

# 13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

## PROPRIEDADES CINÉTICAS DE QUERATINASE PURIFICADA

ÁLVARES, Gabriel Teixeira; LEMES, Ailton Cesar; BRANDELLI, Adriano  
KALIL, Susana Juliano  
[gabrielalvares@gmail.com](mailto:gabrielalvares@gmail.com)

**Evento:** Mostra de Produção Universitária  
**Área do conhecimento:** Ciências Agrárias

**Palavras-chave:** protease, queratinase, desnaturação térmica.

### 1 INTRODUÇÃO

A enzima queratinase é uma protease que pode ser obtida a partir do cultivo submerso do *Bacillus* sp. P45 utilizando farinha de penas como substrato. Dependendo da espécie do micro-organismo produtor, suas características podem ser bastante diversificadas, sendo necessário estudos de determinação cinética e térmica desta enzima, uma vez que estes dados podem fornecer informações importantes para sua utilização industrial. Desta forma, com base na importância de definir as características da enzima queratinase obtida do *Bacillus* sp. P45, principalmente para viabilizar sua utilização industrial, este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades enzimáticas em termos de meia vida ( $t_{1/2}$ ), constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e energia da reação de desativação.

### 2 REFERENCIAL TEÓRICO

As proteases específicas produzidas por micro-organismos queratinolíticos são chamadas de queratinases. Estas enzimas distinguem-se de outras proteases pela maior capacidade de degradação de substratos compactos e insolúveis como a queratina (ONIFADE et al., 1998). Dependendo da espécie do micro-organismo produtor, as características destas enzimas pode ser bastante diversificada, sendo necessário estudos de determinação cinética e térmica das enzimas obtidas em processos fermentativos. Os estudos de desnaturação térmica ajudam a entender a relação entre a estrutura e a função de uma enzima em particular. As enzimas são desnaturadas de diversas maneiras para um estado inativado, sendo esta a principal restrição em muitos bioprocessos. A partir dos dados de estabilidade da enzima pode-se fornecer informações da estrutura da enzima e ajudar a aperfeiçoar a viabilidade econômica de processos industriais (YU; LI, 2006). Assim, a determinação da meia-vida, a constante de desnaturação térmica e da energia de ativação é fundamental para que a enzima queratinase possa ser utilizada de forma efetiva.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A enzima queratinase foi produzida através do cultivo submerso do *Bacillus* sp. P45 utilizando farinha de pena como substrato (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2011). O extrato enzimático obtido ao final do cultivo foi purificado a partir de uma sequência de dois sistemas aquosos bifásicos integrados ao processo de diafiltração (SALA, 2013). A estabilidade térmica da enzima foi verificada em pH 7,5 para as temperaturas de 40 a 60°C em termos de meia vida ( $t_{1/2}$ ), constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e energia da reação de desativação ( $E_d$ ).

# 13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

Para estes estudos, a enzima foi incubada em cada temperatura até que perdesse no mínimo 50% de sua atividade inicial. A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia descrita por Daroit, Corrêa e Brandelli (2009).

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A determinação dos parâmetros cinéticos ajuda a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, bem como o efeito da temperatura na desnaturação. A partir dos resultados apresentados na Tabela 1 é possível verificar que a constante cinética de desnaturação térmica ( $K_d$ ) é inversamente proporcional à meia vida da enzima. É possível verificar também que a enzima é mais estável em temperaturas mais baixas, próximas a 40°C, e que a desnaturação ocorre de maneira mais rápida com a elevação da temperatura de incubação. O valor de  $E_d$  encontrado foi de 112,9 kJ/mol e representa a barreira de energia a ser transposto para a inativação da enzima, quanto maior o valor de  $E_d$  maior a estabilidade da enzima.

**Tabela 1** - Valores experimentais do  $t_{1/2}$ ,  $K_d$  e  $E_d$  para a enzima queratinase purificada, em função da temperatura.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (min)	$K_d$	$E_d$ (kJ/mol)
40	57,7	0,0002	
45	19,3	0,0006	
50	6,8	0,0017	112,9
55	5,0	0,0023	
60	4,4	0,0026	

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enzima purificada mostrou uma redução da meia vida com o aumento da temperatura de incubação. A constante de desnaturação térmica ( $K_d$ ) foi inversamente proporcional a meia vida da enzima. A energia da reação de desativação ( $E_d$ ) da enzima encontrada foi de 112,9 kJ/mol.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à FAPERGS e à CAPES pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

DAROIT, D.J.; CORRÊA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.3, p.358-363, 2009.

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 and Biodegradation*, v.65, n.1, p.45-51, 2011.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL-MUSALLAM, A.A.; AL-ZARBAN, S. A review: potential of biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed sources. *Bioresource Technology*, v.66, p.1-11, 1998.

SALA, L. Purificação de queratinase por SAB integrado à UF. Dissertação de mestrado (Mestrado em Eng<sup>a</sup> e Ciência de Alimentos). FURG, Rio Grande, RS,

## 13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

2013.

YU, X.W.; LI, Y.Q. Kinetics and thermodynamics of synthesis of propyl gallate by mycelium-bound tannase from *Aspergillus niger* in organic solvent. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic v. 40, p. 44-50, 2006.