource Technology 88, 251-254, 2003.

KIDD, M.T. & KERR, B.J. **L-Threonine for poultry: a review**. Poultry Science 5, 358-367, 1996.

KIM, S. S., KIM, Y. J., RHEE, I. **Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674**. Archives of Microbiology, 175, 458-461, 2001

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

KIM, S., KIM, J. Y., KIM, S., BAE, H. J., YI, H., YOON, S. H., KOO, B. S., KWON, M., CHO, J. Y., LEE, C., HONG, S. **Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression**. FEBS Letters 581, 865-871, 2007.

KOJIMA, M., KANAI, M., TOMINAGA, M., KITAZUME, S., INOUE, A. & HORIKOSHI, K. **Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01.** *Extremophiles*, 10, 229-235, 2007.

KNOX, A. G. **Feather protein as a source of avian taxonomic information.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 65, 45-54, 1980.

KUMAR, A. G., SWARNALATHA, S., GAYATHRI, S., NAGESH, N. & SEKARAN, G. **Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*.** *Journal of Applied Microbiology*, 40 (7), 2325-2332, 2007.

KUNERT, J. **Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*.** *Mycoses*, 35, 343-348, 1992.

LAEMMLI, V. K. **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227, 680-685, 1970.

LIN, X., LEE, C., CASALE, E. S. & SHIH, J. H. **Purification and characterization of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain.** *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3271-32575, 1992.

LIU, Y., CHEN, Z., NG, T.B., ZHANG, J., ZHOU, M., SONG, F., LU, F., LIU, Y. **Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916.** *Peptides*, 28, 553-559, 2007.

LONGSHAW, C. M., WRIGHT, J. D., FARREL, A. M. & HOLLAND, K. T. ***Kyptococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes.** *Journal of Applied Microbiology*, 93, 810-816, 2002.

LOWRY, O. H., ROSEMBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 267-275, 1951.

MALVIYA, H. Y., PARWEKAR, S., RAJAK, R. C. & HASIJA S. K. **Evaluation of keratinolytic potential of some fungal isolates from gelatin factory campus.** *Indian Journal of Experimental Biology*, 30 (2), 103-106, 1992.

MARAIS, J. P., DE WIT & QUICKE, G. V. **A critical examination of the Nelson-Somogyi method for the determination of reducing sugars.** *Analytical Biochemistry*, 15(3), 373-81, 1966.

MARCHISIO, V. F., FUSCONI, A. & QUERIO, F. L. ***Scopulariopsis brevicaulis*: a keratinophilic or a keratinolytic fungus?** *Mycoses*, 43, 281-292, 2000.

MARCONDES, N. R., TAIRA, C. L., VANDRESEN, D. C., SVIDZINSKI, T. I. E., KADOWAKI, M. K. & PERALTA, R. M. **New feather-degrading filamentous fungi.** *Microbial Ecology*, In press, 2007.

MIGNON, B. R., NIKKELS, A. F., PIÉRARD, G. E. & LOSSON, B. J. **The in vitro and in vivo production of a 31,5 kDa keratinolytic subtilase fom *Microsporium canis* and the clinical status in naturally infected cats.** *Dematology*, 196, 438-441, 1998a.

MIGNON, B., SWINNEN, M., BOUCHARA, J. P., HOFINGER, M., NIKKLES, A., PIERARD, G., GERDAY, C. H. & LOSSON, B. **Purification and characterization of a 31,5 kDa keratilytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats.** *Medical Mycology*, 36, 395-404, 1998b.

MIGNON, B., LECLIPTEUX, T. FOCANT, C. H., NIKKLES, A., PIERARD, G. & LOSSON, B. **Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs.** *Medical Mycology*, 37, 123-129, 1999.

MITCHELL, H. H. **Comparative nutrition of man and domestic animals.** Edited by Academic Press, New York, EUA, 1964.

MITSUIKI, S., SAKAI, M., MORIYAMA, Y., GOTO, M., FURUKAWA. **Purification and some properties for keratinolitic enzyme from alkaliphilic *Nocardiosis* sp. TOA-1.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66 (1), 164-167, 2002.

MIZUMOTO, S., HIRAI, M., SHODA, M. **Enhanced inturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of plant pathogen *Rizoctonia solani*.** *Applied Microbiology Biotechnology*, 75, 1267-1274, 2007.

MONTGOMERY, D.G. **Design and analysis of experiments.** Edited by John Wiley & Sons, New York, EUA, 2001.

MOREIRA, F. G., DE SOUZA, C. G. M., COSTA, M. A. F., REIS S. & PERALTA, R. M. **Degradation of keratinous materials by the palnts pathogenic fungus *Myrothecium verrucaria*.** *Mycopathologia*, 163, 153-160, 2007.

MÜLLER-HELLWIG, S., GROSCHUP, M. H., PICHNER, R., GAREIS, M., MÄRTLBAUER, E., SCHERER, S. & LOESSNER, M. J. **Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrP^{Sc} in hamster brain homogenates by foodborne bacteria.** *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 165-171, 2006.

MUKHOPADHYAY, R. P. & CHANDRA A. L. **Keratinase of a streptomycete**. Indian Journal of Experimental Biology, 28 (6), 575-577, 1990.

NAM, G., LEE, D. LEE, H., LEE, N., KIM, B., CHOE, E., HWANG, J., SUHARTONO, M. T. PYUN, Y. **Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase-producing thermophilic anaerobe**. Archives of Microbiology, 178, 538-547, 2002.

NASCIMENTO, A. H., GOMES, P. C., ALBINO, L. F. T., ROSTAGNO, H. S., TORRES R. A. **Composição Química e Valores de Energia Metabolizável das Farinhas de Penas e Vísceras Determinados por Diferentes Metodologias para Aves**. Revista Brasileira de Zootecnia, 31 (3), 1409-1417, 2002.

NICKERSON, W. J., NOVAL, J. J. & BOBINSON, R. S. **Properties of conjugate elaborated by *Streptomyces fradiae***. Biochimica et Biophysica acta, 77: 73-86, 1963.

NILEGAONKAR, S. S., ZAMBARE, V. P., KANEKAR, P. P., DHAKEPHALKAR, P. K. & SARNAIK, S. S. **Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326**. Bioresource Technology, 98, 1238-1245, 2007.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Enzyme Nomenclature. Academic Press, Orlando, Florida, EUA, 1992.

ODETALLAH, N. H., WANG, J. J., GARLICH, J. D. & SHIH, J. C. H. **Versazyme Supplementation of Broiler Diets Improves Market Growth Performance**. Poultry Science, 84, 858-864, 2005.

ONIFATE, A. A., AL-SANE, N. A., AL-MUSALLAN, A. A., AL-ZARBAN, S. A **review: potencial for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resource**. Bioresource Technology, 66, 1-11, 1998.

PARK, C. H., LEE, S. J., LEE, S. G., LEE, W. S. & BYUN, M. **Hetero- and autoprocesing of the extracellular metalloprotease (Mpr) in *Bacillus subtilis***. Journal of Bacteriology, 186 (19), 6457-6464, 2004.

PARK, G & SON, H. **Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium**. Microbiological Research, in press, 2007.

POORNA, C. A. & PREMA, P. **Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling**. Bioresource Technology, 88, 251-254, 2003.

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

RAO, M. B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M. S. & DESHPANDE, V. V. **Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases.** *Microbiology and molecular Biology Reviews*, 98, 1092-2172/98, 1998

RAWLINGS, N. D. & BARRET, A. J. **Evolutionary families of peptidases.** *Biochemical Journal*, 290, 205-218, 1993.

RAWLINGS, N. D., TOLLE, D. P. & BARRETT, A. J. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Research.*, 32, 160-164, 2004.

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R. & BARRETT, A.J. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Research*, 34, 270-272, 2006.

RAWLINGS, N. D., FRASER, R. M., KOK, C. Y., KONG, J. & BARRET, A. J. **MEROPS: the peptidase database.** *Nucleic Acids Research*, 1-6, 2007.

RIBEIRO, M. L. G., SILVA, J. H. V., DANTAS, M. O., COSTA, F. G. P. C., OLIVEIRA, S. F., FILHO, J. J. & SILVA, E. L. **Exigências Nutricionais de Lisina para Codornas durante a Fase de Postura, em Função do Nível de Proteína da Ração.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32 (1), 156-161, 2003.

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

RIFFEL, A., LUCAS, F., HEEB, P. & BRANDELLI, A. **Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades feather keratin.** *Archives of Microbiology*, 179, 258-265, 2003.

RIFFEL, A., BRANDELLI, A., BELLARO, C. M., SOUZA, G. H. M., EBERLIN, M. N. & TAVAREZ, F. C. A. **Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kR6.** *Journal of Biotechnology*, 128, 693-703, 2007.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de experimentos.** Editado por Casa do Pão Editora, Campinas, São Paulo, Brasil, 2005.

ROZS, M., MACNCZINGER, L., VÁGVÖLGYI, C. S., KEVEI, F. **Secretion of a trypsin-like thiol proteases by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*.** FEMS Microbiology Letters, 205, 221-224, 2001.

RÜCHEL, R., BÖNING, B. & BORG, M. **Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the Absence of the Enzyme during Infection in Vitro.** Infection and Immunity, 53(2), 411-419, 1986.

RUFFLIN, P., VANBRUSSEL, E., BIGUET, J. & BISERTE, G. **Partial characterization of two extracellular aminopeptidases from the deramtophyte *Keratinomyces ajelloi*.** Biochimie. 61, 495-500, 1979.

SANGALI, S. & BRANDELLI, A. **Feather keratin hydolysis by a *Vibrio* sp. Strain kr2.** Journal of Applied Microbiology, 89, 735-743, 2000.

SANTOS, A. L. S., GOMES, A. V. C., PESSÔA, M. F. MOSTAFÁ, S. & CURVELLO, F. A. **Níveis de inclusão de farinha de penas na dieta sobre o desempenho e características de carcaça de codornas para corte.** Acta Scientiarum. Animal Sciences, 28 (1), 27-30, 2006.

SANTOS, R. M. D. B., FIRMINO, A. A. P., DE SÁ, C. M. & FÉLIX, C. R. **Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus fresenius*.** Current Microbiology, 33 (6), 340-370, 1996.

SCAPIM, M. R. S, LOURES, E. G., ROSTAGNO, H., CECON, PR & E SCAPIM, C. A. **Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos.** Acta Scientiarum. Animal Sciences, 25 (1), 91-98, 2003.

SEGAL, R., KIMCHI, A., KRITZMAN, A., INBAR, R. & SEGAL, Z. **The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis.** An epidemiological survey in Israel. Mycoses, 43, 349-353, 2000.

SHARMA, D.C. & SATYANARAYANA, T. **A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods.** Bioresource Technology, 97, 727-733, 2006.

SHELBURNE, C. E., AN, F. Y., DHOLPE, V., RAMAMOORTHY, A., LOPATIN, D., LANTZ, M. S. **The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 297-300, 2007.

SCHROOYEN, P. M. M., DIJKSTRA, P. J., OBERTHÜR, R. C., BANTJES, A. & FEIJENY, J. **Stabilization of Solutions of Feather Keratins by Sodium Dodecyl Sulfate.** Journal of Colloid and Interface Science, 240, 30-39, 2001.

SIENSENOP, U. & BÖHM, K. H. **Comparative studies on keratinase of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin.** Mycoses, 38 (5-6), 205-209, 1995.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA ALIMENTAÇÃO ANIMAL – SINDIRAÇÕES. 1999. **Uso de enzimas em rações.** Revista Alimentação Animal, 19: xx-xx, 1995.

SINGH, C. J. **Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation.** Mycopathologia, 137, 13-16, 1997.

SINGH, J. C. **Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration.** Mycopathologia, 143, 147-150, 1999.

SINGH, C. J. **Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes.** Mycopathologia, 156, 151-156, 2002.

SON, H., PARK, H., KIM, H. & LEE, C. **Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*.** Biotechnology Letters, 30, 461-465, 2007.

SOUZA, F., JUS, S., ERBEL, A., KOKOL, V., CAVACO-PAULO, A. & GUBITZ, G.M. **A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fiber processing.** Enzyme and Microbial Technology, 40, 1772-1781, 2007.

SRIMATHI, S., JAYARAMAN, G. & NARAYANAN, P. R. **Improvement thermodynamic stability of subtilisin *Carlsberg* by covalent modification.** Enzyme and Microbial Technology, 39 (2), 301-307, 2006.

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

SSU, K. W., BRUMM, M. C. & MILLER, P. S. **Effect of feather meal on barrow performance.** Journal of Animal Science, 82: 2588-2595, 2004.

SUIDA, D. **Formulações por proteína ideal e conseqüências técnicas, econômicas e ambientais.** I Simpósio Internacional de Nutrição Animal: Proteína ideal, energia líquida e modelagem, Santa Maria, RS, Brasil, 2001.

SUNTORNUSUK, W. & SUNTORNUSUK, L. **Feather degradation by *Bacillus* sp. FK46 in submerged cultivation.** Bioresource Technology, 86, 239-243, 2003.

TARI, C., GENCKAL, H. & TOKATLI, F. **Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21.** Process Biochemistry, 41, 659-665, 2006.

TAKAMI, H. NOGI, Y. & HORIKOSHI, K. **Reidentification of the keratinase-producing alkaliphilic *Bacillus* sp. AH-101 as *Bacillus halodurans*.** *Extremophiles*, 2(4), 293-296, 1999.

TATINENI, R., DODDAPANENI, K. K., POTUMARTHI, R. C., VELLANKI, R. N., KANDATHIL, M. T., KOLLI, N., MANGAMOORI, L. N. **Purification and characterization of an alkaline keratinase form *Streptomyces* sp.** *Bioresource Technology*, 141(2-3), 187-20, 2007.

THYS, R. C. S. & BRANDELLI, A. Purification and properties of a keratinolytic metalloprotease from *Microbacterium* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1259-1268, 2006.

THYS, R. C. S., GUZZON, S. O., CLADERA-OLIVEIRA, F. & BRANDELLI, A. Optimization of protease by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41, 67-73, 2006.

TIQUIA, S. M., ICHIDA J. M., KEENER, H. M., ELWELL, D. L., BURTT JR., E. H. & MICHEL JR., F. C. **Bacterial community profiles on feathers during composting as determined by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rDNA genes.** *Applied Microbiology Biotechnology*, 67, 412-419, 2005.

TSUBOI, R., KO, I., TAKAMORI, K. & OGAMA, H. **Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH.** *Infection and immunity*, 57, 3479-3483, 1989.

TUCCI, F. M., LAURENTIZ, A. C., SANTOS, E. A., RABELLO, C. V., LONGO, F. A E SAKOMURA, N. K. **Determinação da composição química e dos valores energéticos de alguns alimentos para aves.** *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25 (1), 85-89, 2003.

VASCONCELOS, F. J. M. & RABINOVITCH, L. **A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in food.** *Journal of Food Microbiology*; 58 (3), 235-238, 1994.

VIGNARDET, C., GUILLAUME, Y. C., MICHEL, L., FRIEDRICH, J. & MILLET, J. **Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design.** *International Journal of Pharmaceutics*, 224, 115-122, 2001.

WANG, S., HSU, W., LIANG, T., YEN, Y. & WANG, C. **Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteinases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium.** *Bioresource Technology*, in press, 2007.

WAWRZKIEWICZ, K., LOBAREWSKI, J & WOLSKI, T. **Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae***. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 25, 261-268, 1987.

WAWRZKIEWICZ, K., WOLSKI, T. & LOBAREWSKI, J. **Screening the keratinolytic activity of dermatophytes *in vitro***. Mycopathologia, 114, 1-8, 1991.

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

YAMADA, S., WIRTZ, D. & COULOMBE, P. A. **Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments**. Molecular Biology of the Cell, 13, 382-391, 2002.

YAMAMURA, S., YASUTAKA, M., QUAMRUL, H., YOKOYAMA, K. & TAMIYA, E. **Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 294, 1138-1143, 2002a.

YAMAMURA, S., MORITA, Y., HASAN, Q., RAO, S. R., MURAKAMI, Y., YOKOYAMA, K. & TAMIYA, E. **Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 93 (6), 595-600, 2002b.

YOON, K., BYEON, J. H., PARK, J. & HWANG, J. **Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles**. Science of the Total Environment, 373, 572-575, 2007.

YU, M., WU, P., WIDELITZ, R. B., CHUONG, C. **The morphogenesis of feathers**. Nature, 420, 308-312, 2002.

ZAGHLOUL, T. I., AL-BAHRA, M. & AL-AZMEH, H. **Isolation, identification, and keratinolytic activity of several feather-degrading bacteria isolates**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 70, 207-213, 1998.

<http://ingredients101.com/feather.htm>

www.aviculturaindustrial.com.br

www.avisite.com.br

www.agricultura.gov.br

www.birdwatching-bliss.com/bird-feathers.html

www.kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/proteins.htm

www.merops.acd.uk

<http://www.sbrt.ibict.br> (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas)

www.seplan.ba.gov.br

www.sescsp.org.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)