

Notas Científicas

Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*

Marília Ribeiro Sales⁽¹⁾, Maria Taciana Holanda Cavalcanti⁽¹⁾, José Luiz de Lima Filho⁽¹⁾,
Cristina Maria de Souza Motta⁽²⁾ e Ana Lúcia Figueiredo Porto⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE. E-mail: mariliarsales@gmail.com, mtcvsoares@yahoo.com.br, joseluz60@gmail.com ⁽²⁾UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Coleção de Culturas URM, Campus Universitário, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE. E-mail: smotta@ufpe.br ⁽³⁾Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife, PE. E-mail: anaporto@dmfa.ufrpe.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM 1546, tendo-se como substrato penas de galinha, por meio de planejamento fatorial completo 2³. Todos os parâmetros estudados e as interações de segunda ordem foram estatisticamente significativos. A maior atividade queratinolítica (48,9 U mL⁻¹) foi obtida com 120 rpm, 0,5% (p/v) de penas de galinha e sete dias de cultivo.

Termos para indexação: enzimas queratinolíticas, fungos filamentosos, queratina.

The use of poultry feather to produce keratinase by *Aspergillus carbonarius*

Abstract – The objective of this work was to evaluate the keratinase production by *Aspergillus carbonarius* URM 1546, using as substrate poultry feather in a full experimental design 2³. The studied parameters and the second-order interactions were statistically significant. The maximum keratinase activity (48.9 U mL⁻¹) was obtained using 120 rpm, with 0.5% (w/v) poultry feather and seven culture days.

Index terms: keratinolytic enzymes, filamentous fungi, keratin.

A indústria avícola produz uma grande quantidade de penas com potencial para causar impacto ambiental, pois se acumulam em forma de lixo após o processamento das aves para consumo humano (Onifade et al., 1998). No entanto, as penas possuem cerca de 87% de proteína (Bureau et al., 1999) em forma de queratina (Riffel et al., 2003).

A queratina não é degradada por enzimas proteolíticas comuns, como tripsina e pepsina, por conter uma grande quantidade de pontes dissulfeto e de hidrogênio, e interações hidrofóbicas (Riffel et al., 2007). Esta proteína é degradada por enzimas específicas, denominadas queratinases, que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas da queratina e são produzidas por diversos microrganismos e vegetais (Said & Pietro, 2004).

Essas enzimas podem ser usadas para o processamento biotecnológico de penas ao se fazer sua bioconversão de poluidores em potencial para ração rica em nutrientes, pois possuem aminoácidos essenciais como glicina e leucina, além de proporcionarem

enriquecimento adicional da ração pela própria biomassa microbiana (Said & Pietro, 2004).

Para o desenvolvimento de produtos, a partir de microrganismos, é necessário o estudo dos fatores que podem influenciar na produção da biomolécula de interesse. O aperfeiçoamento da produção pode ser realizado por meio de planejamentos fatoriais para se verificar os efeitos das variáveis independentes e estimar os efeitos das interações entre estas (interações de segunda ordem) sobre a variável resposta (Kalil et al., 2000).

Em estudos preliminares, o isolado de *Aspergillus carbonarius* URM 1546 apresentou-se como melhor produtor de queratinase, entre outros isolados do gênero *Aspergillus* da Coleção de Culturas URM – UFPE, e por isso foi selecionado para o presente estudo (Sales et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM 1546, tendo-se utilizado como substrato penas de galinha, por

meio de planejamento fatorial completo 2^3 , em cultivo líquido submerso. As variáveis independentes foram: agitação, concentração de substrato e tempo de cultivo, e, a variável resposta foi a atividade queratinolítica.

O experimento foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no primeiro semestre de 2007. O isolado de *Aspergillus carbonarius*, URM 1546, foi obtido na Coleção de Culturas URM (University Recife Mycology), do Departamento de Micologia da UFPE. As culturas foram mantidas em ágar Sabouraud, modificado pela retirada do extrato de levedura e autoclavado por 20 min a 121°C.

A produção da enzima por fermentação submersa foi realizada de acordo com Friedrich et al. (1999), modificada pela utilização de penas de galinhas limpas e desengorduradas (Wawrzkiwicz et al., 1987), e o pH da solução tampão fosfato de sódio (0,3 M) utilizado foi 7,8.

O microrganismo foi cultivado em tubos de Erlenmeyer, com capacidade para 250 mL, com 50 mL do meio líquido para a produção da enzima (esterilização por autoclave, 20 min, 121°C). Os ensaios com concentração de 10^4 esporos por mL foram incubados a 30°C, em diferentes condições de agitação (120, 150 e 180 rpm), tempos de cultivo (3, 5 e 7 dias) e concentração de penas de galinha (0,5, 1,0 e 1,5% p/v), para a determinação dos melhores níveis dessas três variáveis. O erro-padrão foi calculado por meio da realização de três repetições no ponto central.

Para a determinação da atividade queratinolítica, foi utilizado o método descrito por Muhsin & Hadi (2001). Foram utilizados 500 µL do extrato enzimático, 50 mg de pena de galinha tratada e 5 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,3 M, pH 7,2), colocados em tubos cônicos com capacidade para 14 mL; o conteúdo foi misturado por inversão e incubado a 37°C durante 2 horas em banho-maria, com leve agitação constante. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em banho de gelo (10 min), e as amostras foram, então, centrifugadas (5.000 g). A absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotometria a 280 nm. Cada ensaio foi realizado em duplicata e foi feita uma amostra controle (enzima inativada por calor a 100°C). Uma unidade da atividade enzimática foi determinada como aumento do valor da absorbância de 0,01 a 280 nm, nas condições experimentais, e expressa em unidades por mililitro. Os dados obtidos foram analisados com o programa Statistica 7.

Os resultados obtidos a partir do planejamento estatístico completo 2^3 demonstraram que as melhores condições para a produção de queratinase por *A. carbonarius* URM 1546 foram as do ensaio 5, nas condições: 120 rpm de agitação, 0,5% (p/v) de concentração de substrato e sete dias de cultivo (Tabela 1). No diagrama de Pareto (Figura 1 A), é possível observar que as interações de segunda ordem foram mais importantes do que os efeitos principais de cada variável testada. Entretanto, todos os parâmetros analisados foram significativos a 5% de probabilidade.

O parâmetro que mais influenciou na produção de queratinase por *A. carbonarius* URM 1546 foi a interação entre a agitação e a concentração do substrato, que mostrou efeito positivo, o que indica relação diretamente proporcional entre essas duas variáveis (Figura 1 A).

Por meio dos resultados obtidos, pôde-se deduzir o gráfico de superfície de resposta para as variáveis: atividade queratinolítica, tempo de cultivo e concentração de substrato (Figura 1 B); ademais, pôde-se estimar estatisticamente a equação que explica o comportamento da produção da queratinase nessas variáveis: atividade queratinolítica ($U\ mL^{-1}$) = $6,3799 - 8,5425CS - 2,4731dias$, em que CS é a concentração de substrato (% p/v); e dias representa o tempo de cultivo.

O gráfico construído, a partir dos dados da atividade queratinolítica e das variáveis concentração de substrato e agitação, está apresentado na Figura 1 C. A equação do gráfico é: atividade queratinolítica ($U\ mL^{-1}$) = $45,9767 - 8,5425NA - 0,1818CS$, em que NA é o nível da agitação (rpm); e CS é a concentração de substrato (% p/v).

Tabela 1. Matriz estatística do planejamento fatorial dos níveis das variáveis experimentais (agitação, concentração de substrato e tempo de cultivo), para produção de queratinase, com as respostas da atividade queratinolítica após fermentação por *Aspergillus carbonarius* URM 1546, tendo-se utilizado pena de galinha como substrato.

Ensaio	Agitação (rpm)	Concentração de substrato (%)	Tempo de cultivo (dias)	Atividade queratinolítica ($U\ mL^{-1}$)
1	120	0,5	3	4,3
2	180	0,5	3	3,3
3	120	1,5	3	8,1
4	180	1,5	3	5,3
5	120	0,5	7	48,9
6	180	0,5	7	1,4
7	120	1,5	7	1,3
8	180	1,5	7	9,0
Média	150	1%	5	10,2

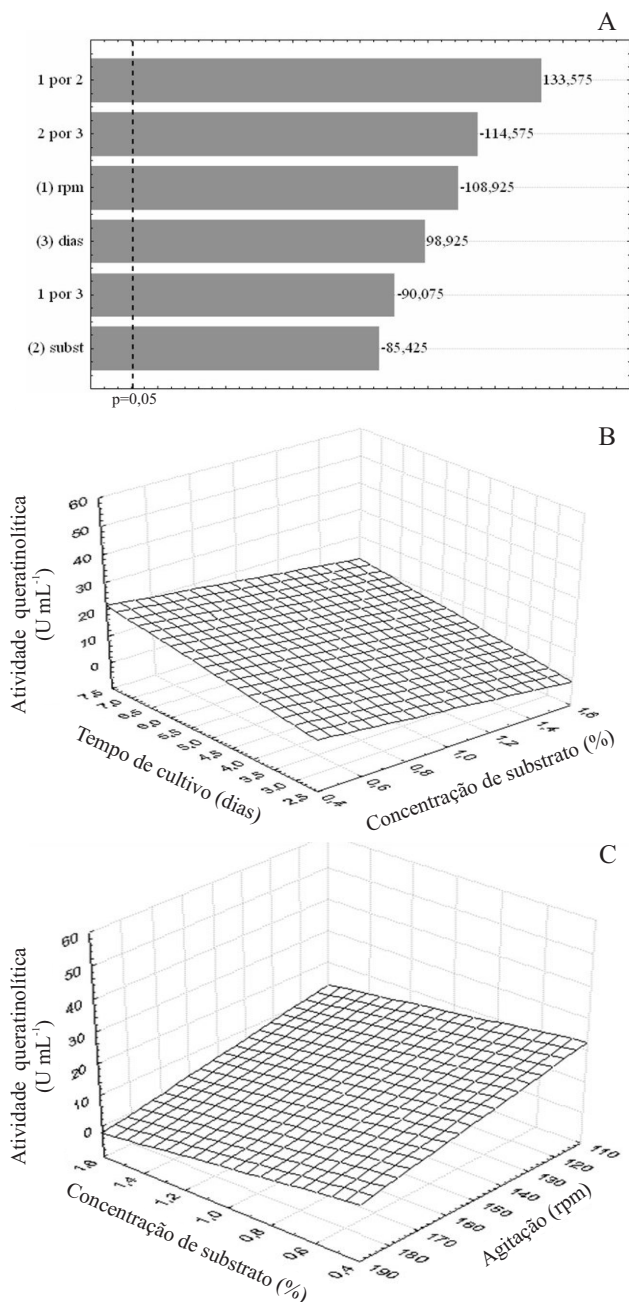


Figura 1. A) Diagrama de Pareto, relativo aos efeitos-padrão das diferentes variáveis, testadas no experimento de produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius* URM 1546, que utilizou penas de galinha como substrato. As variáveis foram: agitação, concentração do substrato e tempo de cultivo. O ponto no qual os efeitos são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) é indicado pela linha vertical tracejada. Erro puro = 0,02. B e C) Gráficos de superfícies em três dimensões. Em B as variáveis independentes foram tempo de cultivo e concentração de substrato. Em C as variáveis independentes foram concentração de substrato e agitação. Em ambos, a variável resposta foi atividade queratinolítica.

A atividade queratinolítica de $48,9 \text{ U mL}^{-1}$, obtida a partir do cultivo submerso de *A. carbonarius* URM 1546, tendo-se utilizado pena de galinha na determinação, mostrou-se superior àquela obtida por fungo do mesmo gênero, o *A. flavus*, o qual produziu $0,781 \text{ U mL}^{-1}$ após sete dias de cultivo submerso (Friedrich et al., 1999).

Anbu et al. (2007) estudaram a produção de queratinases variando a concentração de penas como substrato de 0,2 a 3,8% (p/v) e o tempo de produção de uma a nove semanas, entre outras variáveis, e obtiveram como melhor resultado para a atividade queratinolítica $6,2 \text{ U mL}^{-1}$ em presença de 1,5% (p/v) de substrato, após cinco semanas de cultivo, com *Scopulariopsis brevicaulis*. Neste trabalho, *A. carbonarius* URM 1546 foi mais eficiente na produção de queratinase, com menor tempo de produção e maior atividade queratinolítica do que o microrganismo utilizado por Anbu et al. (2007).

Ramnani & Gupta (2004) estudaram a produção de queratinase a partir de *Bacillus licheniformis* RG1, em meio com penas de galinha como substrato, e variaram a composição do meio de cultivo. Eles obtiveram como melhor resultado a atividade queratinolítica de 1.295 U mg^{-1} de matéria seca, no meio com 0,5% de penas, em 72 horas de cultivo a 37°C ; estes resultados são semelhantes, em relação à concentração de substrato, aos encontrados para a produção de queratinase por *A. carbonarius* URM 1546.

Neste trabalho, *A. carbonarius* URM 1546 demonstrase eficiente na utilização de penas de galinha como substrato, para a produção de queratinase. Para se obter maior atividade queratinolítica por *A. carbonarius* URM 1546, devem ser utilizados os menores níveis para as variáveis agitação e concentração de substrato, bem como aumentar o tempo de cultivo, segundo os ensaios realizados.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro; à Granja Pinto Formoso (Carpina, PE), por ceder as penas de galinha usadas na pesquisa.

Referências

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

- BUREAU, D.P.; HARRIS, A.M.; CHO, C.Y. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.180, p.345-358, 1999.
- FRIEDRICH, J.; GRADISAR, H.; MANDIN, D.; CHAUMONT, J.P. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.127-130, 1999.
- KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v.35, p.539-550, 2000.
- MUHSIN, T.M.; HADI, R.B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Microbiologia**, v.154, p.185-189, 2001.
- ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v.66, p.1-11, 1998.
- RAMNANI, P.; GUPTA, R. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.40, p.191-196, 2004.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, v.128, p.693-703, 2007.
- RIFFEL, A.; LUCAS, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, v.179, p.258-265, 2003.
- SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 413p.
- SALES, M.R.; CAMPOS, R.A.L.; SOUSA, M.A.; SOUZAMOTTA, C.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Seleção de *Aspergillus* spp. para degradação in vitro de penas de galinha. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 2007, Curitiba. **Anais**. Curitiba: Senai; Cietep, 2007. 1 CD-ROM.
- WAWRZKIEWICZ, K.; LOBARZEWSKI, J.; WOLSKI, T. Intracellular keratinase of *Trichopyton gallinae*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p.261-268, 1987.

Recebido em 2 de outubro de 2007 e aprovado em 10 de janeiro de 2008