

PENAS DE FRANGO COMO SUBSTRATOS PARA OBTENÇÃO DE PROTEASES MICROBIANAS

Daniel Joner Daroit

(Universidade Federal da Fronteira Sul – *Campus* Cerro Largo/RS)

1. Proteases microbianas

- Hidrolases: clivam ligações peptídicas
- Aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas
- Aplicabilidade:
 - detergentes
 - alimentos
 - couros
 - usos médicos/farmacêuticos
 - outras indústrias: têxtil, fotográfica, ...
- Substratos para produção de enzimas: 40% dos custos
 - ***substratos alternativos***

2. Penas de frango

- Apêndices epidérmicos de aves
- Queratinas são componentes majoritários: ~90% (d.w.)

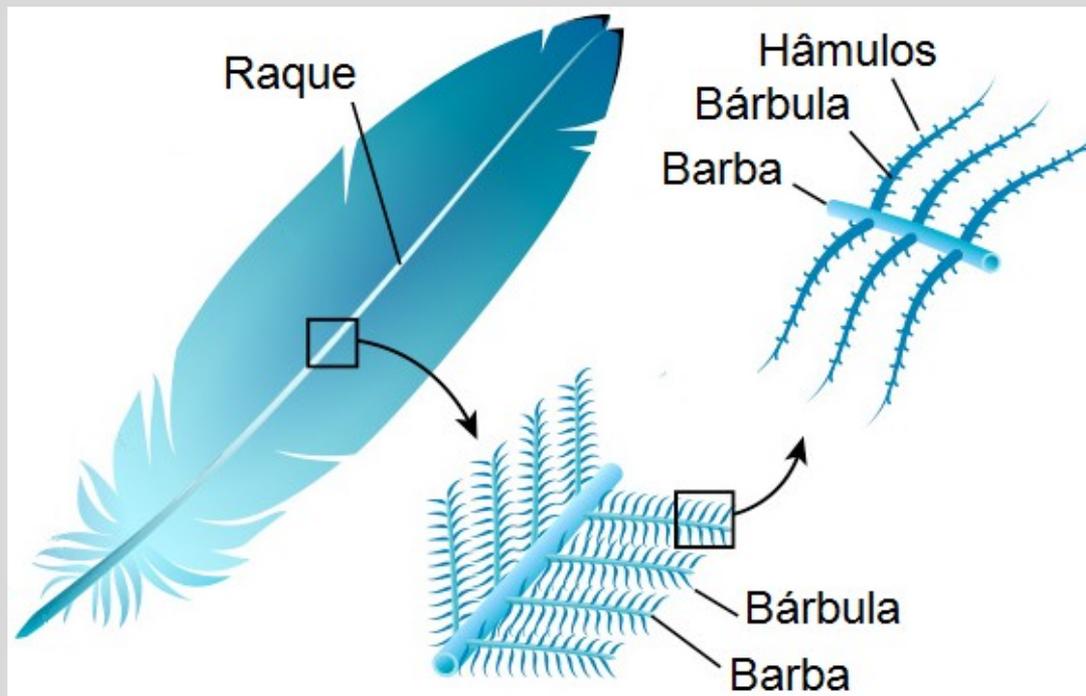
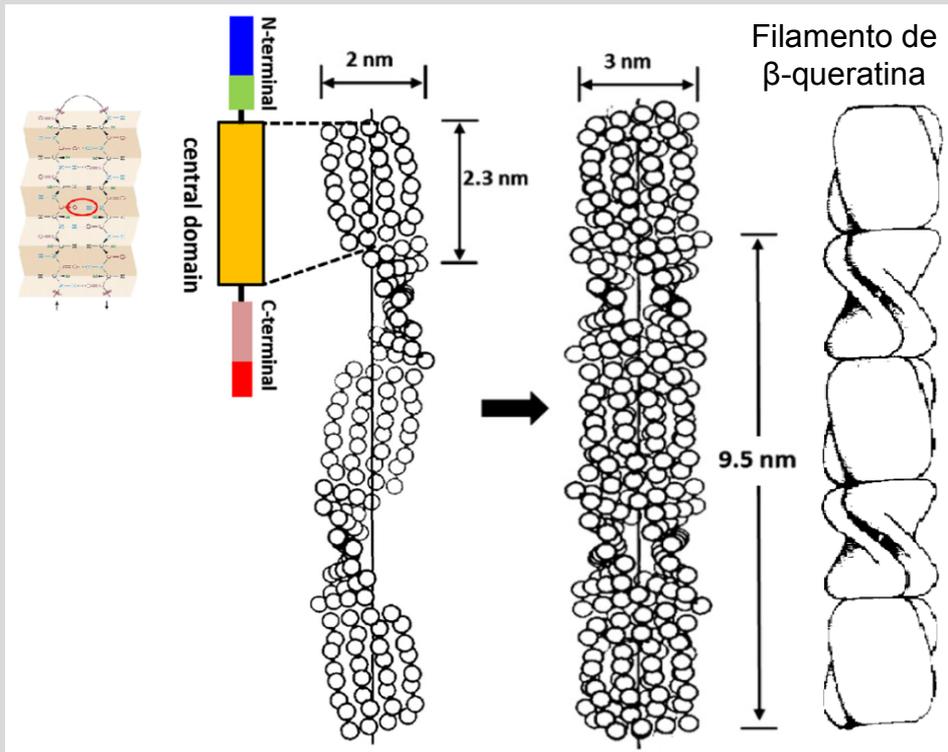


Fig. 1. Estrutura de uma pena (Adaptada de Wang et al., 2016).

- β -queratinas: conteúdo de **cisteína** (4-8%)
 - empacotamento compacto
 - **pontes S-S**, pontes de H, interações hidrofóbicas



* Estáveis e insolúveis

* Resistentes:

- estresses mecânicos
- agentes químicos
- proteases (tripsina, pepsina)

Fig. 2. Estrutura de filamento de β -queratina
(Adaptada de Wang et al., 2016).

3. Penas de frango como resíduos

- Produção avícola: expansão

- **Mundo:**

- EUA + Brasil + China: >40 milhões ton de carne/ano

- União Europeia: ~11 milhões ton de carne/ano

- **Brasil (2015):** 3º maior produtor mundial

- 5,7 bi de frangos abatidos (Região Sul: ~60%)

- 13,1 milhões ton de carcaças

- **Rio Grande do Sul (2015):**

- 800 mi de frangos abatidos = 1,6 mi ton de carcaças

- Penas representam 5-10% do peso corpóreo de frangos
- Abatedouro com capacidade de abater 165 mil aves/dia
 - aproximadamente 18,5 toneladas de penas/dia

- Mundo: ~5 milhões de toneladas de penas/ano
- Brasil: ~640 mil toneladas em 2015
- RS: ~80 mil toneladas em 2015

Penas → Recalcitrância + Elevada produção



Acúmulo localizado



Problemas ambientais



Estratégias de manejo

4. Manejo de resíduos queratinosos

- *Incineração*: custos; liberação de NH_3
- *Disposição no ambiente*:
 - acúmulo (zonas anaeróbicas): produção de H_2S e NH_3
- *Cocção sob pressão + moagem*: farinha de penas
 - suplemento em rações animais: custos; valor nutricional
- *Hidrólise química*: peptonas
- * ***Outras alternativas???***
 - baixo custo, redução de riscos ambientais/saúde

5. Queratinas são degradadas na natureza

- *Microrganismos queratinolíticos:*
 - queratina como fonte de nutrientes (C, N, S) e energia
- *Capacidade de degradação* (Brandelli et al., 2010):
 - **proteases extracelulares** (queratinases, ...)
 - redução de pontes dissulfeto: sulfitólise
 - ataque mecânico: pressão/penetração de micélio
 - hipótese recente (Lange et al., 2016):
 - monooxigenases líticas de polissacarídeos (LMPOs)

6. Penas como substratos para obtenção de proteases

6.1. Bioprospecção

- **Estratégias dependentes de cultivo**

- isolamento de microrganismos queratinolíticos

- **Potencial:** metagenômica: genes para proteases

- transformação de hospedeiros microbianos

- contudo... principal foco é a obtenção de enzimas

- Bioprospecção:
 - Avaliação do potencial proteolítico/queratinolítico:
 - produção de proteases extracelulares (testes qualitativos)

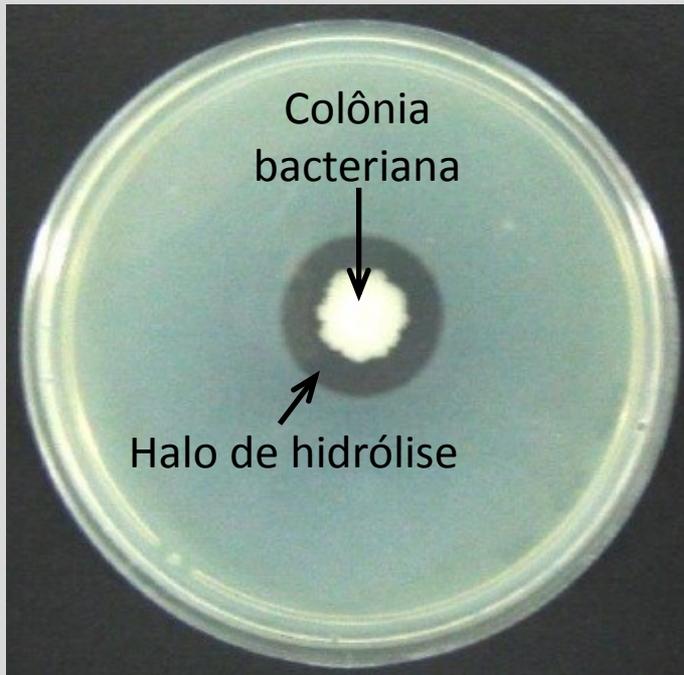


Fig. 3. Cultivo de *Bacillus* sp. P45 em Ágar Leite.

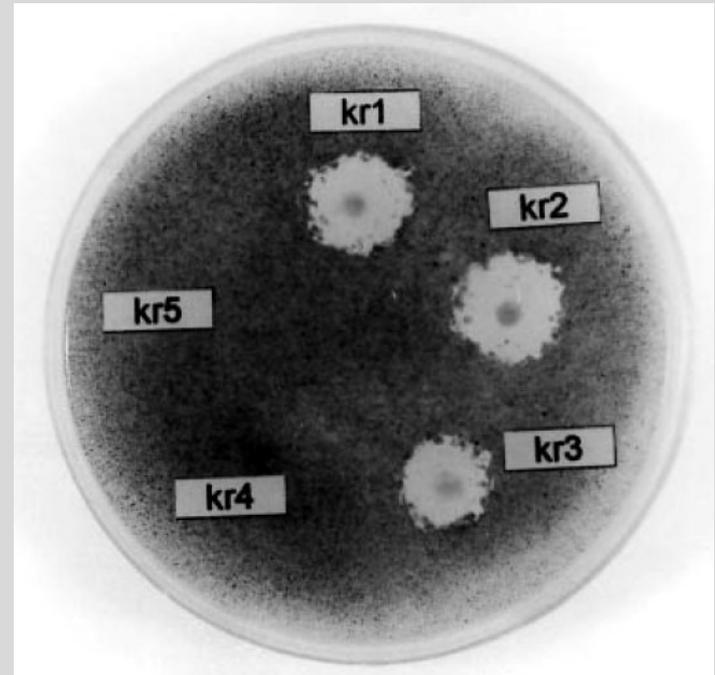


Fig. 4. Cultivo de isolados bacterianos em Ágar Farinha de Penas. (Adaptado de Sangali & Brandelli, 2000).

- Avaliação do potencial queratinolítico
- Cultivos em meios contendo penas (testes qualitativos)

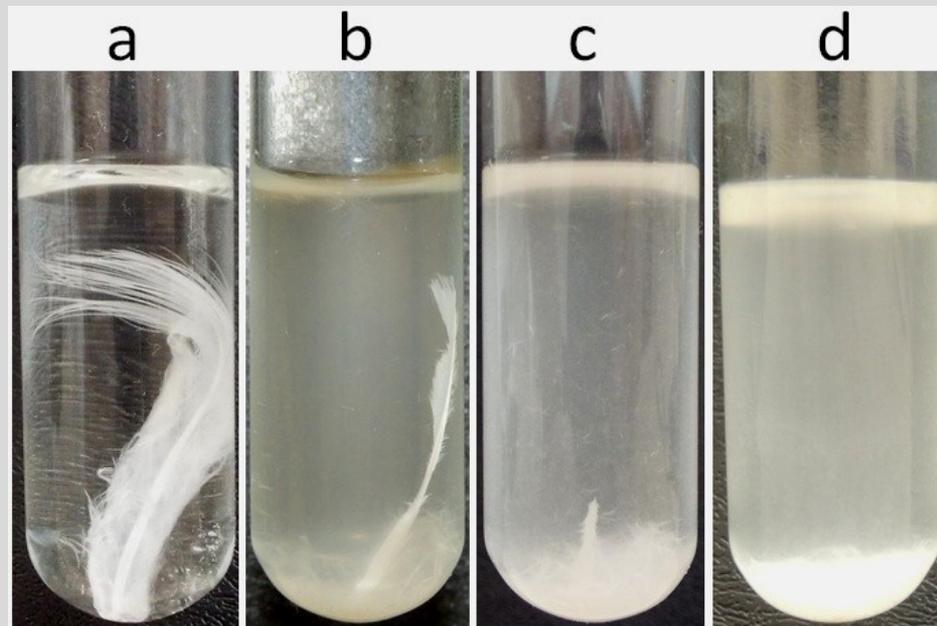


Fig. 5. Cultivos de *Bacillus* sp. CL18 realizados a 30 °C. **a:** controle, não inoculado; **b, c, d:** inoculados com CL18 e incubados por 2 (b), 4 (c) e 6 (d) dias.

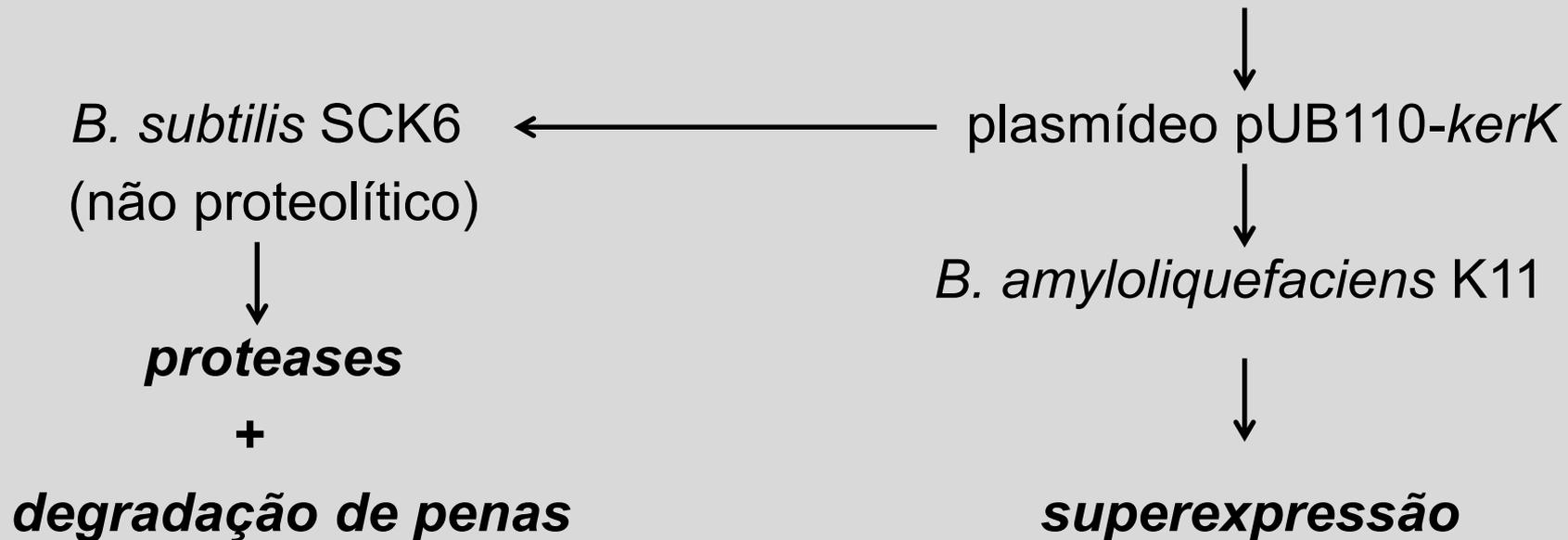
6.2. Aspectos do bioprocesso

6.2.1. Microrganismo

- Determina condições e limites do bioprocesso
- GRAS
- Eficiência:
 - ***tipo selvagem***
 - mutagênese
 - técnicas de genômica

- Técnicas de genômica

- *B. amyloliquefaciens* K11 (queratinolítico): gene *kerK*



(Yang et al., 2016)

- Controle microbiano da produção de proteases

- *Produção constitutiva / controlada (indutível)*

- Em *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 (Parrado et al., 2014):

- cultivos com penas de frango: abordagem proteômica

- diversidade de hidrolases secretadas:

- relacionada à complexidade química das penas

- *Indução por estresses/limitações nutricionais*

- produção máxima: final da fase *log* ou fase estacionária
- queratinas são macromoléculas (teor de N é adequado)
 - indisponibilidade: síntese de proteases/queratinases
 - queratinas como indutores indiretos?
- Em *Bacillus cereus* (Adiguzel et al., 2009):
 - limitação de peptídeos: secreção de proteases

- *Repressão catabólica*

6.2.2. Condições de cultivo

- **Cultivos submersos (SmF) >>>> Estado sólido (SSF)**
 - microrganismo
 - rendimento enzimático
 - degradação/solubilização das penas
 - controle do processo
 - custos

- Temperatura:

- crescimento microbiano X produção de enzima
- temperaturas elevadas (~50 °C)
 - processo acelerado, menos contaminações, custos

- pH: pH alcalino facilita hidrólise de queratinas: efluentes?

- Aeração: aerobiose >>>> anaerobiose

- SSF: substrato-suporte

- Homogeneização/agitação: mistura, oxigênio, cisalhamento

6.2.3. O substrato

- Penas inteiras X Penas fragmentadas/moídas

- aporte de energia (mecânica)
- tamanho de partícula:
 - superfície para ataque microbiano/enzimático
 - tempo de cultivo e rendimento enzimático
 - homogeneização do meio
 - SSF: compactação

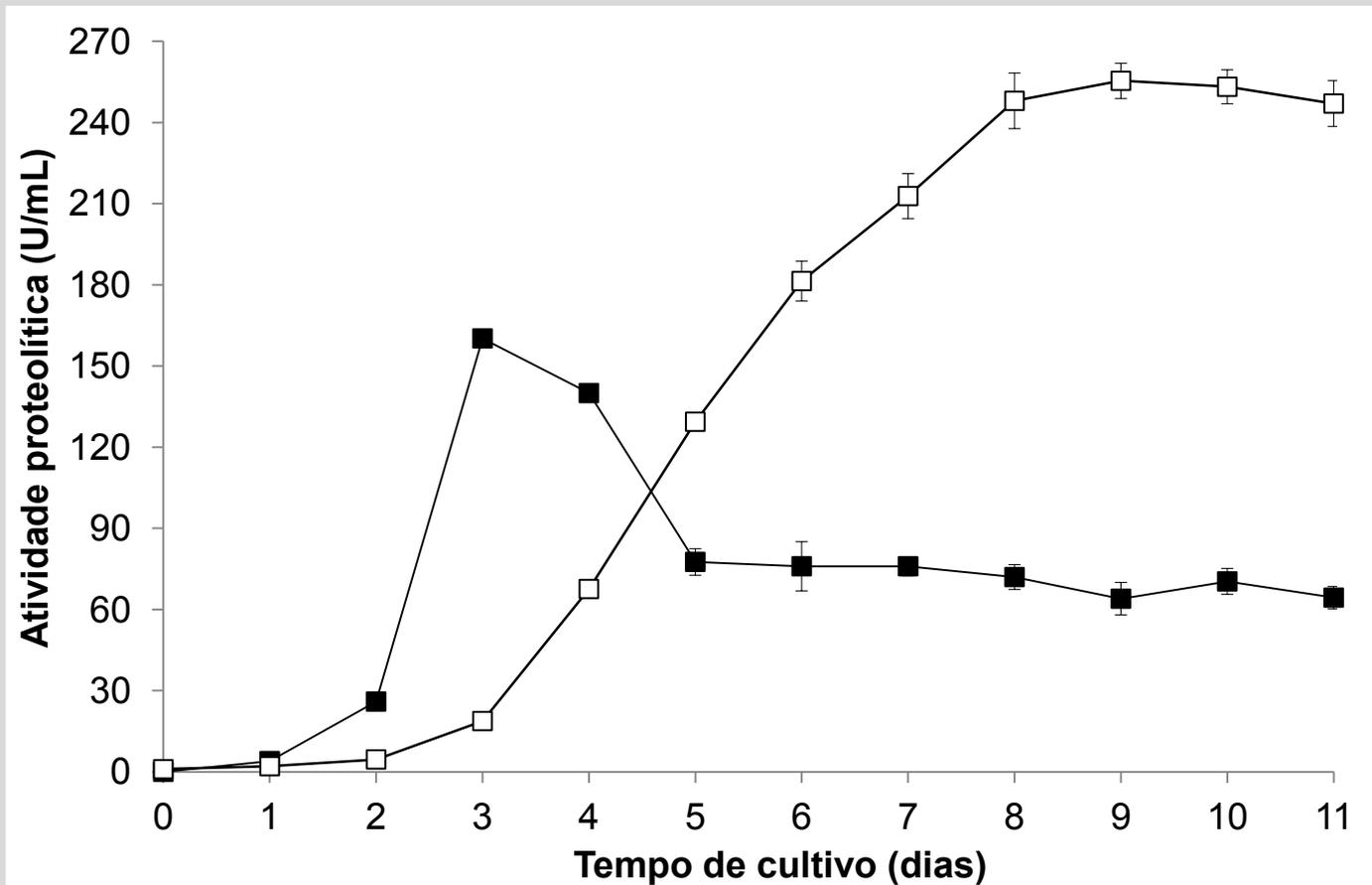


Fig. 6. Produção de protease por *Bacillus* sp. CL33A durante cultivos submersos (30 °C, pH inicial 7,5, 125 rpm) em meio mineral contendo 10 g/L de penas inteiras (□) ou farinha de penas (■).

- Concentração de penas (SmF)

- aproveitamento do potencial microbiano
- agitação: cisalhamento
- viscosidade do meio
 - transferência de massa (oxigênio)
- inibição por substrato / inibição por produto

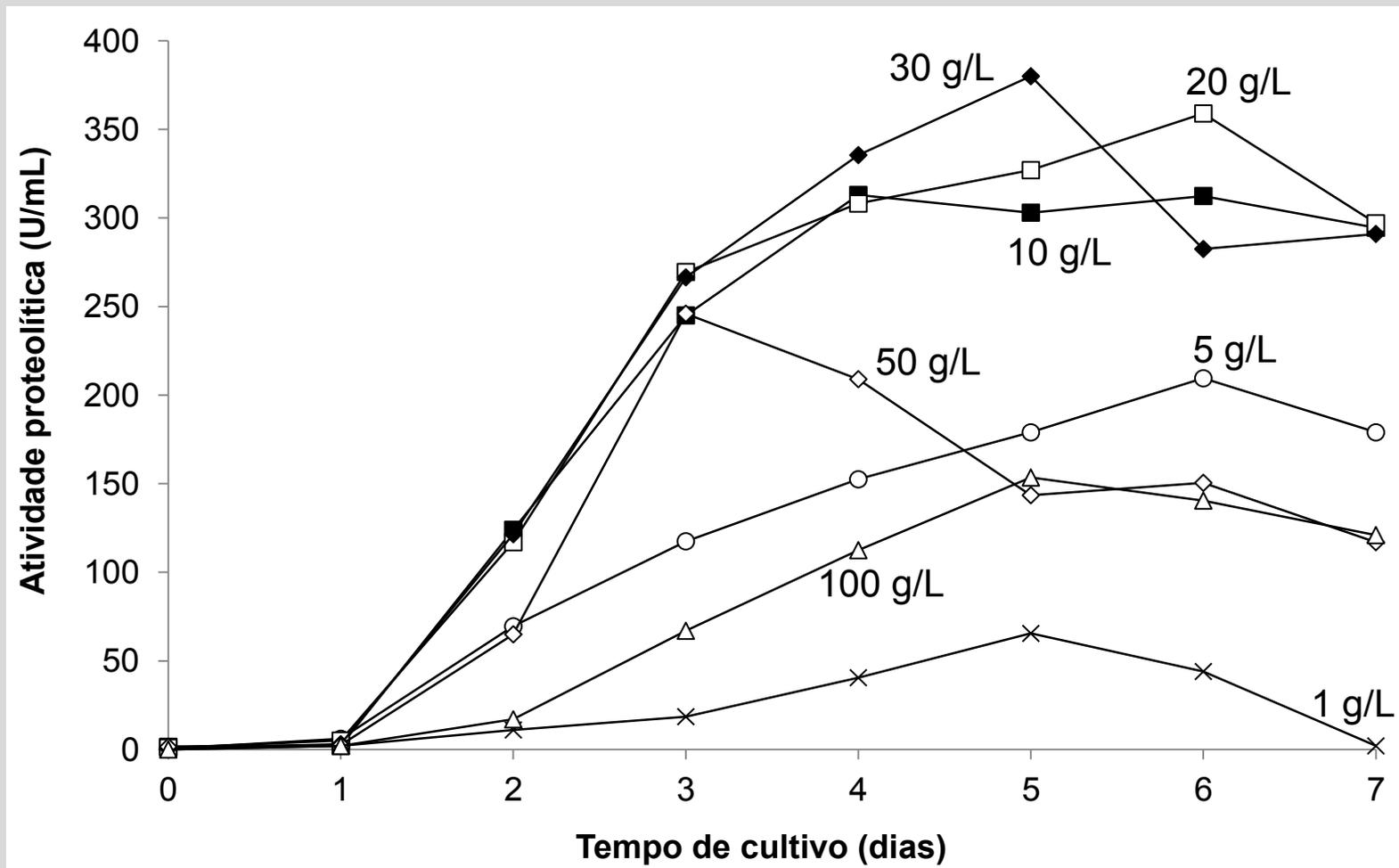


Fig. 7. Produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 durante cultivos submersos (30 °C, pH inicial 7,5, 125 rpm) em meio mineral contendo diferentes concentrações de penas inteiras.

6.2.4. Uso de cosubstratos orgânicos e aditivos inorgânicos

- Ex. orgânicos: glicose, sacarose, amido, peptonas, ...
- Ex. inorgânicos: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ...
- Efeitos variáveis: tipo e concentração
 - inibição da produção: repressão catabólica
 - aumento da produção: acúmulo de biomassa
 - final da fase *log*: limitação nutricional: produção

Tabela 1. Efeito de co-substratos e aditivos sobre a produção de protease por *Bacillus* sp. CL18 em meio contendo penas (30 g/L)

Co-substrato/aditivo	Concentração	Atividade proteolítica (U/mL)
Controle	-	380,0
Glicose	0,2%	0,0
Sacarose	0,2%	2,0
Amido	0,2%	277,8
Extrato de levedura	0,2%	199,7
Peptona de carne	0,2%	236,0
NH ₄ Cl	0,1%	310,0
CaCl ₂	10 mM	0,0
MgCl ₂	10 mM	177,5

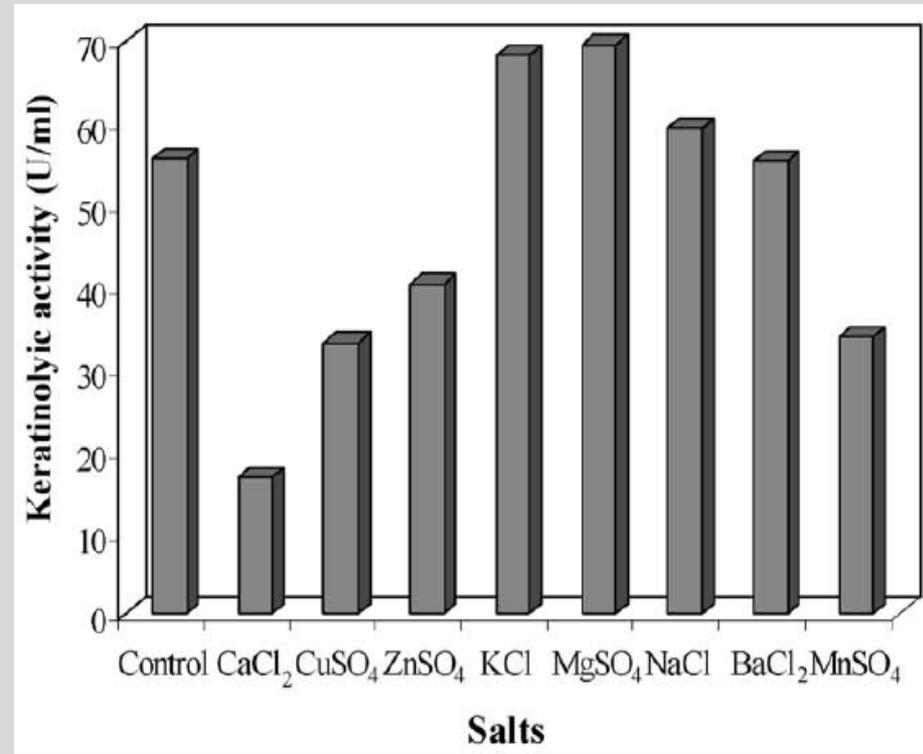
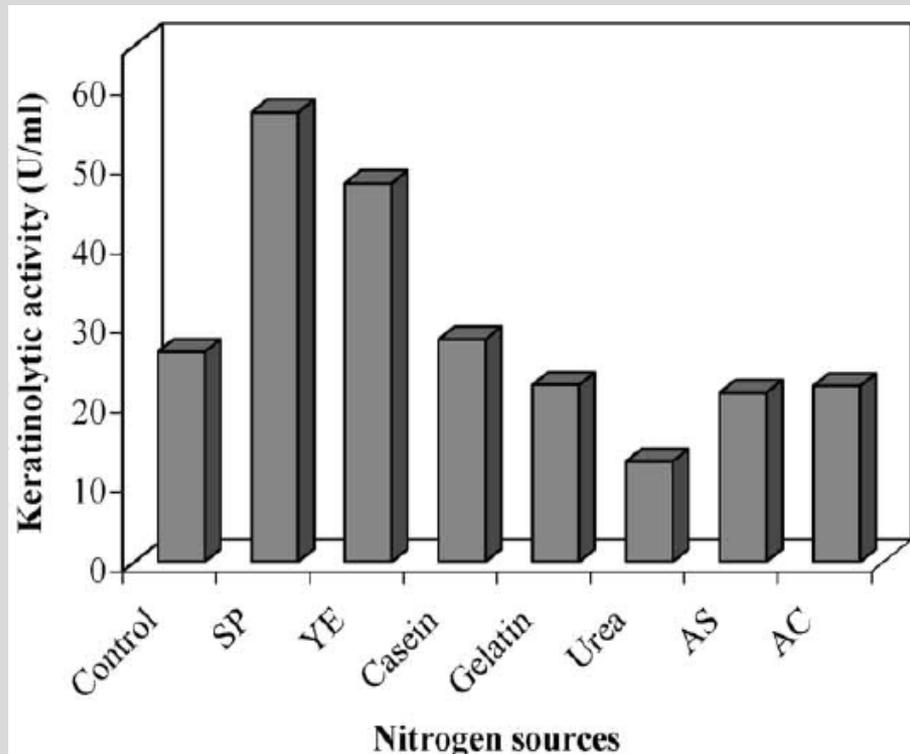


Fig. 8. Efeito de fontes de nitrogênio (2 g/L; esquerda) e sais (0,2 g/L; direita) sobre a produção de queratinase por *Bacillus pumilus* A1 em meio contendo farinha de penas (10 g/L). (Adaptado de Fakhfakh-Zouari et al., 2010).

6.2.5. Escala:

- Literatura científica: (**Shake-**)*flasks*
 - Escalonamento: fermentadores/biorreatores (1-10 L)
- BioResource International, Inc. (*B. licheniformis* PWD-1)
 - bancada (10 L) → piloto (100 L) → industrial (50,000 L)
 - Versazyme™

6.2.6. Condução:

- batelada simples

Áreas amplas para avanços
científico-tecnológicos

7. Considerações finais

- Bioprocesso “ideal”

- Máxima produção de proteases
- Completa degradação das penas

Cinéticas podem
não coincidir!!

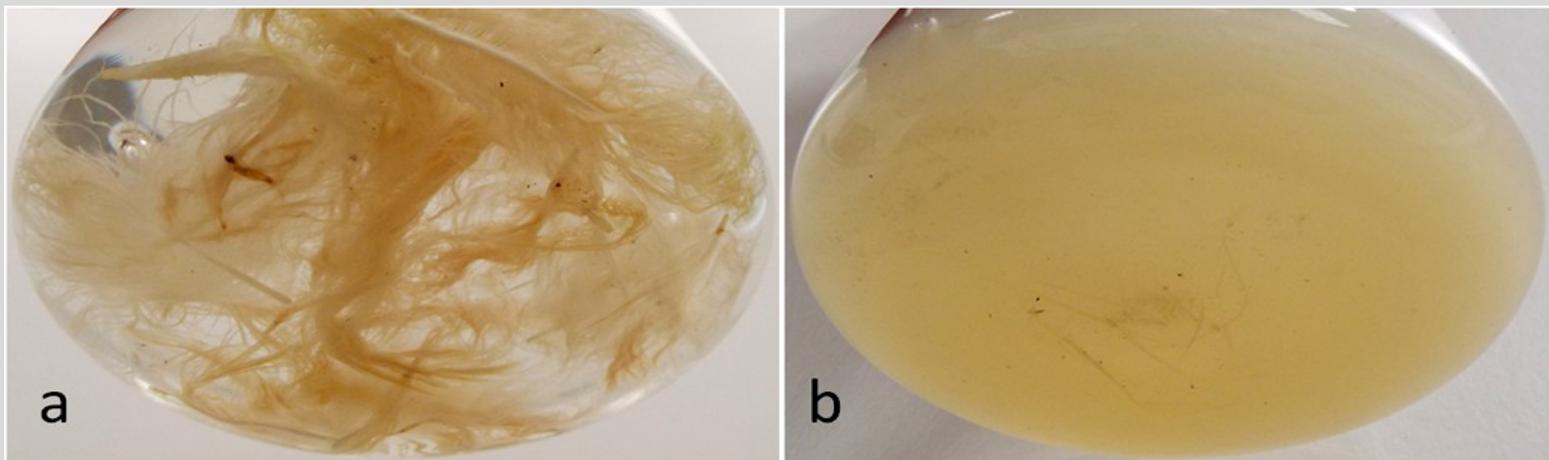
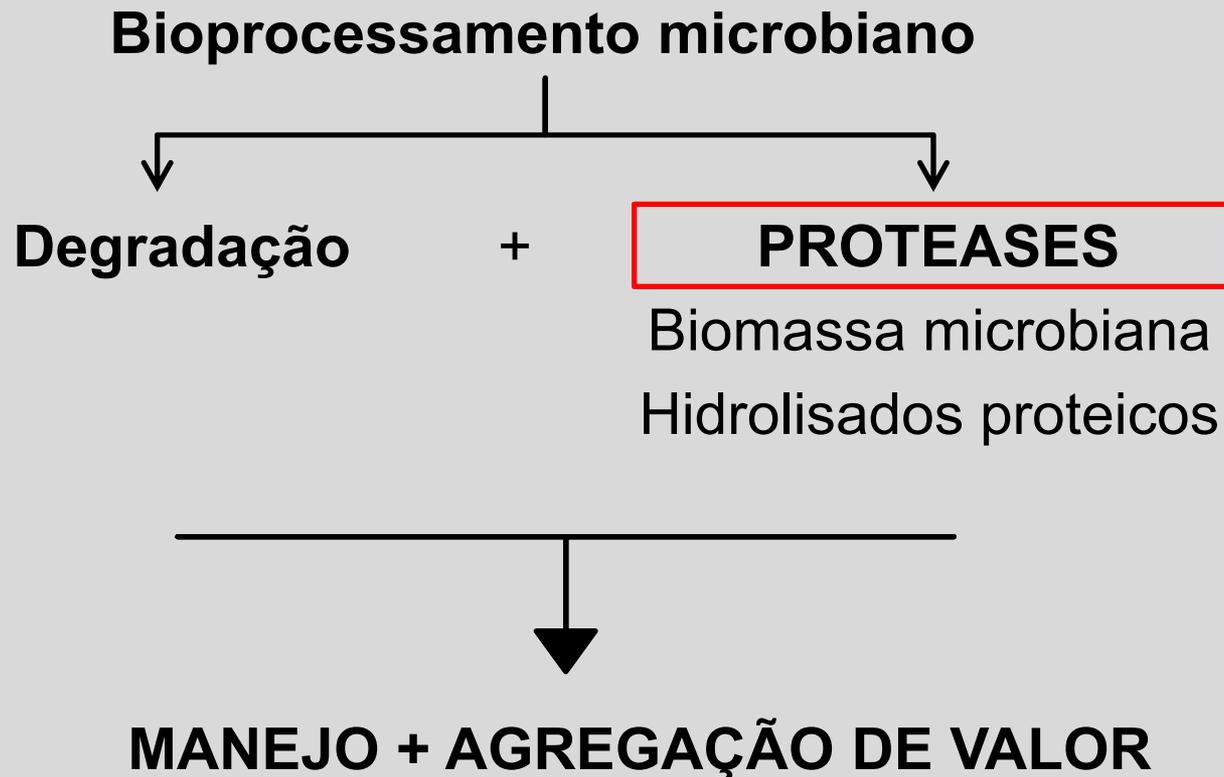


Fig. 9. Cultivos submersos (30 °C, 125 rpm, 5 dias) de *Bacillus* sp. CL18 realizados em meio contendo penas inteiras (10 g/L).

a: controle, não inoculado; **b:** inoculado.

- Foco biotecnológico

* Penas de frango como **matéria-prima/substratos**



- Referências consultadas

- Adiguzel AC, et al. (2009). Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **J Appl Microbiol** 107, 226-234.
- Brandelli A. (2008). Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. **Food Bioprocess Technol** 1, 105-116.
- Brandelli A, et al. (2010). Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 85, 1735-1750.
- Daroit, DJ, Brandelli, A. (2014). A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Crit Rev Biotechnol** 34, 372-384.
- Fakhfakh-Zouari N, et al. (2010). Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochem** 45, 617-626.
- Gupta R, Ramnani P. (2006). Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Appl Microbiol Biotechnol** 70, 21-33.
- Gupta R, et al. (2012). Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. **Crit Rev Biotechnol** 33, 216-228.
- Jeong JH, et al. (2010). Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. **Process Biochem** 45, 1738-1745.

Kasana RC, et al. (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. **Crit Rev Microbiol**, 37, 262-276.

Kornilłowicz-Kowalska T, Bohacz J. (2011). Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. **Waste Manage** 31, 1689-1701.

Lange L, et al. (2016). Microbial decomposition of keratin in nature – a new hypothesis of industrial relevance. **Appl Microbiol Biotechnol**, 100, 2083-2096.

Lasekan A, et al. (2013). Potential of chicken byproducts as sources of useful biological resources. **Waste Manage** 33, 552-565.

Parrado J, et al. (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. **Enzyme Microb Technol** 57, 1-7.

Sangali, S., Brandelli, A. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. (2000). **J Appl Microbiol** 89, 735-743.

Wang B, et al. (2016). Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Prog Mater Sci** 76, 229-318.

Yang L, et al. (2016). Construction of a rapid feather-degrading bacterium by overexpression of a highly efficient alkaline keratinase in its parent strain *Bacillus amyloliquefaciens* K11. **J Agric Food Chem** 64, 78-84.

- Agradecimentos

- Coordenação e Comissão Organizadora – ENZITEC 2016
- UFFS – *Campus Cerro Largo/RS*
- FAPERGS