



TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO DE QUERATINASES NÃO COMERCIAIS VISANDO POSTERIOR APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE PELOS DE SUÍNO

SIMONE KUBENECK^{1,2,*}, CAROLINE DALASTRA^{2,3}, KARINA PRECZESKI^{2,4},
FABIANE CZAPELA^{2,4}, HELEN TREICHEL^{2,5}

1 Introdução

A utilização de processos biológicos na resolução de problemas ambientais tais como o gerenciamento inadequado de resíduos sólidos, tem se mostrado muito promissor. A aplicação de enzimas nesses processos pode ser muito ampla, porém um problema que afeta qualquer indústria de transformação, como por exemplo a alimentícia, é a recuperação e a purificação dessas proteínas.

Técnicas eficientes e de baixo custo que possibilitam a concentração e a recuperação enzimática são muito desejáveis. As técnicas de precipitação utilizando sais e/ou solventes são muito utilizadas em operações de concentração e pré-purificação de proteínas. A precipitação com sais ocasiona o aumento da força iônica fazendo com que as moléculas se agrupem e precipitem (Borzani et al., 2001), já, os solventes, aumentam a atração entre as moléculas de proteínas devido as constantes dielétricas, formando agregados que atingem proporções macroscópicas e precipitam.

Nesse contexto, a utilização das enzimas queratinases pré-purificadas em processos biológicos que visam o gerenciamento de resíduos queratinosos, como a biodegradação, pode ser uma alternativa promissora, uma vez que essas enzimas têm alta especificidade pela queratina.

1 Graduando em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Erechim/RS, **Bolsista Fapergs**, *contato: simonekubeneck@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 estratégias e processos de concentração de queratinases visando posterior aplicação na degradação de pelos suínos.

3 Material e Métodos

Os pelos suínos utilizados como substrato de queratina para este estudo foram coletados de uma agroindústria local e passaram por pré-tratamento, no qual ficaram submersos em álcool 70% por 4 horas e após foram secos por 24 horas a $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A obtenção das enzimas queratinases foi feita através de fermentação em estado submerso, em que se utilizou $2,2 \times 10^6$ esporos/ml do microrganismo isolado de penas de galinha coletadas em solo de propriedades rurais, juntamente com 1 grama de substrato e 100 ml de tampão TRIS HCl 50 mM (pH 8,5) e incubadas em agitador orbital a 110 rpm, 28°C por 6 dias.

Com o extrato enzimático empregou-se técnicas de precipitação variando o tipo de solvente (50%) e o tipo de sal (0,5mol/L), utilizado acetona e etanol como solventes e NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como sais. Os solventes foram adicionados ao extrato enzimático através de uma bomba peristáltica utilizando uma vazão de 10 ml/min em banho de gelo. Posteriormente o extrato enzimático com sal ou solvente foi centrifugado a 9500 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspensão utilizando 5 ml de tampão TRIS HCl 50 mM (pH 8,5) e utilizado para quantificação da atividade enzimática.

A medida de atividade enzimática foi realizada conforme adaptação de Bressolier et al. (1999), em que uma amostra do extrato enzimático foi misturada em 3,2 ml de tampão TRIS HCl 50mM (pH 8,5) juntamente de 0,013g de azoqueratina e mantida por 1 hora a 50°C em banho ultratermostático. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. A determinação do teor de proteína do extrato enzimático foi realizada por meio do método de Bradford (1976), utilizando abulmina de soro bovino como padrão (Sigma A3294).

Os testes de degradação dos pelos suínos se conduziram com o extrato enzimático pré-purificado em tubos de ensaio com, aproximadamente, 0,1 grama de pelo e cerca de 7 ml do extrato enzimático, por 3 meses. Ao fim do período foi verificado se houve degradação dos pelos por meio da perda de massa.

4 Resultados e Discussão

A técnica de precipitação enzimática utilizando sais e/ou solventes orgânicos obteve valores de atividade enzimática elevados, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da técnica de precipitação com sais e solventes.

| Ensaio | Condições | Atividade (U/mL) | Fator de Purificação |
|--------------|---|------------------|----------------------|
| Enzima Bruta | - | 180,00 | 1,00 |
| 1 | Acetona | 209,00 | 0,88 |
| 2 | Etanol | 210,25 | 0,97 |
| 3 | Acetona + NaCl | 269,25 | 0,88 |
| 4 | Acetona + (NH ₄) ₂ SO ₄ | 222,00 | 0,81 |
| 5 | Etanol + NaCl | 230,00 | 0,87 |
| 6 | Etanol + (NH ₄) ₂ SO ₄ | 172,00 | 0,70 |
| 7 | NaCl | 255,00 | 1,03 |
| 8 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 256,75 | 0,99 |

Apesar do método de precipitação não resultar em fatores de purificação consideravelmente maiores do que 1,0, a atividade enzimática resultante do método em alguns ensaios foi superior à atividade obtida para o extrato bruto, alcançando um aumento de 49,58% no ensaio 3.

Já nos testes de degradação utilizando o extrato enzimático concentrado, a maior degradação se deu no ensaio 1, como pode ser observado na Tabela 2, ao qual a precipitação foi realizada com acetona. É possível que a composição química dos agentes utilizados no processo de precipitação ocasiona uma mudança na ação posterior das enzimas frente ao pelo suíno.

Tabela 2. Resultados dos testes de degradação com o extrato enzimático purificado.

| Ensaio | Degradação (%) |
|--------|----------------|
| 1 | 34,90 |
| 2 | 12,80 |
| 3 | 11,40 |
| 4 | 1,20 |
| 5 | 8,70 |
| 6 | 2,40 |
| 7 | 19,10 |
| 8 | 9,20 |

5 Conclusão

A purificação das enzimas queratinases utilizando a técnica de precipitação mostrou



resultados de atividade enzimática elevados quando comparado com o extrato bruto. Para os testes de degradação utilizando o extrato enzimático concentrado pode-se notar que o ensaio 1 foi de maior degradação. Pode-se salientar a possibilidade de que a formulação química dos agentes precipitantes age diferentemente na ação das enzimas, mostrando que as maiores atividades não estão intimamente relacionadas com as maiores degradações.

Referências

BORZANI, Walter; LIMA, Urgel A.; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Blucher, 2001. 1254 p.

BRESSOLLIER, Philippe; LETOURNEAU, François; URDACI, Maria; VERNEUIL, Bernard. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v. 65, n. 6, p.2570-2576, jun. 1999.

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.

Palavras-chave: extrato enzimático; precipitação; biodegradação; solventes orgânicos.

Financiamento

Fapergs.