

PURIFICAÇÃO DE QUERATINASES FUNGICAS POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO PARA POSTERIOR APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS QUERATINOSOS.

**LAURA HELENA DOS SANTOS^{1,2*}, ALINE FRUMI CAMARGO²,
CHARLINE BONATTO³, HELEN TREICHEL⁴**

1 Introdução

A queratina é uma proteína presente em diversos organismos como mamíferos e aves, e pode ser encontrada em pelos, penas, bicos e cascos (DIPANKAR; BHAN, 2019), por ser formada por estruturas tridimensionais que possuem ligações de dissulfeto e pontes de hidrogênio e pode ser classificada em α -queratina ou β -queratina, sendo a α -queratina encontrada em mamíferos, e a β -queratina em aves e reptéis (CHEN; MCKITTRICK; ANDRÉ, 2012; WANG et al., 2016). Por conta dessas características os resíduos queratinosos são de difícil degradação e acabam sendo prejudiciais ao meio ambiente.

No Brasil, estima-se que por ano são produzidas 4 milhões de toneladas de produção de carne suína (ABPA, 2022). Por conta da alta demanda de resíduos que contém queratina, e a mesma ser de difícil degradação, as queratinases tornam-se uma aliada nesse processo. As queratinases também podem ser utilizadas em outros processos, como fabricações de biogás, fertilizantes e também na indústria farmacêutica.

2 Objetivo

Avaliar o potencial de produção de queratinases por microrganismos isolados de resíduos queratinosos, bem como, a purificação dos extratos enzimáticos obtidos por meio de sistema aquoso bifásico para posterior aplicação na degradação de pelos suínos.

¹ Graduanda em Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Erechim, *contato: lauraahds1@gmail.com

² Grupo de Pesquisa: Agroenergia

² Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, UFFS, campus Erechim

⁴ Mestre Engenharia em Química, UFSC

⁵ Doutora em Engenharia de Alimentos, UFFS, campus Erechim, **ORIENTADORA**

3 Metodologia

3.1 Matéria prima

Os resíduos queratinosos usados neste estudo foram pelos de suínos obtidos de agroindústria e propriedades rurais. Os resíduos queratinosos foram mantidos em embalagens de polietileno, sendo armazenados a -4°C .

3.2 Seleção do microrganismo produtor de queratinases

Conforme a metodologia de Preczeski e colaboradores (2020) para fermentação submersa, foram utilizados os pelos de suínos como substrato. O meio que foi utilizado para fermentação foi composto de 10g.L^{-1} de pelos de suíno, $0,1\text{L}$ de tampão Tris HCl 50mM , e o inóculo contendo o microrganismo *Aspergillus*, que foi escolhido como o produtor de queratinase. O meio foi incubado no agitador orbital a 150RPM .

3.3 Fermentação submersa

Foi realizada a autoclavagem do biorreator contendo o tampão, o substrato e posteriormente adicionado o inóculo, no início da fermentação. Foram verificadas as atividades enzimáticas diariamente conforme a medida das absorbâncias obtidas durante o período de fermentação, e a partir dessas medidas foram calculadas a atividade e a atividade específica das enzimas presentes no substrato, até o nono dia da fermentação.

3.4 Determinação da atividade enzimática

A quantificação da atividade queratinolítica foi realizada conforme a metodologia de Bressollier e colaboradores (1999), a qual consiste em $0,8\text{ mL}$ da enzima, $3,2\text{ mL}$ de tampão Tris HCl e $0,013\text{g}$ de azoqueratina, que após foi para o banho ultratermostático a 50°C durante uma hora. Para encerrar a reação foi utilizado $0,8\text{mL}$ de ácido tricloroacético 10% e medido a absorbância no espectrofotômetro a 595nm .

3.5 Determinação do teor de proteína

O teor de proteína do extrato enzimático bruto e purificado foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão (SIGMA A3294).

3.6 Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Para o sistema aquoso bifásico (SAB) foram utilizados os sais Fosfato de Sódio e Cloreto de Sódio, e o mesmo foi realizado conforme a metodologia de Albertsson (1986), o qual continha 40% peso/volume de sal e 50% peso/volume de polietilenoglicol (PEG), com

massa molar igual a 1500, variando as concentrações do extrato enzimático, nas soluções aplicadas. As soluções foram agitadas no vórtex e colocadas em banho de gelo a 5°C por 20 minutos. Após a separação de fases em topo e fundo, foi realizado a medida de atividades do sobrenadante e precipitado.

4 Resultados e Discussão

A fermentação foi realizada utilizando o microrganismo *Aspergillus*, durante nove dias nos quais foram realizadas as medidas diárias da atividade enzimática e teor de proteína para obter a atividade (U/mL) e a atividade específica (U/mg). As atividades medidas apresentaram crescimento até o sétimo dia de fermentação, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos no processo fermentativo em termos de atividade enzimática.

Dias	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
1	9,66	112,30
2	16,50	121,14
3	39,66	188,99
4	52,16	281,63
5	80,66	329,04
6	97,16	307,51
7	63,16	259,97
8	70,16	286,21
9	66,83	247,33

Fonte: Autoria própria

Para o Sistema Aquoso Bifásico (SAB) as amostras que foram utilizadas com fosfato de sódio e cloreto de sódio apresentaram maiores atividades (U/mL) para topo e fundo conforme a Tabela 2. As atividades de fundo apresentaram atividades baixas, o que indica que a atividade enzimática migrou para o topo do sistema.

Os resultados referentes a purificação e ao fator de recuperação estão apresentados na Tabela 3. Enquanto a adição da solução salina aumenta a recuperação enzimática, o fator de purificação diminui, também se nota que a variação na quantidade de PEG, influencia diretamente no fator de purificação.

Tabela 2. Atividade específicas após o SAB.

Topo		Fundo	
Cloreto de sódio (U/mL)	Fosfato de sódio (U/mL)	Cloreto de sódio (U/mL)	Fosfato de sódio (U/mL)
35,33	158,11	150,75	46,3
250,98	162,61	140,34	10,17
176,66	139,32	97,66	9,192
238,59	150,76	189,56	11,63
243,99	190,27	114,46	12,38
140,33	183,83	88,41	13,54
182,13	202,87	100,46	7,71

Fonte: Autoria própria

Tabela 3. Fator de purificação e recuperação

Fator de purificação (FP)		Fator de recuperação (FR)	
Cloreto de sódio	Fosfato de sódio	Cloreto de sódio	Fosfato de sódio
4,09	2,92	52,00%	35,00%
4,36	3,01	36,00%	23,50%
3,07	2,58	41,00%	25,80%
4,14	2,79	27,00%	18,14%
4,24	3,52	31,00%	17,30%
2,44	3,40	30,70%	19,40%

Fonte: Autoria própria

5 Conclusão

Através da fermentação efetuada utilizando como substrato resíduo agroindustrial proveniente de pelos suínos com a utilização do microrganismo *Aspergillus*, o qual foi utilizado para a produção das enzimas queratinases pode-se concluir que o processo é eficaz quanto a ampliação de escala. Considerando um processo de baixo custo e a utilização de resíduos gerados em larga escala, a aplicação desta metodologia para os resíduos queratinosos se mostrou promissora e com eficácia. Para o Sistema Aquoso Bifásico, notou-se que os



parâmetros sal e PEG influenciam diretamente na purificação do extrato queratinoso, sendo uma alternativa economicamente viável para uso em ampla escala e também no desenvolvimento de trabalho científico. A purificação de queratinases por sistema aquoso bifásico é uma alternativa sustentável e eficaz.

Referências

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Produção Brasileira de Carne Suína e Carne de Frango. Disponível em: < <https://abpa-br.org/mercados/> > Acesso em: 20 ago. 2022.

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3 ed.: *Wiley-Interscience*, 346 p., 1986

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.

CHEN, P.; MCKITTRICK, J.; MEYERS, M.A. Biological materials : Functional adaptations and bioinspired designs. *Progress in Materials Science*, v. 57, p. 1492–1704, 2012.

DIPANKAR, P.; BHAN, C. Role of keratinase in bioremediation of feathers and hairs. *Smart Bioremediation Technologies*, p. 83-98, 2019.

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.

Palavras-chave: *Aspergillus*, fungos, enzimas, queratinases

Fonte de Financiamento: CNPq

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2021-0298