

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA ENZIMA QUERATINOLÍTICA TRATADA EM LÍQUIDOS IÔNICOS

**MATTOS, Natália Vergara; BORBA, Thais de Matos de; BRANDELLI, Adriano
KALIL, Susana Juliano
nativmattos@gmail.com**

**Evento: Congresso de Iniciação Científica
Área do conhecimento: Ciências Agrárias**

Palavras-chave: queratinase; *Bacillus*, termoestabilidade.

1 INTRODUÇÃO

Queratinases são proteases diferenciadas por sua ação sobre substratos recalcitrantes como a queratina (BACH et al., 2011) e podem ser utilizadas na conversão de resíduos agroindustriais em produtos com valor agregado (ANITHA; PALANIVELU, 2013). O uso de líquidos iônicos (LI) é uma tecnologia promissora e aplicável na estabilização de enzimas, sendo capazes de manter sua estrutura tridimensional por períodos maiores de tempo em altas temperaturas (PATEL; KUMARI; KHAN, 2014) com melhoria da seletividade pelo substrato. O objetivo deste trabalho foi avaliar a termoestabilidade da queratinase em quatro líquidos iônicos e determinar a temperatura e pH ótimos no líquido iônico escolhido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

LI são sais compostos por íons, com propriedades físico-químicas ajustáveis (LOZANO, 2010) que estão atraindo interesse em estudos como agentes estabilizantes de enzimas e meio em biocatálises (RANTWIJK; SHELDON, 2007). As enzimas celulase, peroxidase e α -quimotripsina apresentam estabilidade em LIs, porém há carência de estudos de estabilização da queratinase nestes meios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

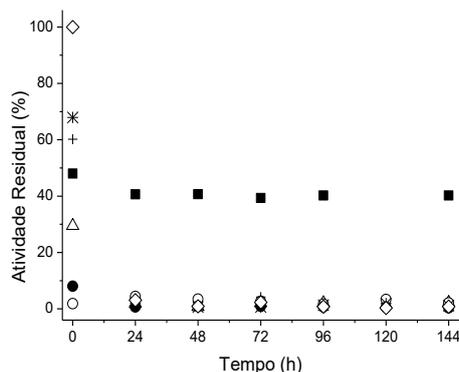
A bactéria *Bacillus* sp. P45 foi utilizada na produção da queratinase. O cultivo foi realizado conforme DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI (2011) e a enzima foi purificada segundo SALA et al. (2014). A termoestabilidade foi avaliada na queratinase tratada nos LIs 1,3-dimetilimidazólio metil sulfato [Mmim][CH₃SO₄], trietilamônio acetato TEAA, 1-butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato [Bmim][PF₆] e 1-etil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida [Emim][Tf₂N], durante 144 h a 55°C. A meia vida ($t_{1/2}$) e a constante de desnaturação (k_d) foram determinados nas temperaturas de 55 e 70°C em meio contendo a enzima tratada no LI com melhor ação protetora. A temperatura e pH ótimos foram determinados na reação enzimática, nas faixas de 30 a 70°C e pH de 6 a 9, respectivamente.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Nas cinéticas obtidas durante 144 h (Figura 1), o melhor comportamento de termoestabilidade da queratinase foi quando tratada no LI [Emim][Tf₂N], pois embora

perdendo 52% da sua atividade inicial, em relação a amostra controle, sua atividade catalítica foi mantida durante as 144 h de armazenamento. No restante dos LI testados a atividade enzimática foi perdida nas primeiras 24 h de contato, mostrando serem agentes desestabilizantes da enzima queratinase.

Figura 1- Estabilidade da queratinase nos líquidos iônicos a 55°C (■[Emim][Tf₂N], △ [Bmim][PF₆], ○[Mmim][CH₃SO₄] 50% (v/v), ●[Mmim][CH₃SO₄] 100% (v/v), +TEAA 50% (v/v), * TEAA 100% (v/v), ◇Controle).



Os parâmetros cinéticos foram determinados na enzima controle e na tratada em [Emim][Tf₂N]. Na temperatura de 55°C a meia vida da enzima tratada não foi determinada, pois, a atividade permaneceu em torno de 70% da atividade inicial durante 32 dias. Na temperatura de 70°C, a enzima tratada foi perdendo gradativamente a atividade, apresentando $t_{1/2}$ de 6,4 h. A enzima controle apresentou $t_{1/2}$ de $6,1 \cdot 10^{-2}$ h e $7,1 \cdot 10^{-3}$ h, em 55 e 70°C, respectivamente. Na determinação do k_d foi possível constatar que os valores aumentaram com a temperatura e que essa constante é inversamente proporcional a meia vida. A temperatura ótima da atividade da protease foi de 50°C e pH ótimo igual a 8 indicando um caráter predominantemente alcalino da enzima neste LI.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A queratinase apresentou melhor termoestabilidade quando tratada no líquido iônico [Emim][Tf₂N]. Na temperatura de 55°C, 70% da atividade inicial foi mantida durante 32 dias. A 70°C a meia vida foi de 6,4 h. A temperatura e pH ótimos para a protease queratinolítica tratada neste LI foi de 50°C e 8 respectivamente.

AGRADECIMENTOS CAPES, CNPQ e FAPERGS-PROBIC.

REFERÊNCIAS

- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 214-220, 2013.
- BACH, E.; CANNAPAN, F. S.; DUARTE, F. R. S.; TAFFAREL, J. A. S.; TSAI, S. M.; BRANDELLI, A. characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 65, p. 102-107, 2011.
- DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.
- LOZANO, P. Enzymes in neoteric solvents: From one-phase to multiphase systems. **Green Chemistry**, v. 12, p. 555-569, 2010.
- PATEL, R.; KUMARI, M.; KHAN, A. B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3701-3720, 2014.
- RANTWIJK, F. van; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2757-2785, 2007.
- SALA, L.; GAUTÉRIO, G. V.; YOUNAN, F. F.; BRANDELLI, A.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Integration of ultrafiltration into an aqueous two-phase system in the keratinase purification. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2016-2024, 2014.