

PENAS DE FRANGO COMO PRINCIPAL SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *BACILLUS* SP. CL18

LISIANE SOBUCKI¹, DANIEL JONER DAROIT^{1*}

¹Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Cerro Largo.

*Autor para correspondência: Daniel Joner Daroit (djdaroit@gmail.com)

1 Introdução

Proteases microbianas são biocatalisadores empregados em indústrias de alimentos, couros, detergentes, entre outras. Aproximadamente 40% do custo de produção destas enzimas estão relacionados à composição dos meios de cultura (Kasana et al., 2011).

No Rio Grande do Sul, cerca de 800 milhões de frangos foram abatidos em 2015, totalizando 1,5 milhões de toneladas de carcaças (IBGE, 2016). Esta atividade gera enorme quantidade de penas como resíduo. Considerando que as penas representam 5-10% do peso corpóreo das aves (Daroit; Brandelli, 2014), aproximadamente 70 mil toneladas de penas foram produzidas como resíduo pela indústria avícola estadual neste período.

Microrganismos são investigados na degradação destes resíduos, sendo que a bioconversão das penas usualmente requer a produção de proteases extracelulares. Assim, penas de frango podem ser utilizadas como substratos abundantes e de baixo custo para a obtenção de proteases microbianas (Daroit; Brandelli, 2014).

2 Objetivo

Investigar a produção de proteases por bactéria queratinolítica em cultivos submersos utilizando penas de frango como substrato.

3 Metodologia

A bactéria queratinolítica *Bacillus* sp. CL18 foi utilizada. A produção de proteases foi investigada em Caldo Pena (CP), constituído por meio mineral (0,5 g/L NaCl, 0,3 g/L K₂HPO₄, 0,4 g/L KH₂PO₄) contendo diferentes concentrações de penas de frango (1,0-100

g/L). O pH dos meios foi ajustado (7,5) antes da esterilização em autoclave.

Para o preparo do inóculo, colônias da bactéria cultivada em Ágar Triptona de Soja (30 °C, 24 h) foram coletadas e adicionadas a solução salina (8,5 g/L NaCl) estéril. Após homogeneização, um mL desta suspensão (absorbância de 0,8 unidades a 600 nm) foi utilizado como inóculo. Após inoculação, Erlenmeyers (250 mL) contendo 50 mL de CP foram incubados (30 °C, 125 rpm) por sete dias. Periodicamente, alíquotas foram amostradas para determinação da atividade proteolítica.

O CP contendo concentração de penas que resultou em maior produção de protease foi selecionado, sendo então investigados os efeitos da adição de cosubstratos orgânicos (glicose, sacarose, amido, peptona, extrato de levedura; 2 g/L) ou aditivo inorgânico (NH₄Cl; 1 g/L) sobre a produção de proteases. A produção de proteases também foi avaliada em Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) contendo penas.

A partir dos resultados, os efeitos das concentrações de dois cosubstratos/aditivos sobre a produção de proteases foram avaliados em um delineamento central composto rotacional (DCCR) 2² completo utilizando concentração fixa de penas.

A atividade proteolítica foi avaliada utilizando os sobrenadantes dos cultivos, em ensaios (55 °C, pH 8,0, 10 min) que empregaram azocaseína (10 g/L) como substrato.

4 Resultados e Discussão

O efeito de diferentes concentrações de penas sobre a produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 foi inicialmente avaliado. A Tabela 1 apresenta a atividade proteolítica observada após cinco dias de cultivo nos meios contendo diferentes concentrações de penas. Houve incremento na produção de proteases com o aumento da concentração de penas até o limite de 30 g/L (372 U/mL), enquanto que maiores concentrações (50-100 g/L) resultaram na diminuição da produção de proteases (Tabela 1). Baixas concentrações de penas podem originar o subaproveitamento do potencial microbiano, enquanto concentrações elevadas podem resultar em inibição/repressão pelo substrato/produto e menor transferência de oxigênio para o crescimento microbiano (Fakhfakh et al., 2011). O perfil de produção de proteases em CP contendo 30 g/L de penas pode ser analisado na Figura 1.

A suplementação do CP (30 g/L de penas) com cosubstratos e a produção de protease foram avaliadas em cultivos realizados por cinco dias. Glicose e sacarose inibiram completamente a

produção de proteases. Embora a adição de amido tenha resultado na produção de proteases, os níveis foram inferiores àqueles obtidos sem suplementação (278 U/mL). Analogamente, NH_4Cl e fontes orgânicas de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) resultaram em menor produção (190-278 U/mL). Para o meio BHI contendo 30 g/L de penas, também observou-se menor produção (129 U/mL) quando comparada ao CP controle. Os efeitos negativos dos cosubstratos utilizados podem estar relacionados ao fenômeno de repressão catabólica (Daroit; Brandelli, 2014).

Visando otimizar a produção de proteases em cultivos contendo 30 g/L de penas, um DCCR 2^2 foi construído utilizando peptona (0,50-4,5 g/L) e NH_4Cl (0,50-4,5 g/L) como variáveis independentes. As concentrações ótimas de peptona e NH_4Cl foram 0,50-1,08 g/L e 1,08-2,50 g/L, respectivamente, resultando em maior produção de proteases (390 U/mL) em menor tempo de cultivo (quatro dias) quando comparada ao CP contendo 30 g/L de penas.

5 Conclusão

O uso de penas de frango como principal substrato para produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 pode representar potencial estratégia de manejo e agregação de valor a estes resíduos em uma perspectiva biotecnológica.

Figura 1. Perfil de produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 durante cultivos submersos em meio contendo 30 g/L de penas

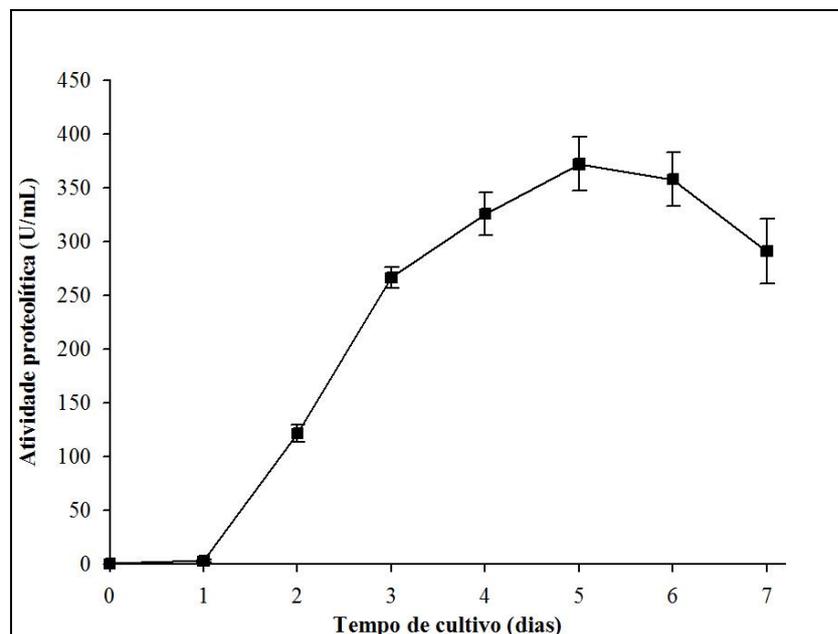


Tabela 1. Produção de proteases por *Bacillus* sp. CL18 em cultivos realizados por cinco dias em caldo pena contendo diferentes concentrações de penas de frango

Concentração de penas (g/L)	Atividade proteolítica (U/mL)
1,0	65,5 ± 4,5
2,5	72,5 ± 6,0
5,0	179,0 ± 5,5
7,5	317,0 ± 7,0
10,0	303,0 ± 20,0
20,0	337,0 ± 21,0
30,0	372,0 ± 18,5
50,0	143,5 ± 16,0
75,0	188,0 ± 8,4
100,0	153,5 ± 17,0

Palavras-chave: Resíduo agroindustrial; Potencial queratinolítico; Bioprocesso; Protease.

Fonte de Financiamento

PROBIC - FAPERGS

Referências

- DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 34, n. 4, p. 372-384, 2014.
- FAKHFAKH, N. et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1731-1737, 2011.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores IBGE – Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro: IBGE, março 2016.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 37, n. 3, p. 262-276, 2011.