

PRODUÇÃO DE ENZIMAS QUERATINASES EM LARGA ESCALA VISANDO APLICAÇÃO NA ÁREA AMBIENTAL

ANDRESSA JANAINA WARKEN^{1,2*}, SIMONE KUBENECK³, HELEN TREICHEL^{2,4}

1 INTRODUÇÃO

As queratinases são enzimas capazes de hidrolisar resíduos contendo queratina que devido a baixa produção relativa apresenta alto custo na forma comercial. A queratina é uma proteína que pode ser encontrada em pelos, penas, bicos e cascos de mamíferos e aves (DIPANKAR; BHAN, 2019), sendo composta por ligações cruzadas de dissulfetos e hidrogênio e caracterizada pela sua estabilidade, resistência e impermeabilidade (GOPINATH et al., 2015).

As queratinases (EC 3.4.21 / 24 / 99.11) por sua vez são enzimas proteases capazes de hidrolisarem queratinas por meio de processos fermentativos ambiental e economicamente viáveis devido a sua capacidade de promover a degradação da queratina através de reações proteolíticas e da redução de ligações dissulfeto (SRIVASTAVA et al., 2020).

Atualmente no Brasil, resíduos industriais contendo queratina são gerados em grande escala diariamente advindos, por exemplo, da produção de carne suína, que segundo a Associação Brasileira de Proteção Animal (2018) produz cerca de quatro mil toneladas de carne anualmente, o que resulta resíduos como pelos suínos que acabam em aterros ou incinerados (AGRAHARI; WADHWA, 2010).

Neste sentido, a produção de queratinase por meio de processos de baixo custo aliado a utilização de resíduos agroindústrias, se demonstra viável devido a valoração do resíduo em questão, bem como, ao alto custo agregado a enzima comercial, a baixa produção desta enzima e a escassez de estudos nesta área, justifica a sua produção em larga escala via utilização de microrganismos e processos de baixo custo para posterior aplicação em produtos de interesse comercial.

1Graduanda de Engenharia Ambiental Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus Erechim/RS*,

*contato: dessawarken@hotmail.com

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

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

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

2 OBJETIVOS

Avaliar a produção da enzima queratinase em larga escala, utilizando microrganismos com potencial de produção dessa enzima, bem como caracterizar e avaliar a estabilidade enzimática visando posterior aplicação na área ambiental.

3 METODOLOGIA

Para a composição do substrato, utilizou-se resíduo queratinoso advindo de pelos suínos os quais foram coletados de uma agroindústria local e armazenados a -4°C . Posteriormente passou por uma redução da carga microbiana ao ser lavado em água corrente e seco a 60°C durante 4 horas conforme adaptação da metodologia de Calin e colaboradores (2017).

A produção da queratinase foi executada em biorreator com volume total de 3L, ao qual foram adicionados 3L de tampão TRIS HCl 50mM pH 8,5 e 10g/L de pelos suínos como substrato e fonte de carbono, nitrogênio e fósforo conforme adaptação de Preczeski e colaboradores (2020). O biorreator contendo os itens citados anteriormente foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1,1atm durante 40 minutos (BONATTO et al., 2020) para posterior adição do inóculo contendo o microrganismo *Fusarium oxysporum*.

A medida de atividade enzimática foi determinada conforme adaptação de Bressolier e colaboradores (1999), na qual foram utilizados 3,2mL de tampão TRIS HCl 50mM pH 8,5, 0,013g de azoqueratina comercial (SIGMA-ALDRICH Keratin Azure K8500) e 0,8mL do extrato enzimático obtido. Após a adição dos componentes a solução foi colocada em banho ultratermostático a 50°C durante 1 hora e posteriormente a reação cessada com a adição de 0,8mL de ácido tricloroacético 10% (TCA).

A absorbância das amostras foi medida a 595nm e o teor de proteína medido seguindo o método de Bradford (1976), através de albumina de soro bovino como padrão (SIGMA A3294) e a estabilidade avaliada a cada 7 dias após o fim da fermentação no 9º dia. A caracterização do extrato foi realizada em diferentes temperaturas e pHs, neste sentido, avaliou-se o comportamento do extrato obtido em pH entre 6,38 e 10,62 e temperatura entre 21 e 78°C , por meio dos tampões Tris HCl 50 mM pH 8,5, Carbonato/Bicarbonato de Sódio 50 mM pH 10 e 10,62 e Fosfato de Sódio 50 mM pH 6,38 e 7,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fermentação realizada utilizando o microrganismo *Fusarium oxysporum* teve a duração de 9 dias nos quais foram realizadas medidas diárias da atividade enzimática e teor de proteína para a obtenção da atividade (U/mL) e da atividade específica (U/mg) conforme a Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Atividade enzimática

DIA	ATIVIDADE (U/ML)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/MG)
0	4,17	21,22
1	3,80	27,34
2	6,83	89,85
3	9,33	89,88
4	10,5	71,70
5	10,83	89,91
6	21,00	89,92
7	39,00	266,39
8	16,33	18,55
9	23,33	15,69

Fonte: a autora.

A partir dos dados obtidos durante a fermentação enzimática pode-se perceber que a atividade enzimática nestas condições aumenta gradualmente até o sétimo dia atingindo o ápice de seu resultado com um aumento de aproximadamente 9,4 vezes em comparação atividade inicial medida e de aproximadamente 12,55 vezes em comparação a atividade específica medida no primeiro dia. Após o fim da fermentação o extrato permaneceu estável em aproximadamente 12U/ml durante o período avaliado.

Conforme a avaliação da caracterização enzimática observada em diferentes temperaturas, pHs e tampões, pode-se observar que o aumento da atividade enzimática se dá com o aumento do pH e da temperatura, neste sentido, as melhores atividades enzimáticas obtidas podem ser observadas segundo a Tabela 2, o que demonstra que a enzima gerada através da utilização de pelos suínos como substrato apresenta melhores resultados em pHs alcalinos aliados a altas temperaturas.

Tabela 2. Melhores resultados obtidos durante a caracterização enzimática.

TAMPÃO	TEMPERATURA (°C)	pH	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/ML)
Carbonato/ Bicarbonato	70	10,00	55,40
Carbonato/ Bicarbonato	50	10,62	26,50
TRIS HCl 50mM	78,28	8,50	27
Fosfato de Sódio 50mM	70	7,00	17,80

Fonte: a autora.

5 CONCLUSÃO

Conforme os resultados obtidos ao longo da pesquisa, a fermentação utilizando como substrato resíduo agroindustrial de pelos suínos e o microrganismo *Fusarium oxysporum*, para a produção de enzimas queratinases pode-se concluir que o processo é eficaz para a ampliação de escala tendo em vista o baixo custo de sua aplicação, a utilização de resíduos gerados em larga escala industrialmente e o resultado obtido ao fim do sétimo dia de fermentação que mostrou um incremento significativo em comparação ao estado inicial da fermentação. A caracterização do extrato obtido demonstrou que a enzima apresenta predileção por processos com pHs alcalinos e em temperaturas mais elevadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAHARI, S.; WADHWA, N. Degradation of Chicken Feather a Poultry Waste Product by Keratinolytic Bacteria Isolated from Dumping Site at Ghazipur Poultry Processing Plant. *International Journal of Poultry Science*, v. 9, p. 482–489, 2010.
- BONATTO, C.; VENTURIN, B.; MAYER, D.P.; BAZOTI, S.F.; OLIVEIRA, D. D.; ALVES JR, S.L.; TREICHEL, H. Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2445–2450, 2020.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976
- BRESSOLLIER, P., LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 2570–2576, 1999.
- CĂLIN, M.; CONSTANTINESCU-ARUXANDEI, D.; ALEXANDRESCU, E.; RAUT, I.; DONI, M.B.; ARSENE, M.L.; OANCEA, F.; JECU, L.; LAZAR, V. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 28, p. 101–112, 2017.
- DIPANKAR, P.; BHAN, C. Role of keratinase in bioremediation of feathers and hairs. *Smart Bioremediation Technologies*, p. 83-98, 2019.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T.H.; CHEN, Y.; HASHIM, U.; RUSLINDA, A.R.; ARSHAD, M. K. MD. Biotechnological Aspects and Perspective of Microbial Keratinase Production. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- PRECZESKI, K. P.; DALASTRA, C.; CZAPELA, F. F.; KUBENECK, S.; SCAPINI, T.; CAMARGO, A. F.; ZANIVAN, J.; BONATTO, C.; STEFANSKI, F. S.; VENTURIN, B.;

FONGARO, G.; TREICHEL, H. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp . as Keratinase Producers Using Swine Hair From Agroindustrial Residues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 1–8, 2020.

SRIVASTAVA, B.; KHATRI, M.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications. *Journal of Cleaner Production*, v. 252, p. 1-26, 2020.

Palavras-chave: Microrganismo; resíduos queratinosos; caracterização.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2020-0196

Financiamento: CNPq