

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTÉICOS DE PENAS DE
FRANGO UTILIZANDO BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS

JAQUELINE LESSA MACIEL

PORTO ALEGRE
2005

PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS PROTEICOS DE PENAS DE
FRANGO UTILIZANDO BACTÉRIAS QUERATINOLÍTICAS

JAQUELINE LESSA MACIEL

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

PORTO ALEGRE
2005

DEDICATÓRIA

Aos amores da minha vida, meu filho *Gerson* e meu marido *Celito*, por serem o norte e toda a razão para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adriano Brandelli, pela confiança, amizade e pela orientação deste trabalho;

Aos colegas de laboratório Adriane, Alessandro, Amanda, Delmar, Florência, Luiz Fernando, Mercedes, Roberta e Roberval, que de tantas formas me auxiliaram na realização deste trabalho;

À bolsista Patrícia Werlang, pela dedicação, doação, pela ajuda imprescindível e pela eterna amizade;

Aos colegas de trabalho da SMAM, pela solidariedade e compreensão, em especial Beatriz Tabajara, pela importante colaboração;

À grande amiga Rosangela Piccinini pela força insuperável, durante este período tão importante;

Aos meus pais Carlos Afonso e Nanci, e aos meus irmãos, Maurício e Fernanda, pela presença e apoio em momentos importantes;

Ao curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

" Não sei...se a vida é curta ou longa demais para nós. Mas sei que nada na vida tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo. É o que dá sentido a vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira e pura... enquanto durar".

Cora Coralina.

RESUMO

Com o crescimento populacional, a indústria avícola tem se desenvolvido rapidamente, devido à demanda de alimentos. O seu produto possui grande aceitação no mercado mundial, em função do seu valor nutricional e por não existirem restrições culturais. Entretanto, este alimento gera grande quantidade de resíduos, dentre eles, as penas. Elas são compostas principalmente por queratina, substância de difícil degradação. Neste trabalho foram utilizadas duas bactérias queratinolíticas de resíduos da indústria avícola, para se avaliar a capacidade de degradação das mesmas. Foram produzidos hidrolisados de penas por proteólise bacteriana com ambos microrganismos: *Bacillus cereus* (KR16) e *Chryseobacterium sp.* (KR6). O crescimento das bactérias em diferentes quantidades de penas, e o fator de degradação das penas comprovaram que em até 5 % obteve-se degradação para KR6, enquanto, para a KR16, obteve-se degradação até 1%. A digestibilidade *in vitro* dos hidrolisados foi avaliada. Observou-se que o hidrolisado da bactéria KR6 apresentou maior digestibilidade, enquanto o de farinha de penas apresentou o menor valor. A composição de aminoácidos dos hidrolisados foi determinada, sendo observadas baixas concentrações de metionina, histidina e lisina. A partir da digestibilidade *in vitro* e da composição de aminoácidos, foram calculados o escore de aminoácidos corrigidos (PDCAAs), o coeficiente de eficiência protéica (PER) e o valor biológico (BV). O tratamento das penas com KR6 resultou em hidrolisados com os valores mais altos de PDCAAs, PER e BV, sugerindo que este microrganismo produz

hidrolisados com propriedades nutricionais superiores aos demais.

Palavras Chave: Bactérias queratinolíticas, Penas, Hidrolisados, digestibilidade.

ABSTRACT

The population increase promoted the increase in food demand, resulting in a very quickly poultry industry to development. Poultry meat is largely accepted in the world market because its nutritional value as well as the lack of cultural restriction. Nevertheless, this kind of food produces a great amount of residues, the feathers, which are essentially composed of keratin, a substance of difficult degradation. In this study two keratinolytic bacteria of poultry industry residues, were used in order to estimate their degradation capacity. Hydrolysed feathers were produced by bacterial proteolysis with both microorganisms: *Bacillus cereus* (KR16) and *Chryseobacterium* sp. (KR6). The development of bacteria in different feather amounts and the feather degradation factor confirmed that up to 5% degradation was obtained to KR6 and 1% to KR16. The digestibility in vitro, of hydrolysates was valued. The hydrolysed of the bacterium KR6 presented greater digestibility whereas feather meal presented the lowest value. The amino acid composition of the hydrolysates was determined, and presented low concentration of methionine, histidine and lysine. In the digestibility in vitro, and the composition of the amino acids, was calculated the corrected aminoacids scoring (PDCAAs), the protein efficiency ratio (PER) and the biologic Value (BV). The feathers treated with KR6 resulted in hydrolysates with the highest values for PDCAAs, PER an BV, Suggesting that this microorganism produces hydrolysates with greater nutritional properties in relation to the others.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT | vii |
| SUMÁRIO..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | xii |
| I – INTRODUÇÃO | 13 |
| II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| II.1. Aspectos Ambientais..... | 15 |
| II.2. Importância das Proteínas | 16 |
| II.3. Queratina | 17 |
| II.4. Valor Nutricional da Farinha de Penas | 18 |
| II.5. Possibilidades do Uso do Hidrolisado das Penas..... | 21 |
| III – MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| III.1. Penas de Frango..... | 24 |
| III.2. Farinha de Penas | 24 |
| III.3. Meios de Cultivo e Diluente..... | 25 |
| III.4. Microrganismos | 25 |
| III.5. Determinação do Número de Células Viáveis | 25 |
| III.6. Preparação do Pré-inóculo..... | 26 |
| III.7. Condições de Crescimento e Degradação das Penas | 26 |
| III.8. Obtenção dos Hidrolisados | 26 |
| III.9. Análise da Concentração da Proteína Solúvel..... | 27 |
| III.10. Análise da Composição de Aminoácidos..... | 27 |
| III.11. Digestibilidade <i>in vitro</i> | 28 |
| III.12. Predição de Parâmetros Nutricionais..... | 29 |
| III.12. a. Coeficiente de Eficiência Protéica (PER)..... | 29 |
| III.12. b. Escore de Aminoácidos Corrigidos (PDCAAS)..... | 29 |
| III.12. c. Valor Biológico (BV)..... | 29 |
| III.13. Tratamento Estatístico | 30 |
| IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| IV.1. Microrganismo | 31 |
| IV.2. Crescimento do Microrganismo em Diferentes Quantidades de Penas | 32 |
| IV.3. Fator de Degradação das Penas | 34 |
| IV.4. Digestibilidade <i>in vitro</i> | 36 |
| IV.5. Aminograma..... | 37 |
| IV.6. Escore de Aminoácidos Corrigidos (PDCAAs)..... | 39 |
| IV.7. Coeficiente de Eficiência Protéica (PER)..... | 45 |
| IV.8. Valor Biológico (BV) | 46 |
| IV.9. Tratamento Estatístico | 47 |
| IV.9.1. Correlação Linear Simples | 47 |

| | |
|---|-----------|
| V –CONCLUSÃO | 49 |
| VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |
| ANEXOS..... | 57 |
| Anexo 1 | 57 |
| Anexo 2 | 58 |
| Anexo 3 | 59 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Degradação de penas de frango pelo microrganismo KR6 após incubação a 30°C por 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) e 96 h (E) | 31 |
| Figura 2: Crescimento do microrganismo KR16 em caldo pena 1%. | 33 |
| Figura 3: Crescimento do microrganismo KR6 em caldo pena 5%.. | 33 |
| Figura 4: Valor de degradação das penas com diferentes concentrações de meios de culturas – Bactéria KR6..... | 34 |
| Figura 5: Valor de degradação das penas com diferentes concentrações de meios de culturas – Bactéria KR16..... | 35 |
| Figura 6: Valor biológico dos hidrolisados de penas | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Digestibilidade <i>in Vitro</i> das diferentes fontes protéicas..... | 36 |
| Tabela 2: Composição de aminoácidos dos hidrolisados | 38 |
| Tabela 3: Cálculo PDCAAS do hidrolisado KR6 | 41 |
| Tabela 4: Cálculo PDCAAS do hidrolisado KR16 | 42 |
| Tabela 5: Cálculo PDCAAS do hidrolisado do filtrado da KR6 | 43 |
| Tabela 6: Cálculo PDCAAS do hidrolisado da farinha de pena | 44 |
| Tabela 7: Valor do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER)..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA: Aminoácidos

AL: Agar Leite

CP: Caldo Pena

HP: Hidrolisado de Penas

PBS: Tampão Fosfato Salino

PDCAAs: Escore de aminoácidos corrigidos pela digestibilidade protéica

PER: Coeficiente de Eficiência Protéica

PTN: Proteína

BV: Valor Biológico

I. INTRODUÇÃO

O ser humano durante a sua trajetória histórica, estabeleceu a ocupação e o uso espacial da terra, utilizando os recursos naturais renováveis e não renováveis, basicamente interessado na sua própria sobrevivência. Ao longo dos tempos, passou a adotar um comportamento predatório em relação à natureza, legando-nos o mundo em que vivemos hoje, com sérios problemas ambientais. O desenvolvimento sustentável torna-se inviável se for permitido que a degradação ambiental continue. Com isto está havendo crescente interesse por parte de indústrias na utilização de materiais até então descartados para que a qualidade ambiental seja preservada e até mesmo melhorada.

Com o crescimento populacional e, conseqüentemente, devido à crescente demanda por alimentos, a indústria avícola tem se desenvolvido rapidamente. A carne de frango possui grande aceitação no mercado mundial, em função do seu valor nutricional e por não existirem restrições culturais. O Brasil é o segundo maior exportador mundial de frango, com cerca de 14% da produção mundial, abatendo mais de 1500 milhões de aves. Entretanto, este alimento gera grande quantidade de resíduos recalcitrantes, que são as penas. Este subproduto representa 5-7% do peso total das aves, sendo formadas principalmente por queratina, provavelmente constituindo a mais abundante fonte desta proteína na natureza.

A queratina é constituída de muitos aminoácidos, especialmente o aminoácido sulfurado cisteína. Entretanto, as pontes dissulfeto da cistina conferem a esta proteína, alta insolubilidade e baixa digestibilidade. Este efeito ocasiona um subproduto de difícil degradação e, conseqüentemente, quando desprezadas no meio ambiente tornam-se potenciais poluentes.

Existem processos que utilizam as penas de frango como suplemento alimentar em rações animais. Para isto, elas recebem tratamento por cocção e moagem, ou tratamento químico, para produção da farinha de pena. No entanto, estes processos destroem certos aminoácidos termossensíveis, gerando um produto de baixo valor nutricional e, além disso, de baixa

digestibilidade. Muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, visando obter microrganismos produtores de queratinases capazes de degradar as penas das aves.

Neste trabalho foram utilizadas duas bactérias queratinolíticas isoladas de resíduos da indústria avícola e previamente caracterizadas como capazes de degradar completamente penas de frango. Estes microrganismos apresentam forte caráter proteolítico, demonstrando grande potencial para uso em processos de biodigestibilidade das penas. Com isso, nosso objetivo foi comparar as bactérias KR6 e KR16, quanto ao seu poder queratinolítico e sua capacidade de produzir hidrolisados de penas de frango.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. ASPECTOS AMBIENTAIS

Pode-se considerar que o surgimento e a evolução do pensamento ambiental estão diretamente associados ao desenvolvimento das ciências, ocorrido ao longo da história da civilização, assim como as degradações e alterações ambientais processadas no planeta Terra. Esses efeitos surgiram em países diferentes e em épocas diferentes. Foram se formando e sendo construídos na medida em que várias correntes do pensamento científico iam surgindo e amadurecendo, juntamente com o aparecimento de problemas ambientais que envolviam a opinião pública (Leite *et al.*, 2000).

Considera-se, então, que os problemas ambientais só começaram a ser identificados como impactantes a partir de dois fatos básicos: a revolução industrial e a organização urbana. A primeira, ocorrida a partir do século XVIII, pela passagem do artesanato e da manufatura, que ocasionou grande mudança no processo de produção e a segunda representada pelas construções das grandes cidades, sendo a maior parte realizada sem planejamento (Boff, 2004; Leite *et al.*, 2000).

Os custos de produção em qualquer processo devem contabilizar a degradação ambiental. O desenvolvimento econômico e os cuidados com o meio ambiente são compatíveis, interdependentes e necessários. A alta produtividade, a tecnologia moderna e o desenvolvimento econômico podem e devem coexistir com o meio ambiente saudável (Dias, 1991). Tecnologias, instituições e até mesmo sistemas de valores estão se alterando rapidamente em consonância com a atenção ao meio ambiente (Torres, 2003).

Estima-se que os resíduos agrícolas, produzidos anualmente no mundo, ultrapasse 2.100 milhões de toneladas. Este material é particularmente abundante em muitos países em desenvolvimento, sendo que, atualmente, muitos tratamentos

físicos e químicos, têm sido utilizados para destinar parte deste material para alimentação animal (Ryu, 1998).

O grande aumento na produção animal vem gerando um problema significativo de manuseio de resíduos, incluindo excrementos, animais mortos, pêlos, penas, entre outros. Somente nos Estados Unidos são produzidos anualmente entre 100 e 120 milhões de toneladas de excrementos, além de um milhão de toneladas de penas e um milhão de toneladas de pêlos (Shih, 1993). O desenvolvimento de processos eficientes e economicamente viáveis, para gerenciamento destes resíduos, torna-se um importante desafio, permitindo que a ampliação da agroindústria atenda adequadamente ao aspecto ambiental.

II.2. IMPORTÂNCIA DAS PROTEÍNAS

As proteínas são essenciais em todos os processos biológicos, sendo indispensáveis a qualquer ser vivo. Além de participarem como catalisadores biológicos, as proteínas são intermediárias de ampla faixa de outras funções como, transporte e armazenamento, movimentos coordenados, sustentação mecânica, proteção imunitária, excitabilidade, integração do metabolismo e controle do crescimento e da diferenciação (Stryer, 1992).

As unidades estruturais básicas das proteínas são os aminoácidos. Todas as proteínas em todas as espécies, desde microrganismos até seres humanos, são compostas a partir do mesmo conjunto de 20 aminoácidos. As cadeias laterais desses elementos de construção diferem em tamanho, forma, carga, capacidade de formação de pontes de hidrogênio e reatividade química (Voet, *et al.*, 1999).

Os vegetais sintetizam as proteínas necessárias para sua sobrevivência, através do nitrogênio captado do solo, já os animais conseguem pela alimentação, através da ingestão de proteína animal ou vegetal. Muitos aminoácidos são sintetizados pelo próprio organismo, entretanto alguns deles devem ser obtidos através da alimentação (Mahan & Escott-Stump, 1998). Todos os organismos vivos que não produzem ou sintetizam o seu próprio alimento, necessitam de proteínas para sua sobrevivência. A ausência de aminoácidos essenciais na alimentação implica em perda de peso e retardo no crescimento, podendo ainda causar doenças crônicas sérias ao ser vivo (Voet, *et al.*, 1999).

Desta forma, pode-se verificar a importância de conhecer o valor nutricional das rações que são fornecidas aos animais. Estes alimentos possuem a informação descrita dos níveis de proteína,

apresentadas na maioria das vezes através de percentuais da dieta ou relativos a uma quantidade de peso da amostra. Entretanto, são freqüentes as dúvidas no real significado de cada valor apresentado e qual seria a relação direta e indireta de cada componente desta dieta para então trazer benefícios às aves.

II.3. QUERATINA

As queratinas são proteínas fibrosas e insolúveis encontrada em vertebrados superiores (principalmente em peles, pêlos, unhas, cascos, escamas, e penas) com a função principal de dar estrutura e proteção aos organismos (Bradbury, 1973).

As penas são compostas de pelo menos 90% de proteínas, sendo a maioria queratina, que não é facilmente digerida por animais (Fuller, 1984). As queratinas possuem alta resistência mecânica à digestão proteolítica, em consequência do firme empacotamento da cadeia protéica em α -hélice (α -queratina), estrutura β -pregueada (β -queratina) e o super enrolamento da cadeia polipeptídica. As queratinas possuem alto índice de ligações intercadeias, consequência da formação de grande quantidade de pontes dissulfeto que é facilitada pelo conteúdo de cisteína. Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas também conferem força, estabilidade e resistência proteolítica à queratina (Onifade, 1998).

As queratinas podem ser classificadas como “leves” ou “rígidas” conforme suas propriedades físico-químicas, principalmente seu conteúdo de cistina. As queratinas “rígidas” são ricas em cistina, contendo muitas ligações dissulfeto, além da maioria dos aminoácidos em sua composição. Nesta classe de queratinas estão incluídos os pelos e penas, com cerca de 10 a 14% de cistina. As queratinas “leves”, como as que estão presentes na pele, apresentam baixo conteúdo de cistina e, em sua composição, principalmente aminoácidos com cadeias laterais pequenas como glicina, alanina e serina (Hood & Healy, 1994).

II.4. VALOR NUTRICIONAL DA FARINHA DE PENA

As penas de aves, o principal resíduo da indústria avícola, são compostas por cerca de 90% de queratina. A utilização convencional para este resíduo é a conversão em farinha de pena. Apesar da alta estabilidade da queratina, a farinha de pena pode ser usada como fonte de proteínas, quando corretamente processada, podendo ser adicionada em ração para animais (Steiner, *et al.*, 1983). Os métodos tradicionais de processamento fervem as penas a altas pressões, hidrolisando parcialmente as proteínas, desnaturando-as e destruindo algumas ligações químicas que conferem a rigidez às mesmas (Fuller, 1984).

Embora a queratina seja indigesta, se previamente hidrolisada, a fração protéica remanescente é mais suscetível às enzimas proteolíticas digestivas. Portanto, a resistência às enzimas proteolíticas comuns, pode ser parcialmente contornada pelo tratamento térmico, desnaturando a queratina, com isso passando a ter digestibilidade de 60 – 70% (Elmayergi & Smith, 1971). Entretanto, o tratamento térmico resulta em perdas significativas de alguns aminoácidos (Wang & Parson, 1997).

Diversos autores têm descrito seus trabalhos avaliando qual o valor nutricional da farinha de penas. Em trabalho realizado por Klemesrud *et al.* (1998), foi avaliado a farinha de penas e farinha de sub produtos de frango como fonte complementar de proteínas para bezerros. Para formular as rações, foram utilizados como fonte protéica, uréia, farinha de soja, farinha de penas, farinha de sub produtos de frango. Sugeriu-se que a farinha de penas e de sub produtos de frango são adequadas para utilização como fonte de proteína metabolizável para ruminantes.

Outros autores também relataram que a farinha de pena pode ser usada como alternativa alimentar para suplementação de ração animal. A sua utilização é limitada devido à deficiência dos aminoácidos essenciais, triptofano, metionina e histidina (Liu, *et al.*, 1989; Luong & Payne, 1977). Portanto, a farinha de pena, quando utilizada como única fonte de proteína da ração, não pode sustentar o ganho de peso no crescimento de frangos. A suplementação da farinha de pena com os aminoácidos essenciais em que é deficiente aumenta a razão de ganho, mas não aumenta a utilização líquida da proteína (Summers, *et al.*, 1965). Isto foi estudado por Luong & Payne (1977) que utilizaram hidrolisado de farinha de penas como fonte de aminoácidos em ração para aves, sendo constatada a redução diária na produção de ovos em aproximadamente 10%. Com a suplementação de metionina na ração a redução da produção de ovos foi recuperada em 50%, demonstrando a carência deste aminoácido na farinha de penas.

Para comparar a digestibilidade entre farinha de soja, farinha de sangue, farinha de milho com glúten e hidrolisado de farinha de penas, como fonte de proteína em ração para ruminantes, Goedecken, *et al.* (1990) realizaram o seguinte estudo. Foram colocadas intraruminalmente, por 12 horas, cada fonte protéica, em sacos específicos, com poros de 50 microns. Depois deste período, os sacos foram retirados e lavados para a determinação N total. Os dados de degradação protéica obtidos foram 73,4; 17,2; 19,6 e 30,9 ($\pm 2,8$) para farinha de soja, farinha de sangue, farinha de milho com glúten e hidrolisado de farinha de pena, respectivamente, mostrando que a degradação da hidrolisado de farinha de pena foi inferior apenas à farinha de soja. Estes achados demonstraram que o hidrolisado da farinha de penas pode ser utilizado em ração para ruminantes.

Em outro estudo comparativo, Bureau, *et al.* (2000) utilizaram farinha de penas, farinha de sangue, farinha de milho e farinha de peixe como fonte protéica para o crescimento de peixes. Os resultados demonstraram que com incorporação de até 15% de farinha de penas na dieta é possível

umentar a eficiência alimentar e o ganho energético dos peixes, sem afetar o crescimento dos mesmos.

Elmayergi & Smith, (1971) analisaram o teor de aminoácidos do produto obtido pela fermentação de farinha de pena, por ação do microrganismo *Streptomyces fradiae* e compararam com o requerimento de aminoácidos em ração para frangos. Foi observado que o produto é deficiente em metionina, lisina e tirosina, sendo a metionina o mais limitante, com 0,4%, enquanto o necessário para composição de ração para frangos, é de 2,5%.

O valor nutricional da farinha de pena hidrolisada, como fonte de aminoácidos para suínos, foi avaliado por Chiba *et al.* (1996). As dietas foram formuladas com farinha de soja adicionada de 0, 30, 60, 90, e 120 g de farinha de pena hidrolisada por kg de ração. Como alimentação padrão, foi utilizada a farinha de soja sem suplementação. Os resultados encontrados indicaram que é possível o uso de até 90 g de farinha de pena hidrolisada, incorporada à ração, sem interferir na qualidade da carcaça. Com a utilização da farinha de penas suplementada com lisina como única fonte de proteína da dieta, não houve redução da qualidade da carcaça, porém ocorreu redução no ganho de peso. Normalmente, a farinha de penas não é usada em ração para suínos devido a deficiência deste aminoácido.

Comercialmente, os processos de hidrólise de farinha de pena utilizam álcali ou ácido, entretanto, estes processos provocam a destruição de alguns aminoácidos, acarretando a redução do valor nutricional da proteína encontrada na pena de frango. Steiner, *et al.* (1983), trataram pena de frango com diferentes concentrações de NaOH e H₃PO₄ e processaram em autoclave. Estes autores verificaram que existe interação entre a concentração dos produtos químicos e o tempo de processamento. A concentração de proteína bruta diminui com o aumento da concentração do ácido ou do álcali, porém não é afetada no tempo de processamento.

Em outro estudo, foi verificada a influência do tempo ou de processamento em autoclave para obtenção do hidrolisado de farinha de pena. Neste trabalho, analisou-se a composição de aminoácidos da pena bruta, e após o tratamento térmico. Os resultados mostraram que a principal alteração ocorreu na redução do conteúdo de cistina, que por ser termosensível foi influenciada pelas condições de processamento. Os aminoácidos essenciais, valina, leucina, tirosina e fenilalanina demonstraram serem mais estáveis ao tratamento térmico, concluindo que não existe uma condição ótima para o processamento deste material (Papadopoulus, 1986).

Certos microrganismos agem sobre a estrutura da queratina da pena, resultando em modificação estrutural da mesma, alterando sua resistência às enzimas do trato digestivo. Desta forma, a digestibilidade e o balanço de aminoácidos da farinha de penas podem ser grandemente melhorados (Elmayergi & Smith, 1971).

II.5. POSSIBILIDADES DO USO DO HIDROLISADO DAS PENAS

As penas constituem a mais abundante fonte de queratina encontrada na natureza. Elas acumulam-se principalmente após o processamento de aves domésticas, utilizadas para consumo humano como alimento, representando um potencial poluente ambiental. Esses resíduos possuem grande quantidade de proteínas e aminoácidos que poderiam ser utilizados benéficamente, como suplemento alimentar para animais, mostrando-se como alternativa para a reciclagem desse resíduo. No entanto existem limitações para esta utilização, que são principalmente a baixa digestibilidade, baixo valor biológico, e a deficiência de aminoácidos nutricionalmente essenciais, como metionina, lisina, histidina e triptofano. O conteúdo e as concentrações dos aminoácidos das penas são altamente variáveis. Metionina, lisina e histidina têm seu conteúdo diminuído com o aumento da idade de frangos, enquanto a concentração de aminoácidos não essenciais, aumenta com a idade (Papadapoulus, 1986; Dalev, 1997).

O tipo de processamento da pena de frango têm sido relatado como um dos fatores primários que influenciam na qualidade protéica da farinha de pena (Wang & Parson, 1997). Normalmente, a farinha de pena é utilizada em quantidade limitada como suplementação proteica em ração animal. Para aumentar sua utilização, a pena é processada com calor úmido e pressão, ou quimicamente, para aumentar a digestibilidade. Estes processos de tratamento requerem quantidades significativas de energia e destroem certos aminoácidos. A biodegradação das penas, por microrganismos que possuem atividade queratinolítica, representam um método alternativo para melhorar o valor nutritivo (Williams, *et al.*, 1990; Kim, *et al.*, 2001; Odetallah *et al.*, 2003).

As proteases específicas, elaboradas intracelularmente ou extracelularmente por microrganismos que degradam queratina, são chamadas de queratinases. Estas enzimas têm a capacidade de agir em substratos compactados, melhor que outras enzimas proteolíticas. Isto diferencia as queratinases de outras proteases e peptidases (Onifade, *et al.*, 1998).

Alguns pesquisadores estudaram as quantidades de aminoácidos, do sobrenadante de meios de cultura, com microorganismos que degradam penas, em condições aeróbia e anaeróbia. Eles observaram que na ausência de oxigênio, a concentração de aminoácidos livres é superior às condições aeróbias. Isoleucina, leucina, valina, fenilalanina e tirosina foram os aminoácidos encontrados em níveis mais elevados. Prolina e triptofano não foram detectados e histidina e metionina foram encontrados em pequenas quantidades (Williams & Shih, 1989).

Woodgate (1993) constatou que 50 % dos aminoácidos podem ser perdidos com o processamento térmico utilizado atualmente. Ele desenvolveu um estudo a partir do uso conjunto do

processo térmico com o enzimático, com o objetivo de hidrolisar penas. O processamento das penas se deu em 2 fases, utilizando tempos e temperaturas diferente, com ou sem tratamento enzimático, sendo os tratamentos analisados pelo ensaio de digestibilidade *in vitro* por pepsina. Os resultados indicaram que a amostra tratada inicialmente com enzima, após submetida ao aumento de temperatura, mostrou ser o tratamento mais eficiente, em termos de digestibilidade.

Outro estudo realizado por Schasteen (1997) comprovou que a adição da queratinase, na farinha de penas, melhorou o desempenho nos experimentos de alimentação de aves com ração contendo suplementação com este produto. Foi demonstrado o aumento no ganho cumulativo e na conversão alimentar, em comparação com o grupo controle em cuja dieta não foi adicionada a enzima.

A avaliação de um hidrolisado enzimático de penas de frango com o microrganismo *Vibrio* sp. kr2 revelou que o produto possui digestibilidade *in vitro* superior a farinha de penas. O hidrolisado foi testado em um ensaio biológico onde foi constatado que, quando combinado com concentrado de soja na proporção de 20:80 (w/w) o ganho de peso é superior ao obtido com o concentrado de soja como única fonte protéica (Grazziotin, 2002).

Além disso, as penas contêm cerca de 15% de N, possuindo desta forma grande potencial para serem utilizadas como fertilizantes de liberação lenta de N. Entretanto a pena bruta apresenta uma taxa de mineralização muito lenta, e a farinha de pena apresenta liberação total do N em 6-7 semanas (Hadas & Kautsky 1994). Hidrolisados parciais de penas têm sido testados em formulações para fertilizantes. O tratamento de penas de frango com *Streptomyces* sp. e posterior utilização do hidrolisado em adubação demonstrou que este material apresenta características compatíveis para uso como fertilizante. O uso de microrganismos queratinolíticos para modificação da queratina das penas representa uma alternativa para o desenvolvimento de fertilizantes e utilização deste subproduto (Choi & Nelson, 1996).

As penas constituem-se de material fibroso, rígido e insolúvel, conferindo a funcionalidade de cobertura protetora, indicando que suas proteínas constituintes possuem potencial para aplicações onde estas propriedades são desejadas. Observa-se interesse crescente no uso de proteínas como fonte renovável para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis, como por exemplo, aplicações em embalagem para adubos ou filmes comestíveis (Kester & Fennema, 1986; Yamauchi, *et al.*, 1996). Entretanto, pouca atenção tem sido dada à queratina. Assim, o desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de queratina representa uma importante alternativa para a utilização das penas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. PENAS DE FRANGO

As penas de frango utilizadas como componente do meio de cultura foram fornecidas pela empresa Avipal (Porto Alegre, Brasil) disponíveis em lotes de 2 kg. Estas foram lavadas em água corrente, e a retirada de impurezas como unhas, sangue e pedaços de pele foi realizada manualmente. Este material foi seco em estufa sob temperatura de 45°C e após mantido congelado sob temperatura de -20°C até posterior utilização.

III.2. FARINHA DE PENAS

A farinha de pena utilizada como substrato para ensaios enzimáticos e componentes de meios de cultura e ensaio biológico foi obtida a partir do processamento de cocção sob pressão e moagem da empresa Bunge (Esteio, Brasil) e fornecida em amostras de 1 Kg.

A farinha de pena foi triturada em moinho para obtenção de granulometria homogênea. Em seguida, tratada com éter de petróleo, à temperatura ambiente por 24 horas, na proporção de 100 g de farinha de penas para cada litro de solvente, para a remoção de gordura. Este material foi então filtrado em papel filtro comum e lavado com água destilada, sendo após seco à temperatura ambiente em capela de exaustão.

III.3. MEIOS DE CULTIVO E DILUENTE

Os meios de cultivo e os diluentes que foram utilizados no experimento, caldo pena (CP), ágar leite (AL) e tampão fosfato salino (PBS), tem sua composição descrita nos anexos 1,2 e 3, respectivamente.

III.4. MICRORGANISMOS

Os microrganismos estudados para a produção dos hidrolisados de penas foram *Chryseobacterium* sp. KR6 e *Bacillus cereus* KR16. Estas linhagens foram isoladas e caracterizadas por Riffel et al. (2003) e Werlang & Brandelli (2005), respectivamente, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Durante a realização do experimento as linhagens foram mantidas em ágar leite sob refrigeração. As culturas foram armazenadas à temperatura de 4°C, em placas de ágar leite, sendo semeadas a cada 10 dias, em frascos contendo 100 mL de caldo pena e mantidas a 4°C, sendo realizado um novo inóculo a cada 30 dias.

III.5. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

A contagem do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) em meio sólido foi realizada conforme descrito por Grazziotin (2002). A suspensão bacteriana foi preparada em PBS e diluída 10^{-1} a 10^{-8} em tubos de ensaio. As amostras foram homogeneizadas em vortex marca Biomatic, tipo 1005 e aplicadas em três repetições de 20 µL por quadrante de placa de ágar leite. Este procedimento, foi realizado em capela de fluxo vertical, marca Pachane, modelo PA – 115. As placas foram incubadas por 72 horas à 30°C em estufa incubadora, marca De Leo. A contagem foi efetuada na diluição onde as colônias estivessem isoladas, e entre um mínimo de 30 e um máximo de 300 colônias. Para esta contagem foi utilizado contador de colônias, marca N. Gerber, tipo 1147 02. Os resultados foram expressos em log U.F.C./mL.

III.6. PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO

As colônias das linhagens queratinolíticas utilizadas, estocadas em ágar leite, foram coletadas por raspagem de placas e transferidas para o meio caldo pena. A cultura foi incubada por 48 horas a 30°C e 120 rpm em equipamento incubador com agitação marca Nova Técnica, modelo NT 713.

III.7. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E DEGRADAÇÃO DAS PENAS

Foram realizados cultivos com diferentes concentrações de penas (1, 2 e 5%), por 5 dias com agitação de 120 rpm a 30°C para o microrganismo KR6, e 37°C para o microrganismo KR16. Em intervalos de 24 h foram retiradas alíquotas para determinação do número de células viáveis (UFC/mL) e da concentração de proteína solúvel (item III.9).

Após o cultivo, o material foi filtrado e os resíduos de penas não degradados foram lavados com água destilada, secos em estufa e pesados. O fator de degradação foi calculado como:

$$Fd = (\text{Massa de penas inicial} - \text{massa de penas final}) / \text{massa de penas inicial}$$

III.8. OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS

Os hidrolisados de penas foram produzidos pela adição de 5 mL do pré-inóculo em 250 mL de caldo pena contendo 5% de penas para o microrganismo KR6 e 1% para o microrganismo KR16.

Os frascos foram incubados à 30°C por 5 dias sob agitação de 120 rpm. Após a incubação, o material foi autoclavado por 20 min. e filtrado. O material retido foi seco na estufa a 37°C por 24h (hidrolisados HKR6 e HKR16). O filtrado foi concentrado à pressão reduzida e seco em estufa a vácuo por 24 h a 45°C (Hidrolisado FHKR6).

Após produzir a quantidade necessária, o produto de diferentes cultivos foi misturado e homogeneizado para as análises.

III.9. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA SOLÚVEL

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry *et al.* (1951) com o emprego do reagente de Folin – Ciocalteu.

Foram utilizados o reagente combinado (RC), preparado com 0,5 mL de solução 0,5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ adicionado de 0,5 mL de solução 1% de tartarato de sódio e potássio; completou-se o volume de 50 mL com solução de NaCO_3 2% em NaOH 0,1N. O reagente de Follin-Ciocalteu (FC) foi diluído (1:1; v/v) com água destilada.

Para a reação, misturou-se 100 μL de amostra e adicionou-se 2,5 mL de RC, deixou-se 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 300 μL do reagente de FC diluído e deixou-se à temperatura ambiente por mais 40 minutos.

As determinações de proteína solúvel para cada amostra foram realizadas em triplicata e foi medida a absorbância (540nm) em espectrofotômetro Hitachi modelo U-1100 (Toquio, Japão). Paralelamente foi preparado um branco com 100 μL de água destilada e adicionado os demais reagentes. A curva padrão foi preparada com albumina sérica bovina (Sigma, USA).

III.10. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos dos hidrolisados de penas e da farinha de penas foi determinada utilizando um Sequential Multi-Sample Amino Acid Analyser (TM S2, Technicon, USA). Os aminoácidos foram obtidos após digestão dos peptídeos com ácido clorídrico 6 mol/L em tubos vedados incubados a 110°C por 24 h. Os aminoácidos foram purificados por cromatografia com Amberlite IR-120 previamente à análise.

III.11. DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Foi avaliada a digestibilidade *in vitro* da farinha de pena, proteína de soja, caseína e dos hidrolisados de pena utilizados, através do método descrito por Ikeda *et al.* (1995), com algumas modificações. Em frasco de 50 mL, adicionou-se 0,25g do substrato e 7,5 mL de solução de pepsina (0,3 mg/mL em HCl 0,1 N) seguido a incubação das amostras por 3 horas a 37°C. Após, neutralizaram-se as amostras com 7,5 mL de NaOH 0,2 M e adicionou-se 3,75 mL de solução de pancreatina (2,2 mg/mL em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0).

As amostras foram incubadas por 24 horas na mesma temperatura. Posteriormente, a reação foi interrompida com 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 30%, sendo o volume levado a 25 mL com TCA 5%. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g / 30 min/4°C. O sobrenadante foi separado e o nitrogênio digerido foi determinado pelo método colorimétrico com reagente de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.* 1951).

As determinações de proteína solúvel de cada amostra foram realizadas em triplicada e foi medida a absorbância (540 nm) em Espectrofotômetro Hitachi modelo U-1.100. Paralelamente, foi preparado um branco com 100 µL de água destilada mais reagentes, a curva-padrão foi preparada com albumina sérica bovina.

A digestibilidade foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Digestibilidade} = \frac{\text{concentração de proteínas solúvel após a digestibilidade}}{\text{concentração de proteína na amostra não digerida}} \times 100$$

III.12. PREDIÇÃO DE PARÂMETROS NUTRICIONAIS

a) COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA PROTEICA (PER)

Os valores preditos de PER dos hidrolisados foram calculados a partir da composição dos aminoácidos, determinados pelos aminogramas, baseados em três equações desenvolvidas por Alsmeyer, Cunningham, e Happich (1974), conforme descrito abaixo:

$$\text{PER} = -0,684 + 0,456 (\text{LEU}) - 0,047 (\text{PRO}) \quad (1)$$

$$\text{PER} = -0,468 + 0,454 (\text{LEU}) - 0,105 (\text{TYR}) \quad (2)$$

$$\text{PER} = -1,816 + 0,435 (\text{MET}) + 0,780 (\text{LEU}) + 0,211 (\text{HIS}) - 0,944 (\text{TYR}) \quad (3)$$

b) ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDO (PDCAAS)

Os valores de PDCAAS dos hidrolisados de penas e farinha de pena foram calculados a partir da relação entre a composição de aminoácidos da amostra e de valores de referência para frangos de corte (NRC 1994). Estes índices foram multiplicados pelo valor da digestibilidade de cada hidrolisado para obter o escore corrigido de cada aminoácido essencial. O PDCAAS é considerado o menor escore corrigido (Abdul-Hamid, *et al.* 2002).

c) VALOR BIOLÓGICO (BV)

O valor biológico predito de cada hidrolisado foi calculado através da equação de regressão desenvolvida por Morup & Olesen (1976), conforme descrita abaixo.

Para encontrar o valor do q , deve-se utilizar os valores de cada aminoácido referência e amostra. Calculando igualmente conforme cálculo descrito abaixo. A partir deste, pode-se calcular o valor biológico predito.

$$\text{BV} = 10^{2,15} \times q_{\text{Lys}}^{0,41} \times q_{\text{Phe} + \text{tyr}}^{0,60} \times q_{\text{Met} + \text{Cys}}^{0,77} \times q_{\text{Thr}}^{2,4} \times q_{\text{Trp}}^{0,21}$$

Onde:

$$q = \frac{a_i^{\text{amostra}}}{a_i^{\text{referência}}} \quad \text{para} \quad a_i^{\text{amostra}} \leq a_i^{\text{referência}}$$

$$q = \frac{a_i^{\text{referência}}}{a_i^{\text{amostra}}} \quad \text{para} \quad a_i^{\text{amostra}} \geq a_i^{\text{referência}}$$

^{ai} = mg de aminoácido / g de aminoácido essencial total

III.13. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados de digestibilidade *in vitro* e composição de aminoácidos foram submetidos ao teste de Tukey para verificar se as diferenças entre os hidrolisados foram significativas (Arango, 2001).

Com o propósito de verificar a coerência entre os resultados encontrados foi aplicado o procedimento estatístico da correlação linear simples, para verificar a variação conjunta dos resultados encontrados, utilizando o coeficiente de variação de Pearson (Callegari-Jacques, 2003). O teste foi executado através do SOFTWARE MINITAB - V14 (2004). As correlações calculadas foram consideradas significativas para um nível de significância de 0,05.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. MICRORGANISMOS

A primeira etapa desse trabalho foi selecionar os microrganismos, com base em trabalhos anteriores (Riffel, *et al.*, 2003). Desta forma, foram escolhidas linhagens bacterianas encontradas nas penas de frango em processo de degradação e selecionadas quanto à atividade enzimática (queratinase) e potencial para hidrolisar penas. Os microrganismos escolhidos foram o *Bacillus cereus* KR16 e *Chryseobacterium* sp. KR6. Estas bactérias encontram-se em ótimas condições de crescimento e degradação de penas em pH 7,0 e temperatura de 37°C e em pH 6,0 e temperatura de 30°C, respectivamente.

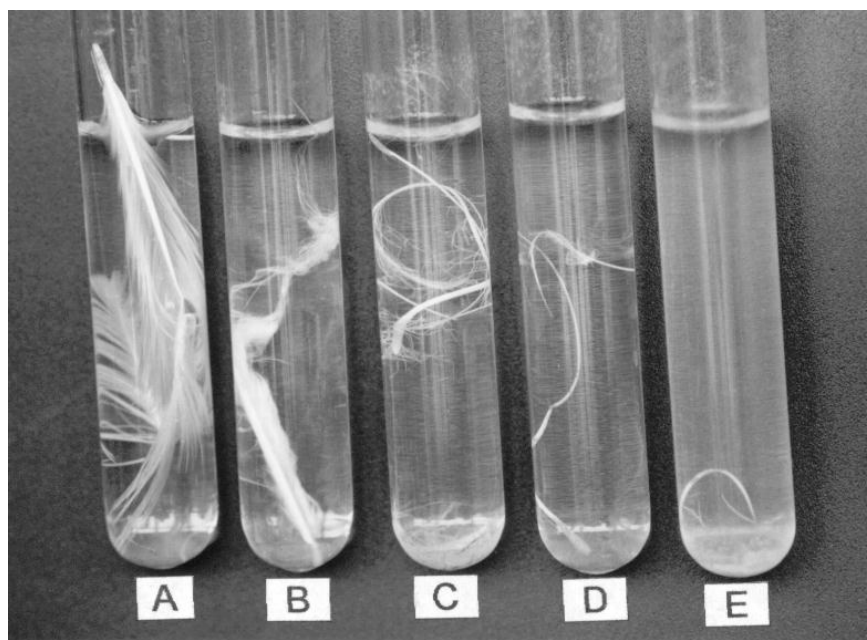


Figura 1: Degradação de penas de frango pelo microrganismo KR6 após incubação a 30°C por 0 h (A), 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) e 96 h (E).

Estes microrganismos foram capazes de degradar penas de frango, restando apenas pequenos fragmentos destas após incubação (Figura 1).

IV.2. CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO EM DIFERENTES QUANTIDADES DE PENAS

Um dos fatores analisados para a produção dos hidrolisados de penas foi observar o comportamento, quanto ao crescimento do microrganismo em diferentes quantidades de penas. Para tanto foram preparados meios contendo 1g, 2g e 5g de penas em 100 mL de meio caldo pena (CP), e inoculados com a bactéria KR6 ou KR16.

O microrganismo KR16 cresceu bem com a concentração de 1% de penas, alcançando a fase estacionária de crescimento em aproximadamente 48 horas (Figura 2), com uma concentração celular de cerca de 7 log UFC/mL. A produção de proteína solúvel acompanhou o crescimento microbiano sendo observados valores máximos após 48 horas de cultivo. Observou-se comportamento similar com 2% e 5% de penas, porém não houve incremento na concentração de proteína solúvel em relação ao aumento da concentração do substrato.

O microrganismo KR6 cresceu bem em concentração de caldo pena de 1%, 2% e 5%. A bactéria atingiu a fase estacionária em aproximadamente 48 horas (Figura 3), chegando a uma concentração celular de cerca de 8,5 log UFC/mL. Houve aumento na produção de proteína solúvel de maneira proporcional ao aumento na concentração de penas no caldo. Durante o cultivo de 5% penas a concentração máxima de proteína solúvel, foi observada em 48 horas, alcançando valores de 33 mg/mL (Figura 3).

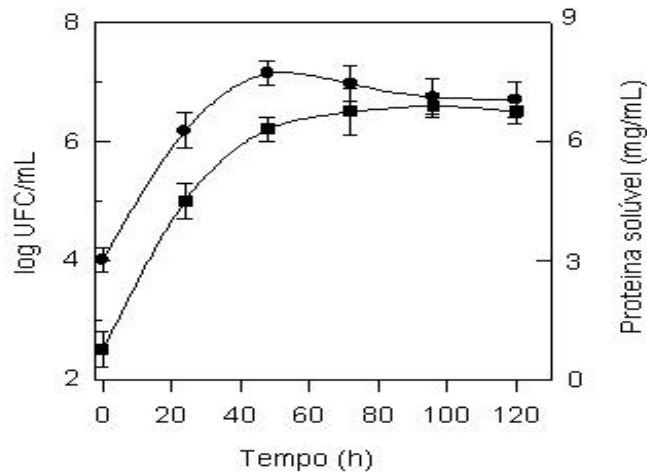


Figura 2: Crescimento do microrganismo KR16 em caldo pena 1%. O microrganismo foi incubado a 37° C com agitação de 120 rpm por 120 horas. Nos intervalos indicados, foram retiradas alíquotas para monitorar crescimento (●) e concentração de proteína solúvel (■).

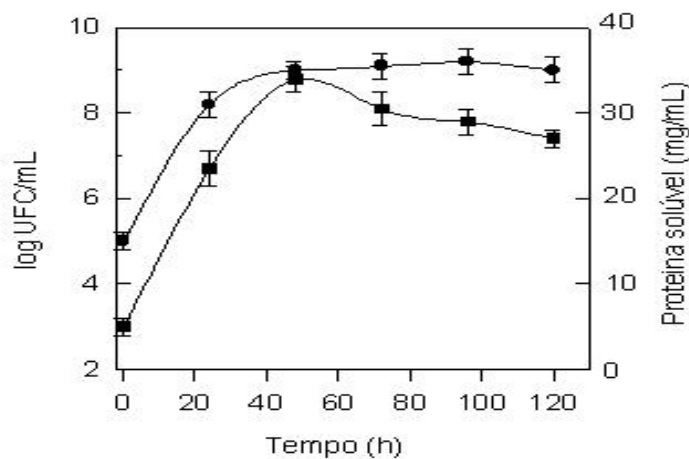


Figura 3: Crescimento do microrganismo KR6 em caldo pena 5%. O microrganismo foi incubado a 30° C com agitação de 120 rpm por 120 horas. Nos intervalos indicados, foram retiradas alíquotas para monitorar crescimento (●) e concentração de proteína solúvel (■).

IV.3. FATOR DE DEGRADAÇÃO DAS PENAS

Outro fator analisado para a produção do hidrolisado foi o comportamento quanto à degradação de diferentes quantidades de penas pelos microrganismos testados. Para isto utilizaram-se meios com diferentes quantidades de penas, onde foram inoculadas as bactérias KR6 e KR16. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Os gráficos ilustram o fator de degradação para as bactérias KR6 e KR16. Na Figura 4, utilizando a bactéria KR6, os valores do fator de degradação obtidos foram: 0,877 – 0,872 – 0,747 para 1%, 2% e 5%, respectivamente. Com a bactéria KR16, foi encontrado: 0,785 – 0,257 – 0,213 para 1%, 2% e 5%, respectivamente (Figura 5).

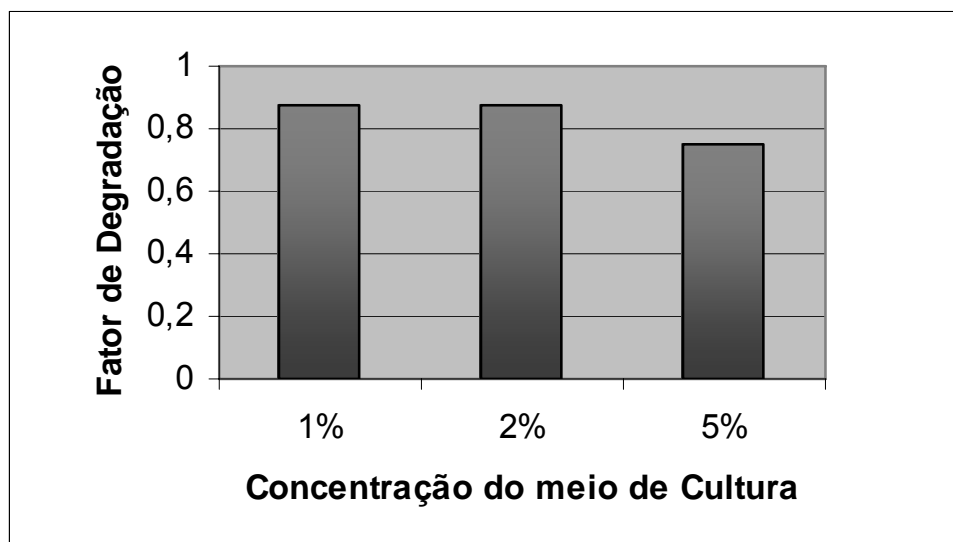


Figura 4: Fator de degradação das penas após cultivo da bactéria KR6 por 5 dias à 30°C em diferentes concentrações de penas no meio de cultura.

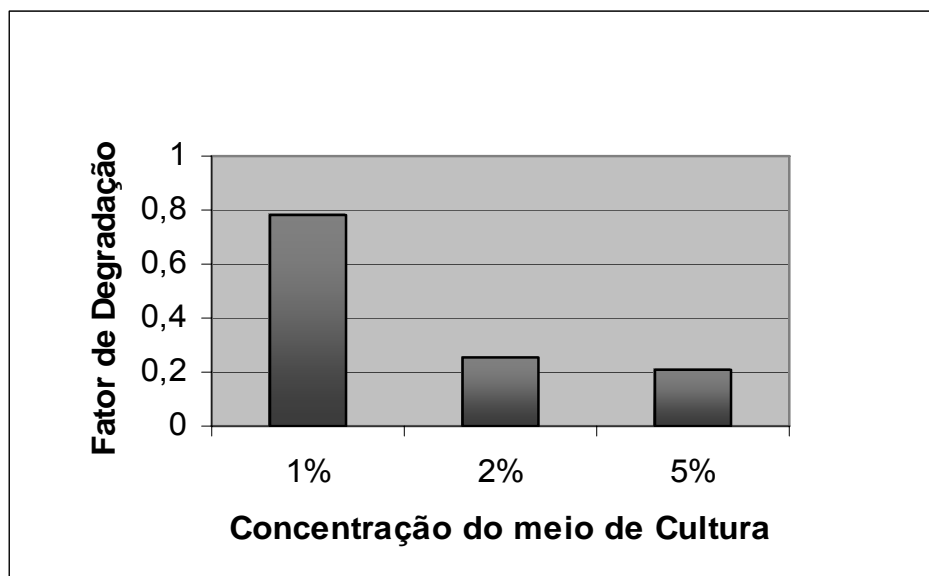


Figura 5: Fator de degradação das penas após cultivo da bactéria KR16 por 5 dias à 30°C em diferentes concentrações de penas no meio de cultura

Estes resultados indicam que a bactéria KR6 pode ser utilizada para degradação de penas com uma concentração mais elevada deste substrato, quando comparada com a KR16. Mesmo com o uso de 5% de penas ocorreu uma boa degradação das penas, enquanto para KR16 obteve-se boa degradação com 1% mas não com quantidades superiores.

Muitos autores relatam a degradação de penas por microrganismos utilizando meio com 1% penas (Sangali & Brandelli 2000; Kim et al., 2001). Uma linhagem de *Bacillus* sp. FK46 teve taxa de degradação de penas diminuída de 80% para 30% quando a concentração de penas aumentou de 1% para 5% (Suntornsuk & Suntornsuk, 2003), similar ao observado com a bactéria KR16.

Lucas et al. (2003) observaram grande variação nos valores de degradação de penas entre 23 bactérias queratinolíticas isoladas de solos. Utilizando meio com 0,27% penas, encontraram apenas seis linhagens com fator de degradação superior a 0,5. Durante a produção de lisado de penas por *Bacillus licheniformis* PWD-1, a degradação de penas foi produzida por cultivo semi-sólido utilizando um inóculo de 2 L para 500 g de penas (Williams et al., 1991).

IV.4. DIGESTIBILIDADE *IN VITRO*

Através da Tabela 1, pode-se observar os dados da digestibilidade *in vitro* com pepsina e tripsina das diferentes fontes protéicas. Observou-se que o

concentrado de soja e a caseína apresentam digestibilidade semelhante. O hidrolisado de pena obtido do filtrado do meio de cultura do microrganismo KR6 apresentou maior digestibilidade do que quando foi utilizado todo o produto da hidrólise. Este resultado seria esperado, considerando que no primeiro caso havia apenas aminoácidos e proteína solúvel e no segundo havia queratina residual e células bacterianas, além de aminoácidos e proteína solúvel. Verificou-se também que a farinha de pena apresentou digestibilidade inferior a dos demais hidrolisados.

Tabela 1: Digestibilidade *in vitro* das diferentes fontes protéicas com pepsina e tripsina.

| Fonte protéica | Proteína total (g/100g) | Dig. <i>in vitro</i> * |
|---------------------|-------------------------|------------------------|
| Farinha de pena | 83,11 | 0,673 ^a |
| Proteína de soja | 79,18 | 0,966 ^b |
| Caseína | 77,47 | 0,989 ^b |
| Hidrolisado KR6 | 84,53 | 0,791 ^c |
| Hidrolisado KR16 | 84,56 | 0,701 ^a |
| Hidrolisado F (KR6) | 80,80 | 0,881 ^d |

* Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

A digestibilidade *in vitro* dos hidrolisados indicou que estes são suscetíveis ao ataque por enzimas digestivas como a pepsina e tripsina. Apesar de apresentar queratina residual no hidrolisado, o microrganismo KR6 causa redução de pontes dissulfeto durante o cultivo em penas (Riffel et al., 2003) o que deve contribuir para o aumento da digestibilidade, pois torna a estrutura da queratina mais suscetível.

Grazziotin (2002) obteve valores de digestibilidade *in vitro* de 0,83 e 0,98 para hidrolisados de penas obtidos com o microrganismo KR2. Este organismo leva 10 dias para completar a degradação das penas e aparentemente gera um produto com maior grau de hidrólise de queratina se comparado com os microrganismos KR6 e KR16. Outros autores relatam importante aumento da digestibilidade da farinha de penas tratada com queratinase microbiana. Rosa (1996), tratando farinha de penas

industrial com *Pseudomonas* sp., observou aumento de 45% na digestibilidade do produto quando o tempo de tratamento foi de 5 dias. O tratamento com a queratinase produzida por *Bacillus licheniformis* aumenta a digestibilidade da farinha de pena em até 82% (Odetallah et al. 2003).

Nestes experimentos, observou-se que o hidrolisado de penas apresentou digestibilidade *in vitro* mais baixa do que a proteína de soja e a caseína. Entretanto, a proteína isolada de soja, utilizada freqüentemente como padrão por ser um produto purificado e com alto teor protéico, não é normalmente utilizada na indústria de rações devido ao seu alto custo. Da mesma forma, a caseína como proteína de boa qualidade e digestibilidade, porém de alto custo, tem o seu uso inviável na indústria de rações.

A farinha de penas, produto que também é utilizado industrialmente como fonte de proteínas em ração animal, apresentou digestibilidade inferior aos hidrolisados, como pode-se observar na Tabela 1, sugerindo que o tratamento microbiano gera um produto de melhor valor nutritivo.

IV.5. AMINOGRAMA

A composição de aminoácidos dos hidrolisados e da farinha de penas aparece na Tabela 2. O hidrolisado HKR16 é rico em resíduos de serina e glutamato e contém as menores quantidades de histidina e metionina. O conteúdo de aminoácidos sulfurados (Cys+Met) foi superior em HKR16. O Hidrolisado KR6 apresentou valores superiores de glutamato, quando comparados com o filtrado da KR6. Enquanto para a metionina, estes valores são invertidos, sendo maiores para o FKR6 do que HKR6. Estas duas amostras apresentaram mesmos valores para triptofano.

Tabela 2: Composição de aminoácidos dos hidrolisados*

| AA | HKR16 | HKR6 | FKR6 | FP |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ala | 43,4 ^a | 53,4 ^b | 40,5 ^c | 42,2 ^a |

| | | | | |
|------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Arg | 75,6 ^a | 74,4 ^a | 67,4 ^b | 65,1 ^b |
| Asp | 67,0 ^a | 58,8 ^b | 58,2 ^b | 56,1 ^b |
| Cys | 70,8 ^a | 55,4 ^b | 49,1 ^c | 48,1 ^c |
| Glu | 97,9 ^a | 117,6 ^b | 98,1 ^a | 102,6 ^a |
| Gly | 71,1 ^a | 70,9 ^a | 67,5 ^b | 64,8 ^b |
| His | 6,1 ^{ab} | 7,4 ^a | 6,5 ^b | 5,8 ^b |
| Ile | 55,9 ^a | 64,6 ^b | 43,2 ^c | 42,8 ^c |
| Leu | 85,7 ^a | 98,4 ^b | 71,2 ^c | 76,5 ^c |
| Lys | 17,0 ^a | 26,7 ^b | 21,2 ^c | 21,2 ^c |
| Met | 5,8 ^a | 4,5 ^b | 6,9 ^a | 4,7 ^b |
| Phe | 52,7 ^{ad} | 58,3 ^b | 42,6 ^c | 49,2 ^{cd} |
| Pro | 47,6 ^a | 22,5 ^b | 34,4 ^c | 41,1 ^a |
| Ser | 117,0 ^a | 107,3 ^b | 98,0 ^c | 81,3 ^d |
| Thr | 43,4 ^a | 51,2 ^b | 42,2 ^a | 33,1 ^c |
| Tyr | 30,9 ^{ac} | 33,2 ^a | 21,3 ^b | 26,8 ^c |
| Trp | 7,0 ^a | 6,7 ^a | 6,7 ^a | 5,7 ^b |
| Val | 84,5 ^a | 81,7 ^a | 72,8 ^b | 75,6 ^b |

HKR16 = Hidrolisado KR16; HKR6 = Hidrolisado KR6; FKR6 = Filtrado KR6; FP = Farinha de pena

* Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$).

Comparando a composição de aminoácidos dos hidrolisados e da farinha de pena com dados da literatura para pena bruta (Cherry, *et al.* 1975), observou-se que o aminoácido cisteína o que sofreu maior redução. Os mesmos autores, descreveram estes achados em seus experimentos. Diferentes tratamentos das penas de frango têm demonstrado que processamento térmico e/ou alcalino destroem principalmente aminoácidos sulfurados (Steiner *et al.* 1983; Papadopoulus *et al.* 1986; Kim e Patterson 2000). A farinha de penas sofre o processo de cocção sob pressão o que explica a significativa redução de cisteína. Apesar da produção dos hidrolisados ocorrer em temperaturas relativamente baixas, durante o cultivo do microrganismo KR6 em penas observou-se alcalinização do meio (Riffel *et al.* 2003), o que pode contribuir para perda de aminoácidos sulfurados.

A composição de aminoácidos dos hidrolisados assemelha-se a descrita para um lisado de penas obtido por tratamento com *Bacillus licheniformis* (Williams *et al.*, 1991), embora os níveis de lisina e histidina tenham sido inferiores aos observados para os hidrolisados KR6 e KR16. Quando suplementado com metionina, lisina e histidina, este lisado produziu curvas de crescimento de frangos similares às obtidas com farinha de soja.

IV.6. ESCORE DE AMINOÁCIDOS CORRIGIDOS (PDCAAS)

Os valores de PDCAAS dos hidrolisados e da farinha de pena foram calculados com base na composição de aminoácidos e digestibilidade *in vitro*. Os cálculos para os hidrolisados KR6, KR16, FKR6 e farinha de pena estão nas Tabelas 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Observou-se, através da análise dos PDCAAS, que em todas as amostras a metionina foi o aminoácido com menor valor, sendo desta forma o principal aminoácido limitante. Os valores de PDCAAS encontrados para a metionina foram: 0,15 - 0,17 - 0,19 - 0,28, para Farinha de pena, Hidrolisado KR6, Hidrolisado KR16 e FKR6, respectivamente.

Proteínas com PDCAAS igual a 1,0 são consideradas de alta qualidade, ou proteínas completas, que atendem aos requerimentos de aminoácidos essenciais. Não existe vantagem nutricional em consumir proteínas com escore superior a 1,0, pois os aminoácidos em excesso não serão utilizados pelo organismo como aminoácidos *per se*, sendo deaminados e o nitrogênio eliminado como uréia, enquanto o esqueleto de carbono é armazenado ou oxidado como fonte de energia. Os valores de PDCAAS dos hidrolisados foram baixos essencialmente devido ao baixo conteúdo de metionina, histidina e lisina, indicando que estes aminoácidos foram os principais limitantes nos hidrolisados. Além disso, a digestibilidade relativamente baixa também contribuiu para redução do PDCAAS.

O cálculo do PDCAAS vem sendo amplamente utilizado para avaliação de alimentos. O escore se baseia na relação entre composição de aminoácidos e

requerimento de aminoácidos essenciais, portanto recomendado para avaliar a qualidade de proteínas alimentares (Henley e Kuster, 1994; Schaafsma 2000) Alguns autores criticam o uso do PDCAAS, sugerindo que o uso da digestibilidade verdadeira dos aminoácidos limitantes seria mais precisa como fator de correção (Wu et al. 1996). Kannan et al. (2001) sugerem três parâmetros críticos na avaliação da qualidade de proteínas: perfil de aminoácidos essenciais, digestibilidade, e capacidade de suprir aminoácidos essenciais nas quantidades requeridas. No caso dos hidrolisados de penas, devido a evidente limitação de metionina, histidina e lisina observada pelo cálculo do PDCAAS, indica-se que estes hidrolisados devem ser incorporados como ingredientes de rações ou utilizados com suplementação. Neste sentido, Grazziotin (2002) demonstrou que o hidrolisado de penas produzido pelo microrganismo kR2 combinado com concentrado de soja e suplementado com metionina, resultou em ganho de peso superior ao obtido com proteína de soja como única fonte protéica.

Tabela 3: Cálculo PDCAAS do hidrolisado KR6

| AA essencial | Hidrolisado (mg/g) | Referência (mg/g) ^A | Escore do AA ^B | PDCAAS ^C |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Arg | 74.4 | 54.3 | 1.37 | 1.08 |
| His | 7.4 | 15.2 | 0.49 | 0.39 |
| Ile | 64.6 | 34.8 | 1.86 | 1.47 |
| Leu | 98.4 | 52.8 | 1.88 | 1.49 |
| Lys | 26.7 | 47.8 | 0.56 | 0.44 |
| Met | 4.5 | 21.7 | 0.21 | 0.17 |
| Met + Cys | 59.9 | 39.1 | 1.53 | 1.21 |
| Phe + Tyr | 91.5 | 58.3 | 1.57 | 1.24 |
| Thr | 51.2 | 34.8 | 1.47 | 1.16 |
| Trp | 6.7 | 8.7 | 0.77 | 0.61 |
| Val | 81.7 | 39.1 | 2.09 | 1.65 |

^A Referência para frangos de corte (NRC 1994)

^B Escore do AA = coluna II / coluna III

^C PDCAAS = (coluna IV) x 0.791 (digestibilidade do HKR6); PDCAAS = 0,17 (menor escore corrigido)

Tabela 4: Cálculo PDCAAS do hidrolisado KR16

| AA essencial | Hidrolisado (mg/g) | Referência (mg/g) ^A | Escore do AA ^B | PDCAAS ^C |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Arg | 75.6 | 54.3 | 1.39 | 0.97 |
| His | 6.1 | 15.2 | 0.40 | 0.28 |
| Ile | 55.9 | 34.8 | 1.61 | 1.13 |
| Leu | 85.7 | 52.2 | 1.64 | 1.15 |
| Lys | 17.0 | 47.8 | 0.36 | 0.25 |
| Met | 5.8 | 21.7 | 0.27 | 0.19 |
| Met + Cys | 76.6 | 39.1 | 1.96 | 1.37 |
| Phe + Tyr | 83.6 | 58.3 | 1.43 | 1.00 |
| Thr | 43.4 | 34.8 | 1.25 | 0.87 |
| Trp | 7.0 | 8.7 | 0.80 | 0.56 |
| Val | 84.6 | 39.1 | 2.16 | 1.51 |

^A Referência para frangos de corte (NRC 1994)

^B Escore do AA = coluna II / coluna III

^C PDCAAS = (coluna IV) x 0.701 (digestibilidade do HKR16); PDCAAS = 0,19 (menor escore corrigido)

Tabela 5: Cálculo PDCAAS do hidrolisado FKR6

| AA essencial | Hidrolisado (mg/g) | Referência (mg/g) ^A | Escore do AA ^B | PDCAAS ^C |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Arg | 67.4 | 54.3 | 1.24 | 1.09 |
| His | 6.5 | 15.2 | 0.43 | 0.38 |
| Ile | 43.2 | 34.8 | 1.24 | 1.09 |
| Leu | 71.2 | 52.2 | 1.36 | 1.20 |
| Lys | 21.2 | 47.8 | 0.44 | 0.39 |
| Met | 6.9 | 21.7 | 0.32 | 0.28 |
| Met + Cys | 56.0 | 39.1 | 1.43 | 1.26 |
| Phe + Tyr | 63.9 | 58.3 | 1.10 | 0.97 |
| Thr | 42.2 | 34.8 | 1.21 | 1.07 |
| Trp | 6.7 | 8.7 | 0.77 | 0.68 |
| Val | 72.8 | 39.1 | 1.86 | 1.64 |

^A Referência para frangos de corte (NRC 1994)

^B Escore do AA = coluna II / coluna III

^C PDCAAS = (coluna IV) x 0.881 (digestibilidade do HFKR6); PDCAAS = 0,28 (menor escore corrigido)

Tabela 6: Cálculo PDCAAS da farinha de pena

| AA essencial | Hidrolisado (mg/g) | Referência (mg/g) ^A | Escore do AA ^B | PDCAAS ^C |
|--------------|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------|
| Arg | 65.1 | 54.3 | 1.20 | 0.81 |
| His | 5.8 | 15.2 | 0.38 | 0.25 |
| Ile | 42.8 | 34.8 | 1.23 | 0.83 |
| Leu | 76.5 | 52.2 | 1.46 | 0.98 |
| Lys | 21.2 | 47.8 | 0.44 | 0.30 |
| Met | 4.7 | 21.7 | 0.22 | 0.15 |
| Met + Cys | 52.8 | 39.1 | 1.35 | 0.91 |
| Phe + Tyr | 76.0 | 58.3 | 1.30 | 0.87 |
| Thr | 33.1 | 34.8 | 0.95 | 0.64 |
| Trp | 5.7 | 8.7 | 0.65 | 0.44 |
| Val | 75.6 | 39.1 | 1.93 | 1.30 |

^A Referência para frangos de corte (NRC 1994)

^B Escore do AA = coluna II / coluna III

^C PDCAAS = (coluna IV) x 0,673 (digestibilidade da farinha de pena); PDCAAS = 0,15 (menor escore corrigido)

IV.7. COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA PROTEICA (PER)

Os valores de PER das amostras analisadas foram calculados a partir da composição dos aminoácidos encontrados nos aminogramas, baseado em três equações desenvolvidas por Alsmeyer, Cunningham, e Happich (1974).

Observa-se no Hidrolisado da KR6 o maior PER para as equações 1, 2 e 3. Para as equações 1 e 2, observa-se o menor PER no FKR6, e para a equação 3 o menor PER está para a farinha de pena (Tabela 7).

Tabela 7: Valor do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER)

| | PER (1) | PER (2) | PER (3) |
|------------------|---------|---------|---------|
| Hidrolisado KR6 | 4,31 | 4,22 | 4,71 |
| Hidrolisado KR16 | 3,61 | 3,52 | 3,97 |
| Filtrado KR6 | 3,02 | 2,96 | 3,79 |
| Farinha de Pena | 3,23 | 3,14 | 3,58 |
| Caseína | 4,17 | 4,10 | 4,22 |

Os valores preditos de PER, pelas três equações, são comparáveis aos valores descritos para proteínas de origem vegetal (Chavan et al. 2001; Bhagya & Sastry 2003), proteína de peixe (Abdul-Hamid et al. 2002) e caseína (Satterlee et al. 1979). Os valores elevados de PER observados podem estar relacionados com o elevado conteúdo de leucina dos hidrolisados, já que a concentração deste aminoácido é relevante no cálculo de PER pelas equações descritas. Entretanto, estes valores não devem ser observados *in vivo*, considerando a digestibilidade relativamente baixa dos hidrolisados.

IV.8. VALOR BIOLÓGICO (BV)

O valor biológico (BV) de uma proteína está relacionado com a fração de nitrogênio absorvido que é conservado pelo organismo. Com isto, se representa a capacidade máxima de utilização de uma proteína. Em outras palavras, uma proteína terá maior valor biológico e maior qualidade, quando tiver a capacidade de oferecer nitrogênio ao organismo.

O BV foi calculado através de equação de regressão, levando em conta a composição de aminoácidos da amostra em relação a aminoácidos padrão. Encontrou-se nos hidrolisados os seguintes valores: 63,80 – 59,65 – 47,13 – 45,84, para a KR6, sobrenadante da KR6, KR16 e Farinha de pena, respectivamente. Sendo desta forma encontrado para a KR6 o maior BV e para a Farinha de pena o menor (Figura 6).

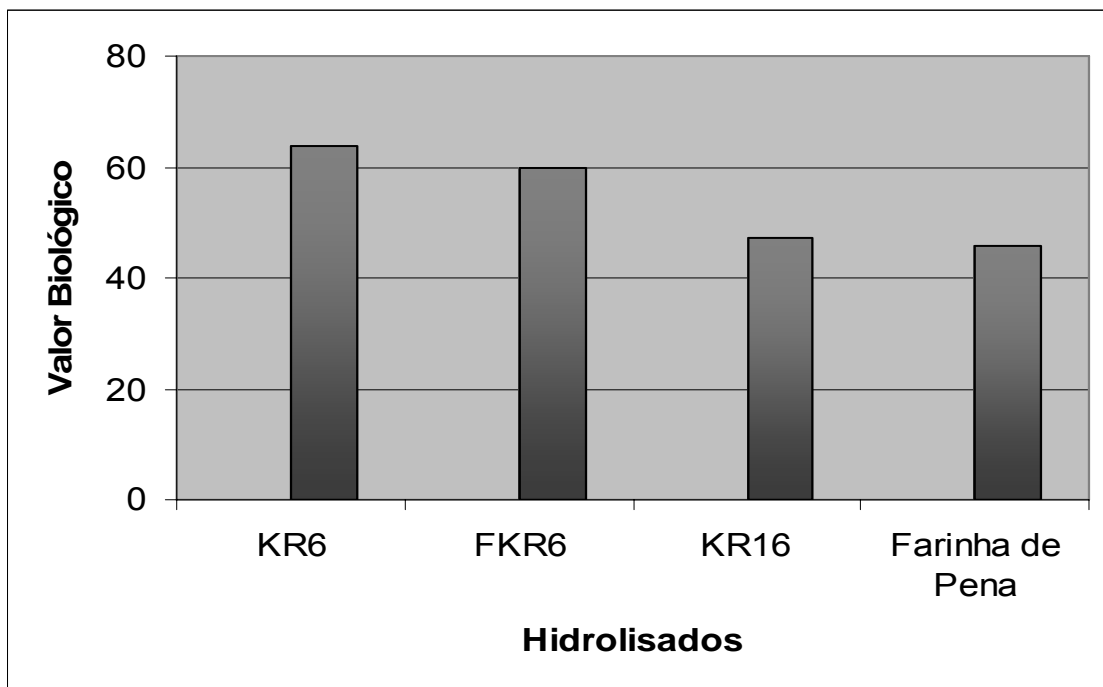


Figura 6: Valor biológico predito dos hidrolisados de penas

O tratamento das penas, com o microrganismo KR6 resultou em hidrolisados com valores superiores de PDCAAS, PER e BV, sugerindo que este organismo produza hidrolisados com propriedades nutricionais superiores ao KR16 e farinha de penas.

A proteína de penas de frango tem sido considerada como uma ótima fonte de proteína metabolizável (Klemesrud *et al.*, 1998) e queratina de penas adequadamente tratada com organismos queratinolíticos podem ter boas características nutricionais. Embora, a suplementação com aminoácidos, seja necessária na maioria dos casos, o uso de penas ou farinha de penas tratadas com queratinases pode suplementar até 10% da proteína da dieta de frangos (Williams *et al.*, 1991; Odetallah *et al.*, 2003). Portanto, a produção de proteína digerível a partir de um resíduo de baixo valor nutritivo como as penas apresentam-se como uma opção para a obtenção de um dos mais caros ingredientes de rações.

IV.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Com o propósito de verificar a coerência entre os resultados encontrados (análise qualitativa), aplicou-se um procedimento estatístico inerente ao delineamento proposto.

IV.9.1. Correlação Linear Simples

Com o objetivo de verificar a variação conjunta dos resultados encontrados, aplicou-se o coeficiente de variação de Pearson, através do SOFTWARE MINITAB - V14 (2004). Estes resultados permitiram apurar uma correlação mínima igual a 0,949 (entre KR6 e KR16) e a máxima 0,980 (entre FP e KR6F). As correlações calculadas foram significativas, para um nível de significância de 0,05, isto é, todos os valores de p são 0,000. A relação entre as variáveis é direta (todas correlações positivas), isto é, quando uma variável varia em um sentido, a outra, predominantemente varia no mesmo. Além disto, pelas tabelas de classificação dos valores das correlações (Callegari-Jacques, 2003), todas as correlações encontradas são muito fortes e

conseqüentemente possuem alto poder de explicação através do coeficiente de determinação, isto é $r^2 = 0,949^2 = 0,900601$ que significa que 90,0601% das variações de KR6 são explicados pelas concomitantes variações de KR16. Logo as demais correlações têm explicação superior a este valor.

V. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Os microrganismos estudados apresentam capacidade de degradação de penas, sendo a KR6, em até 5% de penas, enquanto a KR16 somente em até 1%;
- Os hidrolisados protéicos obtidos com os organismos KR6 e KR16 apresentam baixa concentração dos aminoácidos metionina, histidina e lisina, sendo a metionina o principal aminoácido deficiente pelo cálculo do PDCAAs;
- O microrganismo KR6 resultou em hidrolisados com valores superiores de PDCAAs, PER e BV, indicando que esta bactéria produz hidrolisados com propriedades nutricionais superiores a KR16 e a farinha de penas;
- Além disso, esses resultados sugerem, que a produção da proteína digerível, a partir de um resíduo de baixo valor nutritivo, como as penas, apresenta-se como uma opção para obtenção de um dos mais caros ingredientes de rações;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, n. 78, p. 69-74, 2002.

ALSMEYER, R. H.; CUNNINGHAM, A. E.; HAPPICH, M. L. Equations predict PER from amino acids analysis. *Food Technology*, n. 28, p. 34-38, 1974.

ARANGO, H.G. *Bioestatística teórica e computacional*. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 235 p., 2001.

BHAGYA, S.; SASTRY, M. C. S. Chemical, functional and nutritional properties of wet dehulled niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seed flour. *Food Science and Technology*, n. 36, p. 703-708, 2003.

BOFF, L. *Saber cuidar - ética do humano - compaixão pela terra*. 10 ed. Petrópolis: Vozes, 2004.

BRADBURY, J.H. The structure and chemistry of keratin fibers. *Advances in Protein Chemistry*, n.67, p. 111-211, 1973.

BUREAU, D. P. *et al.* Feather meals and meat and bone meals from different origins as protein sources in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture Nutrition*, Oxford, n. 181, p. 281-291, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. *Bioestatística. Princípios e aplicações*. Porto Alegre: Artmed. P. 78-83. 2003.

CHAVAN, U. D.; MCKENZIE, D. B.; SHAHIDI, F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*, n. 75, p. 145-153, 2001.

CHERRY, J. P.; YOUNG, C. T.; SHEWFELT, A. L. Characterization of protein isolates from keratinous material of poultry feathers. *Journal of Food Science*, n. 40, p. 331-335, 1975.

CHIBA, L. I. *et. al.* Hydrolyzed feather meal as a source of amino acids for finisher pigs. *Animal Feed*

Science and Technology, n. 57, p. 15-24, 1996.

CHOI, J. M.; NELSON, P. V. Developing a slow-release nitrogen fertilizer from organic sources, using poultry feathers. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, n. 121, p. 634-638, 1996.

DALEV, P.; IVANOV, I.; LIUBOMIROVA, A. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n. 73, p. 242-244, 1997.

DIAS, G. F. *Educação Ambiental. Princípios e Práticas*. 7. ed. São Paulo: Gaia, 1991.

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

FULLER, H. *Análisis nutritivo de harina de plumas*. Indústria Avícola, p.32-33, Oct. 1984.

GOEDEKEN, T. J. *et al.* Hydrolyzed feather meal as a protein source for growing calves. *Journal of Animal Science*, n. 68, p. 2945-2953, 1990.

GRAZZIOTIN, A. *Avaliação do valor nutricional de um hidrolisado de penas de frango obtido por proteólise bacteriana*. 2002. 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, ênfase em Medicina Veterinária Preventiva). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

HADAS, A.; KAUTSKY, L. Feather meal, a semi-slow-release nitrogen-fertilizer for organic farming. *Fertilizer Research*, n. 38, p. 165-170, 1994.

HENLEY, E. C.; KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. *Food Technology*, n. 48, p. 74-77, 1994.

HOOD, C. M.; HEALY, M. G. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. *Resources, Conservation and Recycling*, n. 11, p. 179-188, 1994.

IKEDA, K. *et al.* Factors affecting protein digestibility in soybean foods. *Cereal Chemistry*, n. 72, p. 401-405, 1995.

KANNAN, S.; NIELSEN, S. S.; MASON, A. C. Protein-digestibility corrected amino acid scores for bean and bean-rice infant weaning food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 49, p. 5070-5074, 2001.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*, n. 40, p. 47-59, 1986.

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

KIM, W. K.; PATTERSON, P. H. Nutritional value of enzyme or sodium hydroxide - treated feathers from dead hens. *Poultry Science*, n. 79, p. 528- 534, 2000.

KLEMESRUD, M. J.; KLOPFENSTEIN, T. J.; LEWIS, A. J. Complementary responses between feather meal and poultry by-product meal with or without ruminally protected methionine and lysine in growing calves. *Journal of Animal Science*, v. 76, n.7, p. 1970-1975, Jul.1998.

LEITE, A. L. T. A.; MEDINA, N. M. Educação Ambiental. 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2000.

LIU, J. K. *et al.* Nutrition evaluation of blood meal and feather meal for turkeys. *Poultry Science*, n. 68, p. 1513-1518, 1989.

LOWRY, O. H.; *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, n. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS, F. S. *et al.* High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microbial Ecology*, n. 45, p. 282-290, 2003.

LUONG, V. B.; PAYNE, C.G. Hydrolysed feather protein as a source of amino acids for laying hens. *British Poultry Science*, n. 18, p. 523-526, 1977.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. K. *Alimentos - nutrição e dietoterapia*. São Paulo: Roca, 1998.

MORUP, I. K.; OLESEN, E. S. New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern. *Nutrition Report International*, n. 13, p. 355-365, 1976.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of poultry. 9th ed. Washington: National Academy Press, 1994.

ODETALLAH. N. H. *et al.* Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poultry Science*, n. 82, p. 664-670, 2003.

ONIFADE, A. A. *et al.* 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*, n. 66, p.1-11, 1998.

PAPADOPOULUS, M.C. *et al.* Effects of processing time and moisture content on aminoacid composition and nitrogen characteristics of feather meal. *Animal Feed Science and Technology*, n.14, p. 279-290, 1986.

RIFFEL, A. *et al.* Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Archives of Microbiology*, n. 179, p. 258-265, 2003.

ROSA, S. P. Caracterização e purificação parcial de uma queratinase secretada por cultura de *Pseudomonas sp.* 1996. *Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)* - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

RYU, D. D. Y. Enhancement of nutritional value of cellulosic feed resources by pretreatment and bioconversion. *Biotechnology for Livestock Production*. Edited by Food and Agriculture Organization of the United Nations. New York: Plenum Press. 223-243. 1998.

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

SATTERLEE, L. D.; MARSHALL, H. F.; TENNYSON, J. M. Measuring protein quality. *Journal of American Oil Chemical Society*, n. 56, p. 103-109, 1979.

SCHAAFSMA, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Nutrition*, n. 130, p. 1865-1867, 2000

SCHASTEEN, C. S. *Queratinase - Um novo aditivo para rações*. In: Simpósio de Avanços Tecnológicos, 9, 1997. Cancun, 1997.

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

STEINER, R. J.; KELLEMS, R. O.; CHURCH, D. C. Feather and hair meals for ruminants. IV. Effects of chemical treatment of feather and processing time on digestibility. *Journal of Animal Science*, v. 57, n.2, p. 495-502, 1983.

SUMMERS, J. D.; SLINGER, S. J.; ASHTON, G. C. Evaluation of meat meal and feather meal for the growing chicken. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 45, p. 63-70, 1965.

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

STRYER, L. *Bioquímica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

TORRES, P. L.; BOCHNIAK, R. *Uma leitura para os temas transversais*. Curitiba: Senar, 2003.

VOET, D. *et al.* *Fundamentals of Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

WANG, X.; PARSONS, C. M. Effect of processing systems on protein quality of feather meals and hog hair meals. *Poultry Science*, n. 76, p. 491-496, 1997.

WERLANG, P. O.; BRANDELLI, A. Characterization of a novel feather-degrading *Bacillus* sp. strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, n. 120, p. 71-80. 2005.

WILLIAMS, C. M.; SHIH, J. C. H. Enumeration of microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *Journal of Applied Bacteriology*, n. 67, p. 25-35, 1989.

WILLIAMS, C. M. *et al.* Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n.6, p. 1509-1515, 1990.

WILLIAMS, C. M. *et al.* Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. *Poultry Science*, n. 70, p. 85-94, 1991.

WOODGATE, S. Soy protein in relation to human and amino acid nutrition. *Journal of American Dietetic Association*, n. 91, p. 174-179, 1993.

WU, W. *et al.* Amino acid availability-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 44, p. 1296-1301, 1996.

YAMAUCHI, K. *et al.* Preparation of stable aqueous solutions of keratins, and physicochemical and biodegradation properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research*, n. 31, p. 439-444, 1996.

ANEXOS

Anexo 1

Caldo Pena (CP)

| Ingredientes | g/L |
|---------------------------------|---------|
| NaCl | 0,5 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,3 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,4 |
| Penas de Frango | 10,0 |
| Água destilada | 1000 mL |

OBS: Ajustar pH para 6,0

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

Anexo 2

Agar Leite (AL)

| Ingredientes | g/L |
|---------------------|------------|
| Peptona de Carne | 5,0 |
| Extrato de Levedura | 3,0 |
| Ágar | 12,0 |
| Água destilada | 1000 mL |

OBS: Ajustar pH para 6,0

Autoclavar por 15 minutos a 121°C

No momento de distribuir o meio, adicionar 100 mL/L de leite UHT

Anexo 3

Tampão Fosfato Salino (PBS)

| Ingredientes | g/L |
|--|------------|
| NaCl | 8,766 |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 0,207 |
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 3,046 |
| Água destilada | 1000 mL |

OBS: Ajustar pH para 6,0

Autoclavar por 15 minutos a 121°C