



## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUERATINASES VISANDO POSTERIOR APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE PELOS DE SUÍNOS

CAROLINE DALASTRA<sup>1,2,\*</sup>, SIMONE KUBENECK<sup>2,3</sup>, KARINA PAULA  
PRECZESKI<sup>2,4</sup>, FABIANE FERNANDA CZAPELA<sup>2,4</sup>, HELEN TREICHEL<sup>2,5</sup>

### 1 Introdução

As proteases são enzimas de grande ocorrência em sistemas biológicos com inúmeras aplicações em processos biotecnológicos devido às suas propriedades catalíticas, entretanto, estas enzimas não possuem capacidade de hidrólise de resíduos ricos em queratina (VERMA et al. 2016). Queratinases são enzimas proteolíticas que possuem alta especificidade pela queratina, proteína altamente estável que possui em sua estrutura compostos de enxofre com pontes de dissulfeto (ABDEL-NABY; EL-REFAI; IBRAHIM, 2017). Devido a estas características, as queratinases têm grande vantagem em diversas aplicações industriais e biotecnológicas.

A principal restrição ao uso das queratinase está relacionada ao baixo nível de produção da enzima e ao alto custo. Porém, uma alternativa à esta restrição está no uso de resíduos de queratina como substrato fermentativo para a produção das enzimas queratinases (VERMA et al., 2016).

Sendo assim, as queratinases surgem como biocatalizadores com capacidade de tratar os resíduos queratinosos, transformando-os em produtos de alto valor (VERMA et al., 2016). Na natureza, uma gama de microrganismos queratinolíticos possuem a capacidade de reduzir ligações de dissulfeto presentes na queratina, facilitando o processo de desestabilização da estrutura e, por conseguinte, sua degradação. (VERMA et al., 2016).

1 Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS, Bolsista FAPERGS, \*contato: carolinedalastra@gmail.com;

2 Grupo de Pesquisa em Agroenergia e Linha de Pesquisa em Bioprocessos e Aplicação em Bioenergias da Universidade Federal da Fronteira Sul

3 Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS;

4 Mestranda em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS;

5 Doutora, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS, **Orientadora.**



## 2 Objetivos

Avaliar a produção da enzima queratinase por microrganismos isolados de substratos queratinosos por meio do processo fermentativo em estado submerso (FS), a fim de aplicar a enzima na degradação de pelos suínos.

## 3 Material e Métodos

Os substratos de queratina, penas de galinha e pelos suínos, foram submetidos a três diferentes condições de pré-tratamento: (a) lavados com detergente e álcool 70% seguido de secagem a  $68\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Adaptado de CĂLIN et al., 2017); (b) Autoclavados a 1 atm,  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min (Adaptado de CĂLIN et al., 2017); (c) Peróxido de hidrogênio 4%, mantido em shaker em 150 rpm a  $27^{\circ}\text{C}$ .

Os microrganismos foram isolados de penas de galinhas dispostas em solo, e cultivados em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA). Os fungos com potencial de produção da enzima foram selecionados por meio da visualização de degradação dos substratos no processo de fermentação. O meio fermentativo foi preparado com 100 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), 10 g/L de substrato e inóculo de  $10^6$  esporos/mL, incubado em agitador orbital sob condições de 150 rpm,  $28^{\circ}\text{C}$  por 9 dias.

A medida de atividade queratinolítica foi realizada conforme adaptação da metodologia de Bressolier et al. (1999), utilizando como substrato padrão queratina azul (Sigma K8500). Para a determinação do teor de proteína total, seguiu-se a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (ASB) como padrão (Sigma A3294). A degradação dos substratos foi avaliada pela diferença de massa antes e após a fermentação. Para o estudo da estabilidade enzimática, o extrato foi mantido a  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  e as leituras foram realizadas em diferentes tempos.

## 4 Resultados e Discussão

Por apresentarem uma estrutura mais simples, as penas de galinha foram submetidas a ensaios preliminares a fim de verificar o potencial dos fungos para a produção da enzima. Duas cepas fúngicas demonstraram potencial, com 36,11% e 42,23% de degradação do

substrato para os fungos 1B e 3B, respectivamente, sendo selecionadas para prosseguir com as fermentações.

Os ensaios da fermentação submersa foram quantificados quanto a produção da enzima no terceiro, sexto e nono dias de fermentação. Ao final do processo fermentativo as amostras foram filtradas e avaliadas quanto a degradação do substrato (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados de atividade enzimática em diferentes substratos.

Substrato	Tratamento	Atividade enzimática (U/mL)						Degradação (%)	
		1B			3B			1B	3B
		3 dias	6 dias	9 dias	3 dias	6 dias	9 dias		
Pena	a	21,75	63,75	64,50	7,25	16,00	44,25	21,08	16,47
	b	61,00	149,00	110,50	10,50	53,00	113,50	53,98	39,08
	c	64,00	138,00	56,50	8,50	22,50	21,75	32,78	26,73
Pelo	a	198,75	239,50	197,50	0,00	5,25	5,75	41,87	28,00
	b	178,75	243,25	172,75	58,50	112,25	48,75	59,20	34,67
	c	69,25	109,50	74,50	36,75	68,75	76,50	50,32	40,25

Os resultados apresentados na Tabela 1 apontam que o fungo denominado 1B apresentou maior atividade enzimática no pré tratamento (a) e na fermentação com o pelo suíno, além de degradar cerca de 41% do substrato inicial. Observou-se que o microrganismo 3B necessita de um maior tempo em contato com o substrato para conseguir acessar a enzima em estudo.

A avaliação da estabilidade do extrato enzimático foi realizada no tempo zero (final da fermentação) e em cinco e trinta dias de armazenamento a  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A atividade enzimática referente ao fungo 1B manteve-se estável durante o tempo de armazenamento, o que não ocorreu com o fungo 3B, havendo uma perda significativa de atividade.

## 5 Conclusão

A produção da enzima queratinase por meio de fungos isolados de substratos queratinolíticos mostrou-se promissora, no ponto de vista econômico e ambiental, uma vez que é uma alternativa biotecnológica para a valorização de subprodutos industriais, que até então eram pouco valorizados.



## Referências

ABDEL-NABY, Mohamed A.; EL-REFAI, Heba A.; IBRAHIM, Mohammad H.A.. Structural characterization, catalytic, kinetic and thermodynamic properties of Keratinase from *Bacillus pumilus* FH9. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 105, p.973-980, dez. 2017.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, Georgia, v. 72, n. 1, p.248-254, jan. 1976.

BRESSOLLIER, Philippe et al. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p.2570-2576, jun. 1999.

CĂLIN, Mariana et al. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 101-112, 2017.

VERMA, Amit et al. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews In Biotechnology**, v. 37, n. 4, p.476-491, jun. 2016.

**Palavras-chave:** queratinase; enzimas; fungos; valoração de resíduo.

## Financiamento

FAPERGS.