

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 26/02/2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes

**Avaliação das propriedades biotecnológicas de quitinases e
queratinases produzidas por fungos e bactérias**

São José do Rio Preto

2024

Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes

Avaliação das propriedades biotecnológicas de quitinases e queratinases produzidas por fungos e bactérias

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2024

M543a	Menezes, Cíntia Lionela Ambrósio de Avaliação das propriedades biotecnológicas de quitinasas e queratinases produzidas por fungos e bactérias / Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes. -- São José do Rio Preto, 2024 184 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Ronivaldo Rodrigues da Silva Coorientadora: Eleni Gomes 1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas microbianas. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Cíntia Lionela Ambrósio de Menezes

Avaliação das propriedades biotecnológicas de quitinases e queratinases produzidas por fungos e bactérias

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Gabriela Salvador de Amo
Instituto Federal – Catanduva

Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins
UEMG – Câmpus Frutal

Prof^a. Dr^a. Tatiane Beltramini Souto
Instituto Federal - Campus Passos

Prof^a. Dr^a. Lilian Caroline Gonçalves de Oliveira
UNIFESP – São Paulo

São José do Rio Preto

26 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida.

A minha família, começando por meu esposo Adriano Almeida, pelo apoio, paciência, carinho, por ter trazido paz ao meu coração e leveza aos dias difíceis. Aos meus pais José e Leonice, obrigada por serem abrigo, vocês são a maior razão por eu nunca ter desistido. Ao meu irmão Júlio Cezar, obrigada pelo incentivo, cuidado, amparo, proteção e amor. Vocês são meu combustível para seguir.

Ao meu orientador Dr. Roni, obrigada pela confiança em meu trabalho, pelo respeito, pela troca de conhecimento, pela compreensão e principalmente por se fazer presente durante toda minha jornada acadêmica, sua total dedicação me manteve firme aos objetivos propostos. Com todo meu respeito, a você eu agradeço.

A Profa. Dra. Eleni Gomes pela coorientação, disponibilização do laboratório no qual desenvolvi o projeto.

A todos meus colegas do Laboratório Bioquímica e Microbiologia aplicada do IBILCE/UNESP, pela amizade, pelas risadas, compreensão e ajuda com o trabalho e nas atividades do laboratório.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia e a UNESP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 à qual agradeço.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Resumo

As pesquisas em tecnologia enzimática e de fermentações têm aumentado significativamente e impulsionado o desenvolvimento industrial sustentável. Estudos voltados a minimizar os custos de produção, otimização de processos, aumentar a qualidade de produtos e/ou reduzir os possíveis prejuízos ambientais de tecnologias vigentes, tem ganhado crescente notoriedade. No Brasil, as empresas que se destacam na aplicação de enzimas atuam na área de diagnósticos, indústria farmacêutica, de alimentos e bebidas, produtos médico hospitalares, indústria química, indústria têxtil, couro, papel e celulose, ração animal, saneantes, cosméticos, produtos veterinários e por fim bioinsumos agrícolas; essa última tem crescido consideravelmente. O presente trabalho foi dividido em capítulos que abordam os resultados de experimentos com quitinases e queratinases microbianas. Tais enzimas são de grande interesse para aplicações biotecnológicas, especialmente no setor agrícola onde têm ganhado expressiva evidência nos últimos anos. O capítulo I propõe um abrangente referencial teórico sobre as duas classes de enzimas e suas aplicações. No capítulo II, três espécies fúngicas foram selecionadas para a produção de enzimas quitinolíticas, sendo *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum* e *Coriolopsis byrsina*. Este estudo foi conduzido visando demonstrar a possibilidade de utilização de substrato agroindustrial como indutor da produção de quitinase. Também foi realizada a caracterização bioquímica funcional das enzimas e testes de aplicação para a remoção de biofilmes. O capítulo III apresenta dados relacionados à degradação de resíduo de queratina; foi investigada a capacidade da bactéria *Bacillus cereus* em hidrolisar penas de frango. As características bioquímicas funcionais das enzimas do extrato bruto foram investigadas, assim como as propriedades bioativas do hidrolisado proteico. O capítulo IV exibe a capacidade da bactéria *Ochrobactrum intermedium* em hidrolisar penas de frango, a caracterização bioquímica funcional das enzimas resultantes e aplicações biotecnológicas dos hidrolisados proteico. Esses achados destacam a possibilidade de uso desses microrganismos para produção de enzimas como uma alternativa ambientalmente segura para tratar resíduos provenientes de atividade industrial, visando ofertar produtos biotecnológicos e sustentáveis.

Palavras-chave: Enzimas microbianas. Queratinase. Quitinase. Resíduos de pena. Proteases. Glicosil hidrolases.

Abstract

Research in enzyme and fermentation technology has increased significantly and driven sustainable industrial development. Studies aimed at minimizing production costs, optimizing processes, increasing product quality and/or reducing possible environmental damage from current technologies have gained increasing notoriety. In Brazil, companies that stand out in the application of enzymes operate in the area of diagnostics, pharmaceutical industry, food and beverages, hospital medical products, chemical industry, textile industry, leather, paper and cellulose, animal feed, sanitizing products, cosmetics, products veterinary and finally agricultural bioinputs, this has grown considerably. The present work was divided into chapters that address the results of experiments with microbial chitinases and keratinases. Such enzymes are of great interest for biotechnological applications, especially in the agricultural sector where they have gained significant evidence in recent years. Chapter I proposes a comprehensive theoretical framework on the two classes of enzymes and their applications. In chapter II, three fungal species were selected for the production of chitinolytic enzymes, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum* and *Corioloropsis byrsina*. This study was conducted to demonstrate the possibility of using an agro-industrial substrate as an inducer of chitinase production. Biochemical characterization of the enzymes and application tests for the removal of biofilms were also carried out. Chapter III presents data related to the degradation of keratin residue, the ability of the bacteria *Bacillus cereus* to hydrolyze chicken feathers was investigated, the studies were conducted using the enzymes in the crude extract and applications of protein hydrolysates. In chapter IV, the ability of the bacterium *Ochrobactrum intermedium* to hydrolyze chicken feathers, characterization of the resulting enzymes and biotechnological applications of protein hydrolysates were investigated. These findings highlight the potential for using these microorganisms to produce enzymes as an environmentally safe alternative to treating waste from industrial activities, aiming at the possibility of offering biotechnological and sustainable products.

Keywords: Microbial enzymes. Keratinase. Chitinase. Feather residues. Proteases. Glycosyl hydrolases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A - Estrutura primária de quitina (n representante o grau de polimerização). B- Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina (as setas representam as cadeias poliméricas)	24
Figura 2 -	Mecanismo de ação de quitinases	26
Figura 3 -	Classificação de quitinases microbianas	27
Figura 4 -	Aplicações biotecnológicas de quitinases	30
Figura 5 -	Fermentação com quitina coloidal (A e B) e casca de cigarra (C e D) como substrato em diferentes composições de meio de cultura para <i>C. byrsina</i> . Os pontos representados nos gráficos expressam os valores de médias (n=3) e as barras de erro o desvio padrão	93
Figura 6 -	Fermentação com quitina coloidal (A e B) e casca de cigarra (C e D) como substrato em diferentes composições de meio de cultura para <i>T. harzianum</i> . Os pontos representados nos gráficos expressam os valores de médias (n=3) e desvio padrão	95
Figura 7 -	Fermentação com quitina coloidal (A e B) e casca de cigarra (C e D) como substrato em diferentes composições de meio de cultura para <i>T. reesei</i> . Os pontos representados nos gráficos expressam os valores de médias (n=3) e desvio padrão	96
Figura 8 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das endoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre réplicas (n=3)	

	de cada medida	99
Figura 9 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das exoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DP) entre réplicas (n=3) de cada medida	102
Figura 10 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das endoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>T. harzianum</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DV) entre réplicas (n=3) de cada medida	104
Figura 11 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das exoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>T. harzianum</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DV) entre réplicas (n=3) de cada medida	106
Figura 12 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das endoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>T. reesei</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DV) entre réplicas (n=3) de cada medida	109
Figura 13 -	Efeito de pH (A) e temperatura (B) na atividade e estabilidade das exoquitinases presentes no extrato fermentativo de <i>T. reesei</i> . As barras de erro representam o desvio padrão (DV) entre réplicas (n=3) de cada medida	111
Figura 14 -	Remoção do biofilme de <i>C. albicans</i> por enzimas do extrato enzimático de <i>T. reesei</i>	114

- Figura 15 - Cultivo da bactéria *B. cereus* em 50 mL de meio submerso (frascos erlenmeyer de 250 mL) suplementado com 0,5% de pena de galinha, pH inicial 7,2. Após inóculo de 2,5 mg de biomassa seca, os frascos erlenmeyer foram incubados a 30 °C (estufa BOD) e 150 rpm por 132 h. As amostras foram coletadas a cada 12 horas para monitoramento da DO a 600 nm, degradação de penas (g), proteína total solúvel (mg/mL) e grupos tiol (mg/L). DO (densidade óptica)134
- Figura 16 - Cultivo da bactéria *B. cereus* em 50 mL de meio submerso (frascos erlenmeyer de 250 mL) suplementado com 0,5% de pena de galinha, pH inicial 7,2. Após inóculo de 5,0 mg de biomassa seca, os frascos erlenmeyer foram incubados a 30 °C (estufa BOD) e 150 rpm por 132 h. As amostras foram coletadas a cada 12 horas para monitoramento da DO a 600 nm, degradação de penas (g), proteína total solúvel (mg/mL) e grupos tiol (mg/L). DO (densidade óptica)135
- Figura 17 - Cultivo da bactéria *B. cereus* em 50 mL de meio submerso (frascos erlenmeyer de 250 mL) suplementado com 0,5% de pena de galinha, pH inicial 7,2. Após inóculo de 10,0 mg de biomassa seca, os frascos erlenmeyer foram incubados a 30 °C (estufa BOD) e 150 rpm por 132 h. As amostras foram coletadas a cada 12 horas para monitoramento da DO a 600 nm, degradação de penas (g), proteína total solúvel (mg/mL) e grupos tiol (mg/L). DO (densidade óptica)137

Figura 18 -	Atividade queratinolítica e caseinolítica de enzimas presentes no extrato fermentativo obtidos com diferentes concentrações de inóculo da bactéria <i>B. cereus</i> (biomassa seca/mL meio de cultivo): A- 2,5 mg/50 mL de meio; B- 5 mg/50 mL de meio e C- 10 mg/50 mL de meio de células	139
Figura 19 -	Capacidade de remoção de radical ABTS e poder redutor dos extratos do cultivo da bactéria <i>B. cereus</i> em meio com pena de galinha. Amostras derivadas dos cultivos com diferentes concentrações de inóculo (biomassa seca/mL meio de cultivo): A- 2,5 mg/50 mL de meio; B- 5 mg/50 mL de meio e C- 10 mg/50 mL de meio	141
Figura 20 -	Atividade de eliminação de radical DPPH dos extratos do cultivo da bactéria <i>B. cereus</i> em meio com pena de galinha. Concentrações de inóculo (biomassa seca/mL meio de cultivo): A- 2,5 mg/50 mL de meio; B- 5 mg/50 mL de meio e C- 10 mg/50 mL de meio	142
Figura 21 -	Atividades quelantes de Cu^{2+} e Fe^{2+} das amostras coletadas em diferentes momentos (12-132 h) de culturas com três diferentes concentrações de inóculo da bactéria <i>B. cereus</i> (biomassa seca/mL meio de cultivo): 2,5 mg/50 mL de meio (A), 5,0 mg/50 mL de meio (B) e 10,0 mg/50 mL de meio (C)	144
Figura 22 -	Cultivo da bactéria <i>O. intermedium</i> em 50 mL de meio submerso (frascos erlenmeyer de 250 mL) suplementado com 0,5% de pena de galinha, pH inicial 7,2. Três diferentes concentrações de inóculo foram avaliadas: 2,5 mg/50 mL de meio (A), 5,0 mg/50 mL de meio (B) e 10,0 mg/50 mL de meio (C). Os frascos erlenmeyer foram incubados a 30 °C (estufa BOD) e 150 rpm por 132 h, e as amostras foram coletadas a	

	cada 12 horas para monitoramento da DO a 600 nm, degradação de penas (g), proteína total solúvel (mg/mL) e grupos tiol (mg/L). DO (densidade óptica)	164
Figura 23 -	Atividades queratinolítica e caseinolítica das amostras coletadas em diferentes momentos (12 a 132 h) de culturas com três concentrações de inóculo da bactéria <i>O. intermedium</i> (biomassa seca/mL meio de cultivo): 2,5 mg/50 mL de meio (A), 5,0 mg/50 mL de meio (B) e 10,0 mg/50 mL de meio (C). A fermentação foi realizada a 30 °C e 150 rpm	165
Figura 24 -	Poder de eliminação de ABTS e redução de Fe ³⁺ das amostras coletadas em diferentes momentos (12-132 h) de culturas com três diferentes concentrações de inóculo da bactéria <i>O. intermedium</i> (biomassa seca/mL meio de cultivo): 2,5 mg/50 mL de meio (A), 5,0 mg/50 mL de meio (B) e 10,0 mg/50 mL de meio (C)	167
Figura 25 -	Atividades quelantes de Fe ²⁺ e Cu ²⁺ das amostras coletadas em diferentes momentos (12-132 h) de culturas com três diferentes concentrações de inóculo da bactéria <i>O. intermedium</i> (biomassa seca/mL meio de cultivo): 2,5 mg/50 mL de meio (A), 5,0 mg/50 mL de meio (B) e 10,0 mg/50 mL de meio (C)	168
Figura 26 -	Caracterização do extrato enzimático do cultivo submerso da bactéria <i>O. intermedium</i> , pH ótimo (A), temperatura ótima (B; C) e estabilidade térmica (D; E) em diferentes substratos. As linhas em vermelho representam os valores para a atividade caseinolítica e as linhas em preto atividade queratinolítica	170
Figura 27 -	Efeito dos inibidores de peptidases na atividade queratinolítica (A) e caseinolítica (B) do extrato do	171

cultivo submerso da bactéria *O. intermedium*

Figura 28 - Dispersão do biofilme estafilocócico após tratamento com extrato enzimático de *O. intermedium* (concentração final de proteína de 108 µg/mL e atividade caseinolítica de 15 U/mL) por 5 h e 24 h. Absorbância relativa (595 nm) de biofilmes corados com cristal violeta a 1% solubilizados com ácido acético glacial a 30%, o máximo Abs. foi considerado como 100% (A), e visualização da remoção do biofilme após o tratamento enzimático (B). A formação do biofilme por *S. aureus* ATCC 25923 foi realizada cultivando a bactéria em uma placa de poliestireno de 6 poços contendo caldo Luria Bertani (LB) e incubada a172 37 °C por 7 dias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo de alguns estudos recentes sobre queratinases e sua origem (produção por fermentação submersa (FSm) e tecnologia recombinante ou enzima comercial), propriedades bioquímicas e suas possíveis aplicações.	42
Tabela 2 -	Queratinases microbianas e hidrolisados proteicos resultantes de seus processos hidrolíticos: microrganismos, sistemas de produção (fermentação submersa (FSm), meios de compostagem e tecnologia recombinante ou enzima comercial), proteína.	51
Tabela 3 -	Interferência de íons metálicos na atividade de endoquitinase no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	100
Tabela 4 -	Interferência de íons na atividade de exoquitinase no extrato fermentativo de <i>C. byrsina</i>	103
Tabela 5-	Interferência de íons na atividade de endoquitinase no extrato fermentativo	105
Tabela 6 -	Interferência de íons na atividade de exoquitinase no extrato fermentativo	107
Tabela 7 -	Interferência de íons metálicos na atividade da endoquitinase no extrato fermentativo de <i>T. reesei</i>	110
Tabela 8 -	Interferência de íons metálicos na atividade da exoquitinase no extrato fermentativo de <i>T. reesei</i>	112
Tabela 9-	Teste de preferência ao substrato para as enzimas presentes nos extratos fermentativos	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

AIA - ácido iodoacético

Asp - ácido aspártico

BHT - hidroxitolueno butilado

C - Cisteína

CBM - módulo de ligação a carboidrato

COS - quitooligossacarídeos

DP - Desvio padrão

DPPH - 2,2- difenil-1- picrilhidrazil

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EPS - substâncias poliméricas extracelulares

F - Fenilalanina

FSm - fermentação submersa

GH - Glicosil hidrolase

Glu - ácido glutâmico

H - Histidina

His - Histidina

kDa - kilodalton

LB - Luria Bertani

Leu - Leucina

Lys - Lisina

M - Metionina

N-ETIL - *N*-etilmaleimida

NacGlc - N-acetil-D-glicosamina

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

Pro - Prolina

ROS - espécies reativas de oxigênio

Rpm - rotação por minuto

SCP - proteínas de organismos unicelulares

TCA - ácido tricloroacético

Tyr - Tirosina

W - Triptofano

Y - Tirosina

YPD - meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.2 QUITINASES	23
1.2.1 Ocorrência da quitina na natureza e suas características	23
1.2.2 Classificação e mecanismo de ação das Quitinases	25
1.2.3. Quitinases fúngicas.....	27
1.2.4. Aplicações de quitinases	29
1.3 QUERATINASES	37
1.3.1 Sustentabilidade industrial de queratinases microbianas: produção e potenciais aplicações.....	37
1.3.2 Estrutura da queratina e sua produção no mundo	37
1.3.4 Degradação da queratina	39
1.3.5 Produção de queratinase	40
1.3.6 Aplicações biotecnológicas.....	55
1.3.6.3 Aplicações biotecnológicas do hidrolisado de proteínas.....	58
1.3.7 Perspectivas futuras	64
Referências.....	65
1.4 OBJETIVOS	82
1.4.1 OBJETIVO GERAL	82
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	82
CAPÍTULO 2	83
ARTIGO.....	83
Aproveitamento de quitina por espécies fúngicas: caracterização de endo e exoquitinases presentes no extrato fermentativo produzidas por fermentação submersa.....	83
Resumo.....	84
2. INTRODUÇÃO	85
2.1 Material e Métodos.....	86
2.1.1 Microrganismos.....	86
2.1.2 Preparação de quitina coloidal.....	87
2.1.3 Fermentação submersa	87
2.1.4 Ensaio de atividade enzimática	88
2.1.5 Caracterização bioquímica funcional das enzimas no extrato fermentativo	89
2.1.6 Quantificação de proteínas totais	91

2.1.7 Teste de remoção de biofilme.....	91
2.2 RESULTADOS.....	92
2.2.1 Otimização nas condições de cultivo para a produção de quitinase.....	92
2.2.2 Fermentação submersa utilizando diferentes fontes de quitina e diferentes formulações de meio de cultura.....	92
2.2.3 Caracterização bioquímica funcional de quitinases presentes no extrato fermentativo	97
2.2.4 Teste de preferência ao substrato para os extratos fermentados com quitina coloidal	113
2.2.5 Remoção de biofilme de <i>C. albicans</i>	114
2.3 DISCUSSÃO	115
2.3.1 Influência do tempo de fermentação e variação na composição do meio de cultura na produção de quitinase fúngica	115
2.3.2 Caracterização enzimática.....	116
2.3.3 Preferência das enzimas ao hidrolisar diferentes substratos.....	118
2.3.4 Remoção de biofilme	119
2.4 Conclusões	120
Referências.....	121
CAPÍTULO 3	125
ARTIGO.....	125
Penas de frango como fonte de queratina para o cultivo submerso de <i>Bacillus cereus</i> : produção de hidrolisado proteico com atividade queratinolítica e antioxidante	125
Resumo.....	126
3. INTRODUÇÃO	127
3.1 Material e métodos.....	129
3.1.2 Microrganismo e fermentação submersa.....	129
3.1.3 Determinação de proteína total e grupo sulfidríla no hidrolisado de penas	130
3.1.4 Ensaio de atividade proteolítica	130
3.1.5 Potencial bioativo de hidrolisados de penas	131
3.2 RESULTADOS.....	133
3.2.1 Fermentação com <i>Bacillus cereus</i> usando pena de galinha como substrato	133
3.2.2 Atividade queratinolítica e caseinolítica dos extratos fermentados	137
3.2.3 Testes de atividade biológica dos hidrolisados	140
3.2.4 Capacidade de quelante de metal	143

3.3 DISCUSSÃO	145
3.3.1 Atividade antioxidante	146
3.4 Considerações parciais	148
Referências	149
CAPÍTULO 4	153
ARTIGO.....	153
A degradação total de penas de frango por <i>Ochrobactrum intermedium</i> resulta em hidrolisados antioxidantes, quelantes e enzimas proteolíticas para dispersão do biofilme estafilocócico.	153
Resumo.....	154
4. INTRODUÇÃO	155
4.1 Material e métodos.....	156
4.1.2 Microrganismo e fermentação submersa.....	156
4.1.3 Determinação da proteína total e grupo sulfidríla em hidrolisado de penas	157
4.1.4 Ensaio de atividade enzimática.....	158
4.1.5 Potencial bioativo dos hidrolisados de penas	159
4.1.6 Efeito do pH, temperatura, estabilidade e inibidores na atividade enzimática.....	161
4.1.7 Remoção de biofilme	161
4.2 RESULTADOS.....	162
4.2.1 Degradação de penas e produção de enzimas	162
4.2.2 Atividades antioxidante e quelante dos hidrolisados de penas	166
4.2.3 Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade de enzimas presentes no extrato fermentativo	169
4.2.4 Remoção de biofilme	172
4.3 DISCUSSÃO	173
4.4 Conclusão	178
Referências.....	179
ANEXO A	183
ANEXO B	184

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, pesquisas em tecnologia enzimática e de fermentações têm impulsionado o desenvolvimento industrial sustentável, seja para minimizar os custos, otimizar o processo, aumentar a qualidade de produtos e/ou reduzir os possíveis impactos ambientais de tecnologias vigentes. Diante desse cenário, a demanda mundial por enzimas tem aumentado significativamente ao longo do tempo (Silva, 2018).

No Brasil, as empresas que se destacam na aplicação de enzimas atuam na área de diagnósticos, seguido pela indústria farmacêutica, de alimentos e bebidas, produtos médico hospitalares e para laboratório. Insumos enzimáticos também são utilizados na indústria química e em atividades relacionadas ao meio ambiente, indústria têxtil, couro, papel e celulose, ração animal, saneantes, cosméticos e produtos veterinários (Politzer; Bon, 2016).

O segmento industrial, especialmente a agroindústria, é responsável pela geração de biomassa residual animal e vegetal que demandam tratamento apropriado, a fim de reduzir impactos ambientais em seu descarte. Neste estudo, utilizamos dois destes resíduos, penas de frango (queratina) e quitina (casca de camarão), provenientes de indústrias produtora de carnes, sendo esses utilizados como substrato para processos de fermentação submersa, direcionando nossa atenção as enzimas capazes de despolimerizá-los.

Em suma, sabe-se que estrutura recalcitrante de queratina dificulta à ação de proteases convencionais (papaína, pepsina, tripsina, entre outras), aumentando o tempo com que esse material, quando descartado de forma inadequada, permanece no ambiente. A degradação de penas a aminoácidos e peptídeos pela ação de queratinases é ecologicamente vantajosa no gerenciamento destes resíduos, uma vez que minimiza a necessidade do uso de tratamentos físico-químicas convencionais, como incineração e hidrólise ácida (Abdel-Fattah et al., 2018; Jana et al., 2022).

Já a quitina é um homopolímero linear composto por unidades de N-acetilglicosamina, que ocupa a posição de segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É encontrada principalmente com uma função

estrutural em conchas de crustáceos, exoesqueletos de insetos, presente na casca do ovo, cutícula, faringe e bainha microfilária de nematoides (Chen et al., 2021) e paredes celulares de muitos fungos (García-Fraga et al., 2015).

Devido a ampla distribuição de quitina na natureza, as quitinases vem ganhando atenção por seu potencial uso como biopesticidas, pois poderiam contribuir no combate a insetos, fungos e nematoides. As quitinases podem degradar diferentes estruturas vitais de pragas, como matriz e cutícula em pragas como insetos, ovo de nematoides e parede celular em fitopatógenos fúngicos (Berini et al., 2018). Enquanto, as queratinases podem fornecer hidrolisados ricos em aminoácidos e outros compostos benéficos ao crescimento de plantas, atividades biológicas entre outras aplicações.

Nesse contexto, investigamos a degradação destes dois resíduos por bactérias e fungos, e posteriormente avaliamos os usos das enzimas e dos hidrolisados resultantes dos cultivos microbianos.

4.4 Conclusão

Como premissa para a prospecção de enzimas de diferentes espécies microbianas, nesta investigação lançamos luz sobre o manejo biológico de material queratinoso, que assume importância seja pelo uso desta cultura bacteriana como mais uma alternativa para degradar penas de frango e fornecer uma proteína hidrolisada valiosa com atividade antioxidante e quelante de metais, enzimas para dispersão de biofilme, e também uma base para estudos futuros para explorar as enzimas secretadas por esta bactéria e genes que podem ser expressos em hospedeiros heterólogos.

Referências

BAIDAMSHINA, D. R. et al. Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 7 abr. 2017.

BAIDAMSHINA, D. R. et al. Biochemical Properties and Anti-Biofilm Activity of Chitosan-Immobilized Papain. **Marine Drugs**, v. 19, n. 4, p. 197, mar. 2021.

BHANGE, K; CHATURVEDI, V; BHATT, R. Potential biofilm dispersal by a partially purified keratinase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* strain Kb2. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 801-805, out. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976.

CALLEGARO, K; WELTER, N; DAROIT, D. J. Feathers as bioresource: microbial conversion into bioactive protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 1-9, dez. 2018.

CHEN, H. et al. Valorization of Livestock Keratin Waste: application in agricultural fields. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 19, n. 11, p. 6681, maio 2022.

MENEZES, C. L. A de. et al. Industrial sustainability of microbial keratinases: production and potential applications. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 2-4, abr. 2021.

DUFFECK, C. E. et al. *Citrobacter diversus*-derived keratinases and their potential application as detergent-compatible cloth-cleaning agents. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 969-977, abr. 2020.

FAKHFAKH, N. et al. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1, and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1731-1737, set. 2011.

FAKHFAKH, N. et al. Wool-waste valorization: production of protein hydrolysate with high antioxidative potential by fermentation with a new keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus*1. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 424-433, jun. 2013.

FONTOURA, R. et al. Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. *New Biotechnology*, v. 49, p. 71-76, mar. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Gateway to poultry production and products - Products and processing. <https://www.fao.org/poultry-production-products/products-processing/en/>. Accessed 05 August 2022.

KOCABIYIK, S; ÖZDEMİR, I. Purification and Characterization of an Intracellular Chymotrypsin-Like Serine Protease from *Thermoplasma volcanium*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 126-134, jan. 2006.

LIM, S. et al. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. **Food Chemistry**, v. 278, p. 178-184, abr. 2019.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 4, p. 3-2, dez. 2014.

LÓPEZ-GARCÍA, G. et al. Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1343, fev. 2022.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365-376, mar. 2017.

NAHAR, S. et al. Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 17, n. 6, p. 1484-1502, set. 2018.

OSSAI, I. C; HAMID, F. S; HASSAN, A. Valorisation of keratinous wastes: a sustainable approach towards a circular economy. **Waste Management**, v. 151, p. 81-104, set. 2022.

RAMESH, L; LATHA, L. B. V.; MUKUNDA, C. K. Identification and characterization of metal-chelating bioenhancer peptide derived from fermented *Citrullus lanatus* seed milk. **Journal Of Food Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 3-3, fev. 2022.

SHARMA, I; KANGO, N. Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1046-1056, jan. 2021.

SHESTAKOVA, A; TIMORSHINA, S; OSMOLOVSKIY, A. Biodegradation of Keratin-Rich Husbandry Waste as a Path to Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 13, n. 16, p. 8691, ago. 2021.

SILVA, R. R da. Keratinases as an Alternative Method Designed To Solve Keratin Disposal on the Environment: its relevance on agricultural and environmental chemistry. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 66, n. 28, p. 7219-7221, jul. 2018.

SYPKA, M. et al. Keratinases as Versatile Enzymatic Tools for Sustainable Development. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1900, dez. 2021.

VERMA, A. et al. Production of Thermostable Organic Solvent Tolerant Keratinolytic Protease from *Thermoactinomyces* sp. RM4: iaa production and plant growth promotion. **Frontiers In Microbiology**, v. 07, p. 2, ago. 2016.

WANG, B et al. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress In Materials Science**, v. 76, p. 229-318, mar. 2016.

WELDRICK, P J. et al. Enhanced Clearing of Wound-Related Pathogenic Bacterial Biofilms Using Protease-Functionalized Antibiotic Nanocarriers. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 47, p. 43902-43919, nov. 2019.

YAP, P-G; GAN, C-Y. Multifunctional Tyrosinase Inhibitor Peptides with Copper Chelating, UV-Absorption and Antioxidant Activities: kinetic and docking studies. **Foods**, v. 10, n. 3, p. 675, mar. 2021.

ZHANG, Y. et al. Identification and characterization of two novel antioxidant peptides from silkworm pupae protein hydrolysates. **European Food Research And Technology**, v. 247, n. 2, p. 343-352, out. 2020.

ZOLGHADRI, S. et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 279-309, jan. 2019.