



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - CAMPUS ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

FABIANE FERNANDA CZAPELA

**SISTEMAS REACIONAIS ULTRASSÔNICOS E IRRADIAÇÃO POR MICRO-
ONDAS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E
INCREMENTO DE ATIVIDADE DE QUERATINASES**

**ORIENTADOR (a): Prof^a. Dr^a.: HELEN TREICHEL
COORIENTADOR (a): Prof^a. Dr^a.: GISLAINE FONGARO**

ERECHIM-RS

2020

FABIANE FERNANDA CZAPELA

**SISTEMAS REACIONAIS ULTRASSÔNICOS E IRRADIAÇÃO POR MICRO-
ONDAS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E
INCREMENTO DE ATIVIDADE DE QUERATINASES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS Campus Erechim, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª.: Helen Treichel
Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª.: Gislaine Fongaro

ERECHIM-RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

ERS 135 - KM 72, nº 200

CEP: 99700-970

Caixa Postal 764

Erechim-RS

Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Czapela, Fabiane Fernanda

SISTEMAS REACIONAIS ULTRASSÔNICOS E IRRADIAÇÃO POR
MICRO-ONDAS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS E INCREMENTO DE ATIVIDADE DE
QUERATINASES / Fabiane Fernanda Czapela. -- 2020.
75 f.:il.

Orientadora: Doutora Helen Treichel

Co-orientadora: Doutora Gislaine Fongaro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2020.

1. Meios reacionais. 2. Resíduos queratinosos. 3.
Processos biotecnológicos. 4. Enzimas. I. Treichel,
Helen, orient. II. Fongaro, Gislaine, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

FABIANE FERNANDA CZAPELA

**SISTEMAS REACIONAIS ULTRASSÔNICOS E IRRADIAÇÃO POR MICRO-
ONDAS PARA PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E
INCREMENTO DE ATIVIDADE DE QUERATINASES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - PPGCTA da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS Campus Erechim, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a.: Helen Treichel
Coorientador (a): Prof^a. Dr^a.: Gislaine Fongaro

Esta dissertação de mestrado foi defendida e aprovada pela banca examinadora em: 30/03/2020

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a.: Luciane Maria Colla - UPF

Prof^a. Dr^a.: Aline Viancelli - UNC

Prof^a. Dr^a.: Helen Treichel - UFFS (orientadora)

Prof^a. Dr^a.: Gislaine Fongaro - UFSC (coorientadora)

ERECHIM-RS

2020

RESUMO

Os resíduos queratinosos como pelos suínos e penas de frango são gerados em grandes volumes em processos industriais e por conta disso possuem difícil gerenciamento devido a presença de queratina. As queratinases são enzimas com elevado potencial de hidrolisar a queratina, surgindo como alternativa promissora em processos biotecnológicos. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de pré-tratamento de resíduos agroindustriais por sonda ultrassônica e avaliar o comportamento da atividade de queratinases expostas a diferentes sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas e submetidas à técnica de concentração enzimática a partir de extratos enzimáticos produzidos com pelos suínos. Além de comparar a atividade de enzimas *homemade* com enzimas comerciais e aplicar os extratos enzimáticos na degradação de resíduos queratinosos. Para isso, realizou-se fermentação submersa com pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e não pré-tratados, para fins comparativos. Em seguida, os extratos enzimáticos foram expostos aos sistemas reacionais sonda e banho ultrassônicos e micro-ondas, segundo planejamento experimental. Os extratos enzimáticos obtidos foram submetidos à concentração enzimática com NaCl e acetona e à avaliação do potencial de degradação de resíduos queratinosos como pelos suínos e penas de frango. Os resultados obtidos mostraram que a sonda ultrassônica apresentou potencial de pré-tratamento de resíduos queratinosos, com degradação de 45,5% para pelos suínos pré-tratados com a macroponta e aumento nas taxas de reação produzindo bons valores de atividade enzimática em menor tempo (50,8 U/mL em 3 dias). Na avaliação do comportamento das queratinases frente aos sistemas reacionais, a sonda ultrassônica apresentou maior potencial de incremento de atividade enzimática, alcançando até 38,4% de aumento da atividade enzimática, no menor tempo de exposição avaliado. O banho ultrassônico apresentou incremento de 30,2% e as micro-ondas até 15,1%, ambos em condições de temperatura elevada (80 °C). A técnica de concentração enzimática com NaCl e acetona mostrou potencial para incremento de atividade bastante relevante de 53,5%. Na degradação de resíduos queratinosos, os extratos enzimáticos *homemade* se mostraram promissores na degradação de penas de frango, alcançando a degradação quase total dos resíduos, já os pelos suínos não apresentaram degradação visual. Com isso, conclui-se que os resultados obtidos neste trabalho são promissores, uma vez que os dados nesta área são escassos, principalmente no que diz respeito à utilização de sistemas reacionais juntamente com queratinases.

Palavras-chave: Meios reacionais. Resíduos queratinosos. Processos biotecnológicos. Enzimas.

ABSTRACT

Keratinous residues such as swine hair and chicken feathers are generated in large quantities in industrial processes and because of this they are difficult to manage because the presence of keratin. Keratinases are enzymes with a high potential to hydrolyze keratin, emerging as a promising alternative in biotechnological processes. In this sense, the objective of this work was to verify the potential of pretreatment of agro-industrial residues by ultrasonic probe and to evaluate the behavior of the keratinases activity exposed to different ultrasonic reaction systems and by microwave irradiation and subjected to the enzymatic concentration technique from enzymatic extracts produced with swine hair. In addition to comparing the activity of homemade enzymes with commercial enzymes and applying the enzymatic extracts in the degradation of keratinous residues. For this, submerged fermentation was performed with swine hair pretreated with and without ultrasonic probe, for comparative purposes. Then, the enzymatic extracts were exposed to the ultrasonic probe and bath reaction systems and microwaves, according to experimental planning. The enzymatic extracts obtained were submitted to enzymatic concentration with NaCl and acetone and to the evaluation of the potential for degradation of keratinous residues such as swine hair and chicken feathers. The results obtained show that the ultrasonic probe showed a potential for pretreatment of keratinous residues, with a degradation of 45.5% for swine hair pretreated with the macropoint and an increase in reaction rates, producing good values of enzymatic activity in less time (50.8 U/mL in 3 days). In the evaluation of the behavior of keratinases exposed the reaction systems, the ultrasonic probe showed a greater potential for increasing enzyme activity, reaching up to 38.4% increase in enzyme activity, in the shortest exposure time evaluated. The ultrasonic bath showed an increase of 30.2% and microwaves up to 15.1%, both under conditions of high temperature (80 °C). The enzymatic concentration technique with NaCl and acetone showed a potential for significant activity increase of 53.5%. In the degradation of keratinous residues, homemade enzymatic extracts have shown promise in the degradation of chicken feathers, achieving almost total degradation of waste, while swine hair has not shown visual degradation. With that, it is concluded that the results obtained in this work are promising, since the data in this area are scarce, mainly with regard to the use of reaction systems together with keratinases.

Keywords: Reaction means. Keratin residues. Biotechnological processes. Enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fluxograma contendo as etapas executadas durante o desenvolvimento do trabalho.
..... 15
- Figura 2 - Maiores incrementos de atividade enzimática dos extratos enzimáticos obtidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica com a macroponta e extratos enzimáticos obtidos a partir de pelos suínos sem pré-tratamento submetidos aos sistemas reacionais sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas..... 31
- Figura 3 - Teste de degradação contendo o extrato enzimático bruto (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas com os resíduos queratinosos, pelos suínos e penas de frango, no tempo inicial (A e B) e após 28 dias (C, D e E). 35
- Figura 4 - Pelos suínos não degradados nos ensaios com o extrato enzimático bruto (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Controle, B) Extrato enzimático bruto, C) Extrato enzimático - sonda ultrassônica, D) Extrato enzimático - banho ultrassônico, e E) Extrato enzimático - micro-ondas..... 36
- Figura 5 - Degradação de penas de frango visualizada no extrato enzimático bruto (*homemade*) e nos extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Extrato enzimático bruto, B) Extrato enzimático - sonda ultrassônica, C) Extrato enzimático - banho ultrassônico, e D) Extrato enzimático - micro-ondas, comparados com o ensaio controle (à esquerda). 36
- Figura 6 - Teste de degradação com o extrato enzimático das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA para penas de frango ao longo de 28 dias de incubação. A) Enzima comercial K4519 SIGMA (à esquerda) e enzima comercial CIBENZA (à direita) aos 14 dias de incubação, B) Enzima comercial K4519 SIGMA (à esquerda) e enzima comercial CIBENZA (à direita) aos 28 dias de incubação..... 37
- Figura 7 - Teste de degradação contendo o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de

micro-ondas com os resíduos queratinosos, pelos suínos e penas de frango, no tempo inicial (A e B) e após 28 dias (C, D e E).39

Figura 8 - Extrato enzimático concentrado (*homemade*) e extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas, contendo penas de frango não degradadas. A) Extrato enzimático concentrado - sonda ultrassônica, B) Extrato enzimático concentrado - banho ultrassônico e C) Extrato enzimático concentrado - micro-ondas.40

Figura 9 - Pelos suínos não degradados nos ensaios com o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Extrato enzimático concentrado - sonda ultrassônica, B) Extrato enzimático concentrado - banho ultrassônico e C) Extrato enzimático concentrado - micro-ondas.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis do Delineamento Composto Central 2 ³ realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta à sonda ultrassônica.....	18
Tabela 2 - Níveis do Delineamento Composto Central 2 ³ realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta ao banho ultrassônico.....	19
Tabela 3 - Níveis do Delineamento Composto Central 2 ² realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta às micro-ondas.	19
Tabela 4 - Medida de atividade queratinolítica após FS realizada com pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento em 3, 6 e 9 dias, bem como o percentual de degradação obtido ao final do processo fermentativo.	22
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional sonda ultrassônica com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.	25
Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional banho ultrassônico com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.	27
Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional por irradiação de micro-ondas com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.	29
Tabela 8 - Atividade relativa das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas.	32
Tabela 9 - Medida de atividade queratinolítica no tempo inicial e após 28 dias para o extrato enzimático bruto (<i>homemade</i>) e os extratos enzimáticos após a exposição aos sistemas	

reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas contendo pelos suínos e penas de frango.....34

Tabela 10 - Medida de atividade queratinolítica no tempo inicial e após 28 dias para o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após a exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por micro-ondas contendo pelos suínos e penas de frango.....38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 SUBSTRATOS QUERATINOSOS	15
3.2 OBTENÇÃO DO FUNGO	15
3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR ULTRASSOM..	16
3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO	16
3.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE pH E TEMPERATURA DAS QUERATINASES <i>HOMEMADE</i>	17
3.6 ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA.....	17
3.7 EXPOSIÇÃO ENZIMÁTICA AOS SISTEMAS REACIONAIS	18
3.7.1 Sonda Ultrassônica.....	18
3.7.2 Banho Ultrassônico.....	18
3.7.3 Micro-ondas	19
3.8 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA	19
3.9 ENZIMAS COMERCIAIS E SISTEMAS REACIONAIS.....	20
3.10 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUERATINA	20
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR ULTRASSOM..	22
4.2 EXPOSIÇÃO ENZIMÁTICA AOS SISTEMAS REACIONAIS	24
4.2.1 Sonda ultrassônica	24
4.2.2 Banho ultrassônico	26
4.2.3 Micro-ondas	28
4.2.4 Maiores incrementos de atividade enzimática.....	30
4.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA	31
4.4 ENZIMAS COMERCIAIS E SISTEMAS REACIONAIS.....	32
4.5 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUERATINA	33
5 SÚMULA DOS RESULTADOS OBTIDOS	41
6 CONCLUSÃO.....	42
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
APÊNDICE A - Artigo	50

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a geração de resíduos tem impulsionado a busca por tecnologias de tratamento e destinação correta dos mesmos, com vista em sustentabilidade ambiental. Entre os resíduos gerados em processos agroindustriais estão os resíduos queratinosos, como penas de frango e pelos de suínos (Poole, Church e Huson 2009). As penas de frango possuem aplicação industrial, na fabricação de farinha ou ração para animais pelas características proteicas (Moritz e Latshaw 2001). Os pelos de suínos não possuem aplicação e são um problema ambiental, pois são materiais de difícil degradação (Choińska-Pulit, Łaba e Rodziewicz 2019).

A estrutura altamente resistente que os resíduos queratinosos possuem é resultado de estruturas de proteínas fibrosas pertencentes à família das queratinas, que aumenta a resistência a ações físicas, químicas e enzimáticas (Choińska-Pulit, Łaba e Rodziewicz 2019), conferida pelas cadeias α e β e das ligações dissulfeto presentes nos materiais queratinosos (Onifade et al. 1998). A α -queratina pode ser encontrada em diversos materiais como unhas, cascos, chifres e cabelos, sendo exclusiva de vertebrados. A β -queratina é encontrada em escamas e em penas e bicos de aves e também em répteis (Korniłowicz-Kowalska e Bohacz 2011, Mazotto et al. 2011; Ire e Onyenama 2017). Além disso, a queratina é insolúvel em água e altamente resistente a condições ambientais (Onifade et al. 1998), sendo resistente ao ataque de enzimas proteolíticas comuns como a papaína, tripsina e pepsina (Coulombe e Omary 2002).

Processos biológicos de produção enzimática podem facilitar o processo de degradação dos resíduos, auxiliando em sistemas de gestão de resíduos industriais e agregando valor econômico por meio da produção de enzimas com potencial biotecnológico. Os processos biológicos de degradação da queratina tendem a reduzir a estrutura do resíduo a compostos de menor peso molecular, por intermédio da ação de microrganismos ou pela ação de *pool* enzimático, como de enzimas queratinases (Gupta e Ramnani 2006; Brandelli 2008; Brandelli, Daroit e Riffel 2010; Gegeckas et al. 2018).

Queratinases (EC 3.4.21/24/99.11) são uma classe de proteases com potencial de hidrolisar queratina, o que lhes confere papel de destaque com relação às outras proteases, possuindo grande vantagem sobre elas (Brandelli, Daroit e Riffel 2010; Gegeckas et al. 2018). Estas enzimas possuem inúmeras aplicações em diferentes setores, como na área biotecnológica (Mazotto et al. 2013; Brandelli, Sala e Kalil 2015), nos setores de alimentos e fertilizantes (Paul et al. 2013; Rai e Murkerjee 2015), na degradação de resíduos queratinosos (Yusuf et al. 2016; Su et al. 2017; Abdel-Fattah et al. 2018), no tratamento de couro (Jaouadi et al. 2015; Thankaswamy et al. 2018), na formulação de detergentes (Rai e Murkerjee 2011; Reddy et al.

2017), no uso como biofilme, na degradação de hidrocarbonetos, produção de ração, cosméticos e fármacos (Cervantes-Gonzalez et al. 2009; Bhange, Chaturvedi e Bhatt 2015; Sanghvi et al. 2016; Adetunji e Adejumo 2018).

Os fungos são considerados bons produtores de queratinases, e podem ser isolados de locais de disposição de resíduos queratinosos (Kaul e Sumbali 1997; Riffel e Brandelli 2006). Ou também podem ser produzidos industrialmente por processos fermentativos submerso ou estado sólido por intermédio destes microrganismos isolados. A fermentação submersa (FS) foi escolhida em função de propiciar um ambiente homogêneo, oferecer oxigênio de forma contínua e ainda proporcionar maior controle de pH (Florencio et al. 2016). Nestes processos fermentativos podem ser utilizados substratos de baixo custo para indução da produção de queratinases, como os resíduos queratinosos, entre eles: penas de frango, pelos suínos, cabelos, unhas e cascos de animais (Lopes et al. 2011).

Pela importância biotecnológica que as queratinases apresentam, estudos que possibilitem a melhora da atividade destas enzimas podem ser realizados (Jin et al. 2015). A técnica de concentração enzimática é um processo que pode ser aplicado para melhorar a atividade enzimática e reduzir os interferentes no extrato enzimático. Esta técnica é conhecida por ser de baixo custo, fácil desenvolvimento e boa eficiência, sendo um sistema de interação entre enzima, sais e solvente, concentrando a enzima de interesse pela separação de interferentes do meio (Preczeski et al. 2018).

Técnicas brandas de pré-tratamento podem ser aplicadas visando aumentar a produção enzimática e facilitar o processo de degradação de materiais queratinolíticos. Os sistemas de pré-tratamento dos resíduos podem auxiliar nos processos fermentativos, tornando-os mais acessíveis ao ataque fúngico e enzimático (Yusof e Ashokkumar 2015). Existem diversas técnicas de pré-tratamentos, sendo principalmente por meio da aplicação de agentes químicos, que geram efluentes com cargas tóxicas destes contaminantes, aumentando a problemática ambiental do sistema.

Sendo assim, o uso de técnicas de pré-tratamento que não utilizem insumos químicos no sistema são desejáveis, como sistemas ultrassônicos e irradiação de micro-ondas. Estes sistemas reacionais são tecnologias de aquecimento simples e eficientes para incremento de atividade de enzimas e mudança conformacional, além de poderem ser utilizados no pré-tratamento de resíduos e não serem dependentes de agentes químicos (Ma et al. 2011; Azmi, Idris e Yusof 2018).

O ultrassom em baixa intensidade pode ser benéfico para processos enzimáticos, gerando por meio do efeito de cavitação e oscilação mecânica uma alteração na conformação

da enzima e conseqüentemente, acelerando o contato entre enzima e substrato, com isso, a atividade enzimática pode ser melhorada (Jin et al. 2015). No resíduo, o ultrassom atua por meio do efeito de cavitação, pela explosão das bolhas próximo do material resultando no aumento da superfície de contato (Yusof e Ashokkumar 2015), podendo causar o rompimento de estruturas insolúveis, como a queratina, em estruturas menores, facilitando a hidrólise (Wang 1981).

O uso das micro-ondas pode promover um aumento da atividade enzimática e um acréscimo da eficiência das reações. As micro-ondas geradas pelo sistema causam um aquecimento nas moléculas de dentro para fora, ocasionando a agitação das moléculas, induzindo o aumento das colisões energéticas, podendo aumentar as taxas de reação (Ma et al. 2011; Mazinani, Delong e Yan 2015).

Processos biotecnológicos que envolvam a biodegradação de materiais queratinolíticos por meio da ação de fungos e enzimas são uma alternativa promissora para melhorar a degradabilidade destes materiais, uma vez que isso acarreta em valor agregado ao material e ainda traz a possibilidade de transformação em novos produtos (Kim, Lim e Suh 2001; Mazotto et al. 2013). Nesse sentido, é necessário prospectar biotecnologias, considerando a crescente demanda por processos que utilizem tecnologias limpas, sem o uso de produtos que agridam o meio ambiente, avaliando o comportamento das queratinases em diferentes sistemas reacionais e verificando o efeito da exposição enzimática sobre a atividade queratinolítica.

Justifica-se este trabalho pela carência em literaturas atuais de estudos que avaliem mudanças na atividade enzimática de queratinases após a exposição aos sistemas reacionais de ultrassom e micro-ondas. Este estudo apresenta uma alternativa promissora para aumentar a eficiência da atuação das queratinases na degradação dos substratos, a partir da exposição aos diferentes sistemas reacionais, considerados limpos, baratos e eficientes. Considerando o alto custo de aquisição de queratinases comerciais, a conversão biotecnológica se mostra como uma alternativa atraente por utilizar resíduos de baixo custo para produção de enzimas, diminuindo o custo do processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de pré-tratamento de resíduos agroindustriais por sonda ultrassônica e investigar o comportamento de queratinases expostas à sistemas reacionais (sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas) e submetidas a técnica de concentração enzimática a partir de extratos enzimáticos produzidos com pelos suínos. Além de comparar a atividade das enzimas *homemade* com enzimas comerciais e aplicar os extratos enzimáticos na degradação de resíduos queratinosos.

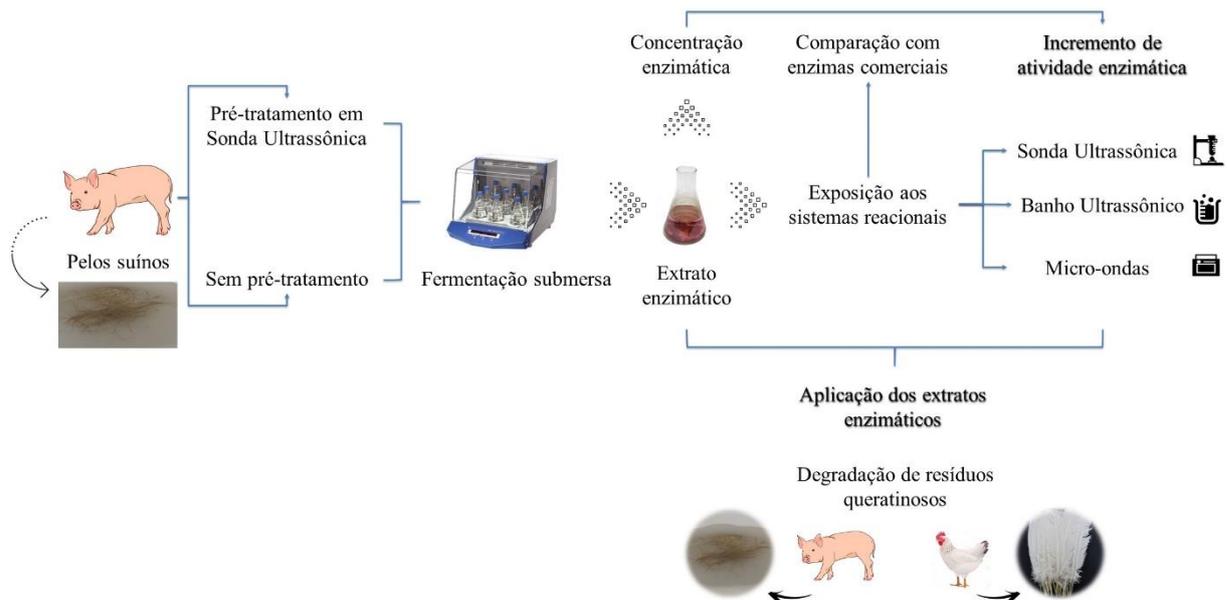
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial de pré-tratamento de pelos suínos utilizando sonda ultrassônica, visando facilitar a degradação de resíduos queratinosos, bem como melhorar as taxas de reação;
- Obter o extrato enzimático queratinolítico por meio de fermentação submersa (FS) utilizando *Fusarium oxysporum* e pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento como substrato;
- Determinar as condições ótimas de pH e temperatura da enzima *homemade* para a maior atividade queratinolítica;
- Analisar o comportamento da atividade enzimática de queratinases após exposição aos sistemas reacionais, sonda e banho ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas;
- Realizar concentração enzimática com NaCl e acetona para avaliar o incremento de atividade enzimática;
- Comparar a atividade enzimática de queratinases *homemade* com enzimas comerciais;
- Avaliar a degradação de resíduos queratinosos a partir de queratinases brutas e concentradas, antes e após exposição aos sistemas reacionais, assim como o potencial de degradação das enzimas comerciais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho seguiu as etapas apresentadas na Figura 1. Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos - LAMIBI, localizado na Universidade Federal da Fronteira Sul, RS-135, 200 - Zona Rural, Erechim - RS.

Figura 1 - Fluxograma contendo as etapas executadas durante o desenvolvimento do trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

3.1 SUBSTRATOS QUERATINOSOS

Os substratos de queratina utilizados foram pelos suínos e penas de frango provenientes de indústria frigorífica localizada na região Norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os resíduos permaneceram armazenados à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso. Previamente à utilização, os resíduos foram lavados com água e detergente, posteriormente imersos em álcool 70% por 1 h seguido de secagem a $70 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h para redução da carga microbiana (Adaptado de Călin et al. 2017). Penas de frango foram utilizadas somente nos ensaios de degradação.

3.2 OBTENÇÃO DO FUNGO

O fungo filamentoso utilizado neste estudo foi isolado a partir de resíduos de penas de frango dispostas em solo localizado na região Norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram obtidos diversos fungos que passaram por um teste preliminar para verificar o potencial

de degradação, e o com melhor potencial foi escolhido e identificado por sequenciamento de material genético como *Fusarium oxysporum* (Preczeski et al. 2020).

3.3 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR ULTRASSOM

Os experimentos de pré-tratamento do resíduo para posterior aplicação na FS foram realizados utilizando pelos de suíno e sonda ultrassônica (Sonicador de Ponteira Ultrassônica/Desruptor de Células ECO-SONICS), frequência ultrassônica de 20KHz e potência de 550W, equipado por micro e macroponta de titânio de 4 mm e 13 mm de diâmetro, respectivamente (ECO-SONICS).

Conduziram-se os ensaios com 1 grama de pelos suínos imersos em água destilada expostos à sonda ultrassônica avaliando a micro e macroponta do equipamento. As variáveis fixas utilizadas foram potência (100%), pulso (3) e tempo de exposição (15 min) (Adaptado de Azmi, Idris e Yusof 2018). Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As amostras foram filtradas em papel filtro e o material retido (resíduo pré-tratado) foi submetido ao processo de redução de carga microbiana, em que as amostras ficaram submersas em álcool 70% por 1 h, seguido de aquecimento em estufa a 70 ± 2 °C por 16 h. Os resíduos pré-tratados foram utilizados como substrato para conduzir um processo fermentativo submerso.

3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

O extrato enzimático foi obtido por meio de FS conduzida com 10 g/L de pelos suínos pré-tratados e sem pré-tratamento adicionados em tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) com adição de 10^6 esporos/mL de *Fusarium oxysporum*. A contagem de esporos foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer com adição de corante vital para contabilização de células viáveis. O meio fermentativo foi incubado a 150 rpm e 28 °C por nove dias (Preczeski et al. 2020). Ao final, o meio fermentativo foi filtrado e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto (*homemade*). A atividade queratinolítica foi avaliada no extrato, conforme item 3.6.

A fase sólida retida no filtro foi avaliada quanto ao percentual de degradação dos resíduos, considerando a perda de massa seca do material durante a fermentação, conforme Equação 1. Para tal, os resíduos foram secos em estufa a 70 ± 2 °C por 16 h e em seguida permaneceram em dessecador por 1 dia. Após, realizou-se a medida de massa seca inicial e final (resíduos antes e após a FS).

$$\text{Degradação (\%)} = 100 - \left(\frac{MF * 100}{MI} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

MF: massa seca final

MI: massa seca inicial

3.5 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE pH E TEMPERATURA DAS QUERATINASES *HOMEMADE*

Com o objetivo de determinar as condições ótimas de pH e temperatura da enzima para a maior atividade queratinolítica, foi realizada uma caracterização avaliando diferentes condições de pH, variando de 5 a 9 e temperatura, de 37 °C a 70 °C (SIGMA-ALDRICH). Os tampões utilizados foram: tampão Citrato 50 mM pH 5,0 e pH 5,7; tampão Fosfato de Sódio 50 mM pH 7,1, pH 8,4 e pH 9,0; e tampão Tris HCl 50 mM pH 8,5. A determinação foi realizada em banho ultratermostático por 1 h e a medida de atividade seguiu o especificado no item 3.6.

3.6 ATIVIDADE QUERATINOLÍTICA

Após a determinação das condições ótimas de pH e temperatura, observou-se que o pH e a temperatura ótimos em que foi alcançada a maior atividade enzimática para a enzima *homemade* foram: pH 8,5 (tampão Tris HCl 50 mM) e temperatura de 50 °C, respectivamente. Por conta disso, os ensaios de medida de atividade queratinolítica foram realizados seguindo as condições ótimas de pH e temperatura, utilizando como substrato padrão azoqueratina (SIGMA K8500 α -K). O ensaio continha 0,013 g de azoqueratina, 3,2 mL de tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) e 0,8 mL de extrato enzimático. Após banho ultratermostático a 50 °C por 1 h, adicionou-se 0,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para cessar a reação, realizando a leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Adaptado de Bressollier et al. 1999). O controle da reação foi realizado com água destilada, sem adição do extrato enzimático.

Uma unidade de atividade de queratinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento de absorvância de 0,01 nas condições de ensaio descritas (Bressollier et al. 1999). Calculou-se também a atividade relativa (%) para fins de incremento de atividade, conforme Equação 2.

$$\text{Atividade relativa (\%)} = \left(\frac{\text{Ativ. final} - \text{Ativ. inicial}}{\text{Ativ. inicial}} \right) * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

Ativ. final: atividade do extrato enzimático após exposição aos sistemas reacionais

Ativ. inicial: atividade do extrato enzimático bruto, antes da exposição aos sistemas reacionais

3.7 EXPOSIÇÃO ENZIMÁTICA AOS SISTEMAS REACIONAIS

Os extratos enzimáticos produzidos utilizando pelos de suíno como substrato pré-tratados em sonda ultrassônica com macro-ponta e sem pré-tratamento foram submetidos a exposição a sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas utilizando a metodologia de planejamento experimental, objetivando avaliar o comportamento das enzimas frente aos sistemas reacionais. Cada sistema reacional foi avaliado por meio de Delineamento Composto Central (DCC) com base em variáveis independentes previamente definidas, conforme interesse da reação e possibilidades do sistema. A variável resposta foi atividade relativa (%), sendo resultado da variação entre as atividades queratinolíticas do extrato antes e após a exposição aos sistemas reacionais (Equação 2).

3.7.1 Sonda Ultrassônica

Para avaliar o comportamento das enzimas queratinases em sonda ultrassônica foi construído um DCC 2³, tendo como variáveis independentes o tempo de exposição (2 a 10 min), potência (40 a 80%) e pulso (1 a 3), conforme Tabela 1. Para os ensaios, 20 mL de extrato enzimático (conforme especificações da sonda ultrassônica) foram expostas as condições reacionais.

Tabela 1 - Níveis do Delineamento Composto Central 2³ realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta à sonda ultrassônica.

Nível	-1	0	+1
Tempo (min)	2	6	10
Potência (%)	40	60	80
Pulso (un)	1	2	3

3.7.2 Banho Ultrassônico

O equipamento utilizado nesta etapa foi uma Lavadora Ultra-Sonica UNIQUE, modelo USC-1800 A, frequência US 40 KHz e potência máxima de 137 W (0,42 W/cm²). Neste sistema

reacional construiu-se um DCC 2³, sendo as variáveis independentes a temperatura (30 a 80 °C), a potência (0 a 100%) e o tempo de exposição (10 a 40 min) (Mulinari et al. 2017), conforme Tabela 2. Alíquotas de 2 mL do extrato enzimático bruto foram expostas ao banho ultrassônico. O volume utilizado seguiu as recomendações de uso do equipamento.

Tabela 2 - Níveis do Delineamento Composto Central 2³ realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta ao banho ultrassônico.

Nível	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	55	80
Potência (%)	0	50	100
Tempo (min)	10	25	40

3.7.3 Micro-ondas

O equipamento utilizado para estes experimentos foi o Reator de Micro-ondas Monowave 100 ANTON PAAR com alcance de altas temperaturas e pressões (250 °C e até 20 bar), potência de saída de 500 W não pulsada, alta densidade de campo, agitador magnético integrado, sensor de temperatura e controle de pressão (ANTON PAAR).

Um DCC 2² foi utilizado para avaliar este processo, tendo como variáveis independentes a temperatura (30 a 80 °C) e o tempo de exposição (5 a 15 min) (Mazinani, Delong e Yan 2015). A potência do sistema é determinada pelo equipamento por meio da temperatura (Tabela 3). Alíquotas de 3 mL do extrato enzimático bruto foram expostas às micro-ondas, seguindo as recomendações de volume para o equipamento utilizado (de 2 a 6 mL).

Tabela 3 - Níveis do Delineamento Composto Central 2² realizado para avaliação do comportamento da enzima quando exposta às micro-ondas.

Nível	-1	0	+1
Temperatura (°C)	30	55	80
Tempo (min)	5	10	15

3.8 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Visando testar métodos de incremento de atividade enzimática mais viáveis economicamente, foi realizada a técnica de concentração enzimática com NaCl e acetona p.a. nas condições: 10 mL/min para vazão da bomba peristáltica, 0,295 g de NaCl, 10 mL de acetona p.a., e 10 mL de extrato enzimático. O meio reacional foi mantido a 4 °C. Após, realizou-se a

centrifugação a 9500 xg, 4 °C durante 20 min. A fase sobrenadante foi descartada e o concentrado foi ressuspenso com 10 mL de tampão Tris HCl 50 mM (pH 8,5) (Preczeski et al. 2018), tornando-se o extrato enzimático concentrado (*homemade*).

O extrato enzimático concentrado (*homemade*) foi submetido aos sistemas reacionais nas condições de maior incremento de atividade nos planejamentos experimentais e posteriormente aplicados na degradação de resíduos queratinosos visando avaliar o potencial de degradação.

3.9 ENZIMAS COMERCIAIS E SISTEMAS REACIONAIS

O comportamento da atividade do extrato enzimático *homemade* foi comparado com as enzimas comerciais, K4519 SIGMA e CIBENZA. As enzimas comerciais foram expostas às condições de maior incremento enzimático obtidas nos planejamentos experimentais de cada sistema reacional. As queratinases K4519 SIGMA foram diluídas em tampão Fosfato 5 mM (pH 7,0), mantendo atividade inicial de 2812,5 U/mL. As queratinases CIBENZA foram diluídas a uma concentração de 10% m/v, com atividade inicial de 22,5 U/mL. Ambas atividades enzimáticas das enzimas comerciais foram determinadas conforme o item 3.6.

Os resultados foram avaliados em atividade relativa (%), considerando a atividade enzimática antes e após a exposição aos sistemas reacionais.

Os extratos enzimáticos das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA também foram aplicados na degradação de resíduos queratinosos visando avaliar o potencial de degradação.

3.10 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUERATINA

Avaliou-se o potencial de aplicação dos extratos enzimáticos obtidos da FS na forma bruta e concentrada, ambos antes e após exposição aos sistemas reacionais e os extratos enzimáticos das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA antes e após exposição aos sistemas reacionais na degradação de resíduos queratinosos.

Para tal, foram utilizados pelos suínos e penas de frango, provenientes de indústria frigorífica. Para os ensaios, utilizou-se 1 pena inteira ou 0,1 g de pelo suíno para 8,0 mL de extrato enzimático, incubados a 28 °C por 28 dias (Scott e Untereiner 2004). O resultado foi avaliado com base na degradação visível dos resíduos.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da atividade enzimática foram analisados estatisticamente pelo software *Protimiza Experimental Design* (Rodrigues e Iemma 2014), sendo avaliados estatisticamente pela análise de variância ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão de triplicata. As diferenças estatísticas entre os conjuntos de dados foram verificadas pela ANOVA e Teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR ULTRASSOM

O processo fermentativo para obtenção do extrato enzimático foi realizado utilizando como substrato pelo suíno pré-tratado em sonda ultrassônica (micro e macroponta) e sem pré-tratamento. As atividades enzimáticas e percentuais de degradação foram avaliados (Tabela 4).

Tabela 4 - Medida de atividade queratinolítica após FS realizada com pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento em 3, 6 e 9 dias, bem como o percentual de degradação obtido ao final do processo fermentativo.

Pelos suínos		Atividade (U/mL)			Degradação (%)
Pré-tratamento em Sonda Ultrassônica	<i>Micropona</i>	3 dias	6 dias	9 dias	
		$38,8 \pm 5,3^a$	$81,0 \pm 5,2^a$	$55,7 \pm 3,0^a$	
Sem pré-tratamento	<i>Macroponta</i>	3 dias	6 dias	9 dias	
		$50,8 \pm 5,3^b$	$39,5 \pm 4,8^b$	$43,8 \pm 1,1^b$	
Sem pré-tratamento		3 dias	6 dias	9 dias	
		$25,0 \pm 5,6^a$	$82,2 \pm 9,4^a$	$75,2 \pm 3,2^c$	$36,3 \pm 4,0^a$

*Letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey na coluna.

É interessante observar que a maior atividade queratinolítica obtida no terceiro dia da fermentação ocorreu nos pelos suínos pré-tratados com a macroponta da sonda ultrassônica, sendo de $50,8 \pm 5,3$ U/mL. A partir deste resultado pode-se inferir que a maior dissipação de energia causada pela macroponta resultou em maior atividade enzimática, uma vez que possui um diâmetro superior ao da microponta, que alcançou atividade enzimática ($38,8 \pm 5,3$ U/mL) semelhante ao obtido com o resíduo bruto ($25,0 \pm 5,6$ U/mL).

Entretanto, o que pode ser observado é que a microponta não teve o mesmo impacto na estrutura se relacionado com os resultados de atividade enzimática para o 3º dia, isso porque o sistema ultrassônico pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles a dissipação da energia, intensidade ultrassônica, temperatura, tempo de exposição, e diâmetro da sonda (Lippert et al. 2018), o que pode ter resultado numa menor eficiência de erosão da estrutura quando na microponta em comparação com a macroponta da sonda ultrassônica.

As maiores atividades queratinolíticas foram observadas para o pelo suíno sem pré-tratamento e com pré-tratamento em microponta em seis dias de fermentação, sendo de $82,2 \pm 9,4$ U/mL e $81,0 \pm 5,2$ U/mL, respectivamente. Para a macroponta, notou-se diminuição da atividade enzimática em 6 dias ($39,5 \pm 4,8$ U/L), devido ao substrato ter sido mais utilizado ao

longo dos três dias de fermentação. Isto também ocorre aos nove dias de fermentação, em que os valores de atividade enzimática são menores em todos os casos avaliados.

Quanto ao percentual de degradação, observou-se que a maior degradação ocorreu no ensaio de pré-tratamento com macroponta ($45,5 \pm 0,8\%$), podendo inferir-se que a abrasão e erosão na estrutura dos pelos suínos, que resultou na maior atividade enzimática em três dias para o mesmo ensaio, também apresentou a maior dissolução de cadeias estruturais que compõe o resíduo em questão, resultando na maior perda de massa neste experimento.

A sonda ultrassônica é relatada como um processo de pré-tratamento relevante para o aumento das taxas de reação, principalmente de processos de hidrólise (Zou et al. 2016). Os sistemas ultrassônicos facilitam o processo de degradação de estruturas por conta da propagação de ondas ultrassônicas que causam a cavitação de bolhas, ocasionando aumento de temperatura, favorecendo a formação de radicais que reagem rapidamente (Wang 1981; Manasseh et al. 2010; Yusof e Ashokkumar 2015), melhorando o ataque enzimático ao substrato (Yang e Fang 2015). O processo de cavitação é o fator fundamental para a eficiência do pré-tratamento com ultrassom, visto que por meio da explosão de bolhas próximo da superfície do material causa abrasão e erosão, podendo aumentar a superfície de contato, e conseqüentemente melhorar os processos de hidrólise e produção enzimática (McClements 1995; Barton, Bullock e Weir 1996; Mason et al. 2011). Observações similares foram relatadas por Jin et al. (2015), que verificaram alterações nas características cinéticas entre as proteínas e os substratos em sistemas ultrassônicos, observando o aumento da taxa de hidrólise, melhorando a afinidade entre enzima e substrato.

O pré-tratamento em sonda ultrassônica é interessante com a utilização da macroponta quando o objetivo do processo é a maior produção enzimática em tempos menores. Visualizando o sistema na busca de uma eficiente degradação do resíduo e atividades enzimáticas relevantes, o sistema com pelos suínos sem pré-tratamento apresentou maior viabilidade em relação às maiores produções enzimáticas dos demais experimentos, considerando que em seis dias houve uma produção enzimática de aproximadamente 38% maior do que com o resíduo pré-tratado com macroponta em três dias, e apenas 10% de diferença de degradação do resíduo em relação ao mesmo ensaio. Já comparando aos dados do resíduo pré-tratado com microponta, não se observou diferença estatística entre os dados, sugerindo que utilizar o resíduo sem pré-tratamento é mais promissor, além de garantir menor gasto energético.

4.2 EXPOSIÇÃO ENZIMÁTICA AOS SISTEMAS REACIONAIS

A exposição aos sistemas reacionais foi realizada visando avaliar o comportamento das queratinases em diferentes sistemas reacionais. Para tanto, foram avaliados a sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas, por meio de planejamentos experimentais.

Dois extratos enzimáticos diferentes foram expostos aos sistemas reacionais: a) extrato enzimático proveniente da FS realizada com pelos suínos pré-tratados com a macroponta da sonda ultrassônica; b) extrato enzimático proveniente da FS realizada com pelos suínos sem pré-tratamento.

4.2.1 Sonda ultrassônica

Os extratos enzimáticos foram expostos a sonda ultrassônica utilizando a microponta, que foram estudados com base em uma matriz experimental (Tabela 5) em que apresentam-se os resultados obtidos para as variáveis independentes de tempo de exposição, potência e pulso, avaliando-se a atividade relativa (%) como resposta.

Para o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica, foram observados incrementos de até 23,3% no ensaio 7, correspondente ao menor tempo avaliado (2 min). Quando submetidos a análise de efeitos, notou-se que apenas a variável tempo foi significativa no processo, afetando-o de maneira negativa, ou seja, quanto menor o tempo de exposição à sonda ultrassônica, maior a atividade queratinolítica. A potência e o pulso não se mostraram significativas.

Já para os extratos enzimáticos obtidos com pelos suínos sem pré-tratamento foram observados incrementos mais promissores. Verifica-se que o ensaio 1 foi o que proporcionou maior incremento de atividade queratinolítica com relação ao extrato enzimático bruto, ou seja, 38,4% de incremento. A análise dos efeitos das variáveis sobre a atividade queratinolítica demonstrou que apenas a variável tempo foi significativa no processo, afetando a atividade enzimática negativamente, ou seja, quanto menor o tempo de exposição à sonda ultrassônica maior a atividade enzimática. A potência e o pulso não foram significativas no processo. Nos dois casos estudados, o modelo estatístico não validou devido $F_{cal} < F_{tab}$.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional sonda ultrassônica com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.

<i>Ensaio</i>	<i>Sonda Ultrassônica</i>			<i>Atividade Relativa (%)</i>	
	Tempo (min)	Potência (%)	Pulso (un)	a) Pré-tratado em Sonda Ultrassônica	b) Sem pré-tratamento
1	-1 (2)	-1 (40)	-1 (1)	11,3	38,4
2	+1 (10)	-1 (40)	-1 (1)	0,0	1,4
3	-1 (2)	+1 (80)	-1 (1)	2,7	16,3
4	+1 (10)	+1 (80)	-1 (1)	0,0	9,1
5	-1 (2)	-1 (40)	+1 (3)	0,0	21,1
6	+1 (10)	-1 (40)	+1 (3)	0,0	0,0
7	-1 (2)	+1 (80)	+1 (3)	23,3	25,2
8	+1 (10)	+1 (80)	+1 (3)	0,0	10,3
9	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0,0	0,0
10	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0,0	3,0
11	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0,0	0,0
12	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0,0	0,0
<i>Extrato enzimático bruto*</i>				75,0 U/mL	124,3 U/mL

*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais.

a) extrato enzimático proveniente de pelos suínos pré-tratados com a macroponta da sonda ultrassônica.

b) extrato enzimático proveniente de pelos suínos sem pré-tratamento.

Os maiores incrementos de atividade ocorreram no menor tempo de exposição avaliado (2 min) corroborando com a análise estatística. Os sistemas ultrassônicos são responsáveis pela geração de ondas que se propagam por meio de um líquido e colapsam em altas temperaturas, este fenômeno é chamado de cavitação. A força de cisalhamento resultante da explosão destas microbolhas ocasiona uma rápida transferência de calor e de massa promovendo o aumento da atividade enzimática (Condon et al. 2009; Jin et al. 2015). Sendo assim, o incremento de atividade pode ser resultado do menor tempo de exposição à sonda ultrassônica que favorece a decomposição de moléculas interferentes e a mudança de especificidade enzimática, fazendo com que as enzimas se tornem mais facilmente acessíveis à reação e consequentemente aumentando a atividade das mesmas, proporcionando um ambiente ideal para a reação entre enzima e substrato (McClements 1995; Jin et al. 2015). A enzima também se mantém mais

regular e flexível, porque os parâmetros termodinâmicos como E_a , ΔH e ΔS são reduzidos com o uso do ultrassom, causando melhoria na sua atividade e estabilidade operacional (Ma et al. 2011; Wang, Chen e Zhu 2013).

Nos ensaios com tempo de exposição de 6 a 10 min, a atividade enzimática foi menor e em alguns casos inferior a atividade obtida no extrato enzimático sem exposição à sonda ultrassônica, possivelmente por conta da desnaturação enzimática causada pelo maior tempo de exposição à sonda ultrassônica (Kapturowska, Stolarzewicz e Krzyczkowska 2012). A desnaturação das enzimas pode ocorrer devido ao excesso de pressão, temperatura ou até mesmo da força de cisalhamento gerada durante o fenômeno da cavitação no sistema ultrassônico (Grintsevich et al. 2001; Potapovich, Eremin e Metelitz 2003).

É importante salientar que o uso de sistemas ultrassônicos é eficiente na redução do tempo de reação, promovendo aumento da atividade enzimática em muitos casos. Por outro lado, dependendo das condições estudadas pode haver uma desnaturação enzimática e consequentemente a diminuição da atividade das enzimas.

4.2.2 Banho ultrassônico

Os extratos enzimáticos também foram expostos ao banho ultrassônico, sendo avaliados com base em uma matriz experimental (Tabela 6). As variáveis independentes avaliadas foram temperatura, potência e tempo de exposição, e a atividade relativa (%) como resposta.

O maior incremento de atividade enzimática obtido para o banho ultrassônico ocorreu no extrato enzimático proveniente de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica com a macroponta (30,2%), com temperatura de 80 °C durante 40 min de exposição e potência 0%, correspondente ao ensaio 6 (Tabela 6).

A análise de efeitos sobre a atividade queratinolítica demonstrou que a temperatura e a potência foram significativas no processo. A variável temperatura afeta de maneira significativa positiva, ou seja, quanto maior a temperatura, maior a atividade queratinolítica. Já a variável potência afeta a atividade enzimática negativamente, quanto menor a potência, maior a atividade. O tempo não apresentou influência na atividade enzimática. Como $F_{cal} > F_{tab}$, o modelo estatístico validou.

Já para o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento, apenas o ensaio 3 propiciou incremento de atividade queratinolítica com relação ao extrato bruto, sendo de 5,9% (Tabela 6). No entanto, quando os resultados foram submetidos à análise

de efeitos, nenhuma variável se mostrou significativa. Para este extrato enzimático estudado, o modelo não foi validado estatisticamente devido $F_{cal} < F_{tab}$.

Tabela 6 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional banho ultrassônico com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.

<i>Ensaio</i>	<i>Banho Ultrassônico</i>			<i>Atividade Relativa (%)</i>	
	Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	a) Pré-tratado em Sonda Ultrassônica	b) Sem pré-tratamento
1	-1 (30)	-1 (0)	-1 (10)	0,0	0,0
2	+1 (80)	-1 (0)	-1 (10)	9,4	0,0
3	-1 (30)	+1 (100)	-1 (10)	0,0	5,9
4	+1 (80)	+1 (100)	-1 (10)	0,0	0,0
5	-1 (30)	-1 (0)	+1 (40)	0,0	0,0
6	+1 (80)	-1 (0)	+1 (40)	30,2	0,0
7	-1 (30)	+1 (100)	+1 (40)	0,0	0,0
8	+1 (80)	+1 (100)	+1 (40)	0,0	0,0
9	0 (55)	0 (50)	0 (25)	0,0	0,0
10	0 (55)	0 (50)	0 (25)	0,0	0,0
11	0 (55)	0 (50)	0 (25)	0,0	0,0
12	0 (55)	0 (50)	0 (25)	0,0	0,0
<i>Extrato enzimático bruto*</i>				79,5 U/mL	118,5 U/mL

*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais.

a) extrato enzimático proveniente de pelos suínos pré-tratados com a macroponta da sonda ultrassônica.

b) extrato enzimático proveniente de pelos suínos sem pré-tratamento.

Nos extratos enzimáticos avaliados observam-se comportamentos diferentes da enzima com relação à temperatura. Para os resíduos pré-tratados, o extrato enzimático aumentou a atividade em temperatura de 80°C e para os resíduos sem pré-tratamento, o único aumento de atividade foi na temperatura de 30°C, a mais amena dentro da faixa de estudo. Isto mostra que as enzimas produzidas durante a FS com resíduos pré-tratados e sem pré-tratamento são diferentes no modo de atuação frente ao sistema reacional banho ultrassônico.

O comportamento observado para o banho ultrassônico pode estar relacionado com o efeito sinérgico das ondas ultrassônicas com a temperatura. Estudos mostram incremento de atividade de enzimas expostas ao banho ultrassônico (Leaes et al. 2013; Mulinari et al. 2017).

A temperatura influencia consideravelmente no aumento ou diminuição da atividade enzimática. Com um aumento de temperatura a atividade pode ser incrementada, mas dependendo da estrutura da enzima, se houver um aumento muito expressivo da temperatura, pode ocorrer a desnaturação (Resa et al. 2009). Este comportamento foi descrito nos estudos de Wang et al. (2011) e Ovsianko et al. (2005), em que ocorreu a desnaturação enzimática por conta do efeito da sonicação ultrassônica causar um aumento da temperatura, estimulando também o efeito da cavitação. Isto mostra que o uso de sistemas ultrassônicos é capaz de promover incrementos da atividade de enzimas, por conta de mudanças conformacionais da estrutura da enzima, além de reduzir consideravelmente o tempo de reação (Leaes et al. 2013) e também a diminuição da atividade por conta da desnaturação (Resa et al. 2009).

4.2.3 Micro-ondas

Por fim, os extratos enzimáticos foram expostos à irradiação por micro-ondas. As variáveis independentes temperatura e tempo de exposição foram avaliados com base em uma matriz experimental (Tabela 7), avaliando-se a atividade relativa (%) como resposta.

Para o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica foram observados incrementos de atividade enzimática de até 15,1% (Tabela 7). Realizando a análise estatística, nota-se que a variável temperatura foi significativa positiva, ou seja, quanto maior a temperatura, maior a atividade queratinolítica alcançada. Já o tempo não apresentou influência na atividade enzimática. O modelo validou estatisticamente por $F_{cal} > F_{tab}$.

Já para o extrato enzimático obtido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento, nenhum ensaio apresentou incremento de atividade queratinolítica (Tabela 7). Porém, realizando a análise estatística a variável temperatura se mostrou significativa de maneira negativa, ou seja, quanto maior a temperatura de exposição às micro-ondas, menor a atividade queratinolítica alcançada. Já o tempo não apresentou influência na atividade enzimática. Neste caso, $F_{cal} < F_{tab}$, não validando o modelo estatisticamente.

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) e resultados da atividade relativa (%) para as condições avaliadas no sistema reacional por irradiação de micro-ondas com os extratos enzimáticos produzidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento.

<i>Ensaio</i>	<i>Micro-ondas</i>		<i>Atividade Relativa (%)</i>	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	a) Pré-tratado em Sonda Ultrassônica	b) Sem pré-tratamento
1	-1 (30)	-1 (5)	0,0	0,0
2	+1 (80)	-1 (5)	15,1	0,0
3	-1 (30)	+1 (15)	0,0	0,0
4	+1 (80)	+1 (15)	8,8	0,0
5	0 (55)	0 (10)	0,0	0,0
6	0 (55)	0 (10)	0,0	0,0
7	0 (55)	0 (10)	0,0	0,0
8	0 (55)	0 (10)	0,0	0,0
<i>Extrato enzimático bruto*</i>			79,5 U/mL	128,8 U/mL

*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais.

a) extrato enzimático proveniente de pelos suínos pré-tratados com a macroponta da sonda ultrassônica.

b) extrato enzimático proveniente de pelos suínos sem pré-tratamento.

O incremento de atividade obtido para o extrato enzimático produzido a partir de resíduos pré-tratados em sonda ultrassônica é devido às micro-ondas proporcionarem um aumento da atividade enzimática e um acréscimo da eficiência das reações, por conta do superaquecimento causado de maneira instantânea. Isto provoca uma enorme agitação de moléculas que induz a um aumento das colisões energéticas, aumentando também as taxas de reação e conversão (Ma et al. 2011; Mazinani, DeLong e Yan 2015).

O mecanismo de funcionamento das micro-ondas ocorre pela interação do campo eletromagnético com a matéria, isto provoca uma movimentação de íons, que por sua vez causam geração de calor por dois mecanismos, a rotação de dipolo e a condução iônica. Em reações químicas, as micro-ondas podem causar atrito molecular por conta da polarização de moléculas. Este processo é responsável por aumentar o atrito dessas moléculas, conseqüentemente aumentando a temperatura e a taxa de reação (Lopes et al. 2015). Dessa forma, a irradiação de micro-ondas pode causar mudanças conformacionais na estrutura exposta, gerando aumento na atividade enzimática ou até mesmo causar danos, como a

desnaturação enzimática (Leonelli e Mason 2010; Lopes et al. 2015; Mazinani, Delong e Yan 2015).

Alguns autores apontam que o uso de micro-ondas podem causar alterações das propriedades termodinâmicas, proporcionando aumento da atividade enzimática (Mazinani, Delong e Yan 2015; Golunski et al. 2017), sugerindo que ocorrem mudanças conformacionais na estrutura das enzimas quando exposta às micro-ondas, possivelmente por conta de clivagens que ocorrem durante o processo e pela formação de pontos quentes pelo aquecimento instantâneo.

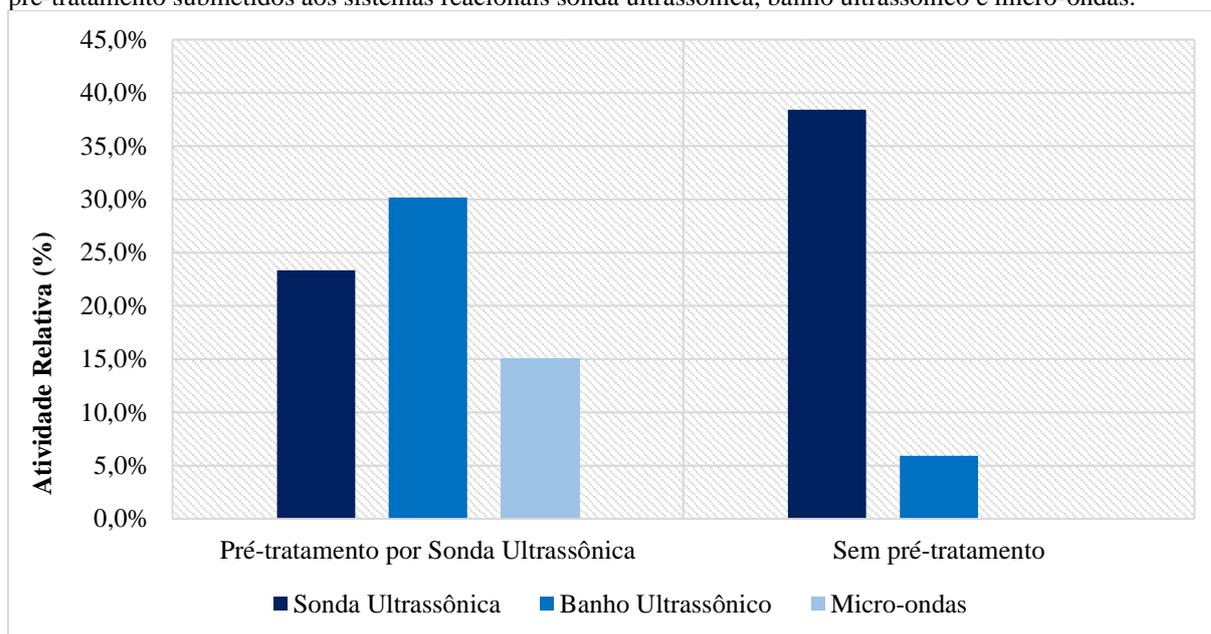
Por outro lado, temperaturas e tempos de exposição elevados causam desnaturação enzimática. Possivelmente isto ocorreu nos ensaios com o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento, onde temperaturas amenas de 30°C já foram suficientes para causar a diminuição da atividade enzimática.

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam no comportamento das enzimas expostas à irradiação de micro-ondas. Ela faz com que as colisões entre moléculas aumentem, e isto provoca um aumento de energia, ocasionando taxas de reação mais rápidas. No entanto, com temperaturas muito elevadas, ocorre a redução da taxa de reação em virtude da desnaturação das enzimas provocada pela ruptura por conta do calor e também da quebra das ligações iônicas e de hidrogênio que estabilizam a estrutura protéica (Yadav e Borkar 2009; Khan e Rathod 2018).

4.2.4 Maiores incrementos de atividade enzimática

Diante dos resultados obtidos para os três sistemas reacionais avaliados, nota-se que a sonda ultrassônica mostrou maior potencial de incremento de atividade enzimática com relação aos demais sistemas reacionais avaliados, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Maiores incrementos de atividade enzimática dos extratos enzimáticos obtidos a partir de pelos suínos pré-tratados em sonda ultrassônica com a macroponta e extratos enzimáticos obtidos a partir de pelos suínos sem pré-tratamento submetidos aos sistemas reacionais sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas.



O maior incremento de atividade foi obtido com a sonda ultrassônica com o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento (38,4%). Os sistemas ultrassônicos também mostraram bons resultados no aumento da atividade enzimática para o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos pré-tratados por sonda ultrassônica, com valores de incremento de 23,3% para sonda ultrassônica e 30,2% para banho ultrassônico. Além disso, esses valores foram alcançados em condições moderadas de tempo de exposição, potência e pulso, tornando o processo mais viável. Isto sugere que entre os sistemas reacionais avaliados, os sistemas ultrassônicos possuem maior potencial de incremento de atividade enzimática.

4.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A técnica de concentração enzimática foi realizada a fim de verificar a possibilidade de incremento de atividade enzimática a partir de um método economicamente viável e de simples operação. Foi utilizado o extrato enzimático produzido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento e a técnica de concentração enzimática foi realizada na presença de NaCl e acetona p.a.

O extrato enzimático (*homemade*) exibiu uma atividade enzimática de 159,3 U/mL após a técnica de concentração, aumentando em 53,5% o valor da atividade quando comparada ao extrato enzimático bruto (103,8 U/mL). O extrato enzimático concentrado (*homemade*) foi

submetido à exposição aos sistemas reacionais nas condições de maior incremento de atividade nos planejamentos experimentais em que apresentou estabilidade frente à sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas, possivelmente pela ausência de interferentes que foram separados durante a concentração enzimática.

Após a exposição, o extrato enzimático concentrado (*homemade*) foi aplicado na degradação de pelos suínos e penas de frango, visando avaliar o potencial de degradação de resíduos queratinosos, conforme descrito no item 4.5.

4.4 ENZIMAS COMERCIAIS E SISTEMAS REACIONAIS

Queratinases comerciais (K4519 SIGMA e CIBENZA) foram expostas à sonda ultrassônica, banho ultrassônico e micro-ondas nas condições de maior atividade relativa da enzima *homemade*, a fim de comparar com os dados obtidos. Os resultados são apresentados na Tabela 8, bem como as condições de maior incremento de atividade enzimática para cada sistema reacional avaliado.

A enzima K4519 SIGMA apresentou atividade inicial de 2812,5 U/mL. Quando submetida à sonda e banho ultrassônicos apresentou um incremento de 11,1% na atividade enzimática. Na irradiação por micro-ondas houve redução da atividade. Já a enzima CIBENZA apresentou atividade inicial de 22,5 U/mL, e um incremento de 55,6% quando exposta à sonda ultrassônica, 124,4% quando exposta ao banho ultrassônico e 60,0% na irradiação por micro-ondas. Desta forma, esta enzima pode ser considerada termoestável por suportar elevadas temperaturas.

Tabela 8 - Atividade relativa das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas.

<i>Sistema reacional</i>			<i>Atividade Relativa (%)</i>	
Sonda Ultrassônica			SIGMA	CIBENZA
Tempo (min)	Potência (%)	Pulso (un)		
2	40	1	11,1	55,6
Banho Ultrassônico				
Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)		
30	100	10	11,1	124,4
Micro-ondas				
Temperatura (°C)	Tempo (min)			
55	10		0,0	60,0
<i>Extrato enzimático bruto*</i>			2812,5 U/mL	22,5 U/mL

*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais

A enzima K4519 SIGMA por se tratar de uma enzima altamente pura, possui uma variação menor quando submetida a sistemas reacionais. O incremento de atividade observado para a enzima queratinase K4519 SIGMA foi menor do que o obtido para a enzima bruta (*homemade*) quando submetida à sonda ultrassônica (38,4%). Este comportamento é esperado visto a queratinase K4519 SIGMA se trata de uma enzima pura e com alta estabilidade. Ao se tratar da enzima CIBENZA, observou-se maiores variações e menor estabilidade, possivelmente por se tratar de um extrato não homogêneo, podendo alcançar altos valores de atividade, assim como sofrer redução, de acordo com o seu comportamento durante a exposição.

A enzima *homemade* apresentou atividade enzimática maior que a enzima CIBENZA, sendo um resultado de grande relevância, considerando a complexidade de processos industriais para obtenção da enzima e a simplicidade do processo fermentativo apresentado neste estudo.

Deve-se valorizar o fato da produção da enzima *homemade* ser de baixo custo por utilizar um resíduo altamente disponível, sendo também um resíduo não homogêneo com grandes variações, além do fato dos problemas de destinação por conta da difícil degradação. A enzima produzida possui bons valores de atividade enzimática e de incremento de atividade quando submetida aos sistemas reacionais, tornando-se competitiva frente às enzimas comerciais.

4.5 APLICAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS DE QUERATINA

Os extratos enzimáticos bruto e concentrado (*homemade*) antes e após exposição aos sistemas reacionais foram avaliados quanto ao potencial de degradação de resíduos queratinosos como pelos suínos e penas de frango, assim como os extratos enzimáticos das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA. Os extratos enzimáticos foram incubados a 28 °C por 28 dias e o resultado é apresentado com base na degradação visível dos resíduos e atividade enzimática.

Pode-se observar que para o extrato enzimático na forma bruta e após exposição aos sistemas reacionais, os valores para atividade queratinolítica dos ensaios contendo pelos suínos e penas de frango apresentaram uma pequena diminuição com relação ao valor inicial para a atividade enzimática ao longo dos 28 dias, mas ainda assim se mantendo estáveis com o passar do tempo, mostrando que a enzima estava ativa e apresentando atividade enzimática bastante promissora (Tabela 9).

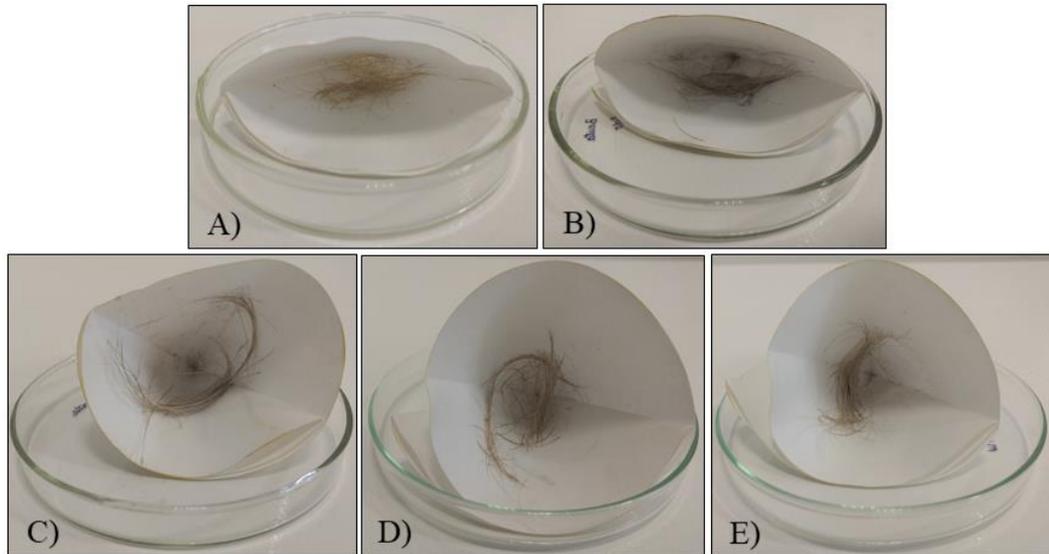
Tabela 9 - Medida de atividade queratinolítica no tempo inicial e após 28 dias para o extrato enzimático bruto (*homemade*) e os extratos enzimáticos após a exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas contendo pelos suínos e penas de frango.

Extratos enzimáticos (<i>homemade</i>)			Pelos suínos		Penas de frango	
			<i>0° dia</i>	<i>28° dia</i>	<i>0° dia</i>	<i>28° dia</i>
			<i>Atividade (U/mL)</i>		<i>Atividade (U/mL)</i>	
Sonda Ultrassônica						
Tempo (min)	Potência (%)	Pulso (un)	172,0	137,0	172,0	133,0
2	40	1				
Banho Ultrassônico						
Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	153,0	124,0	153,0	115,5
30	100	10				
Micro-ondas						
Temperatura (°C)	Tempo (min)		96,0	106,5	96,0	141,0
55	10					
<i>Extrato enzimático bruto*</i>			171,0	151,5	171,0	121,5

*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais.

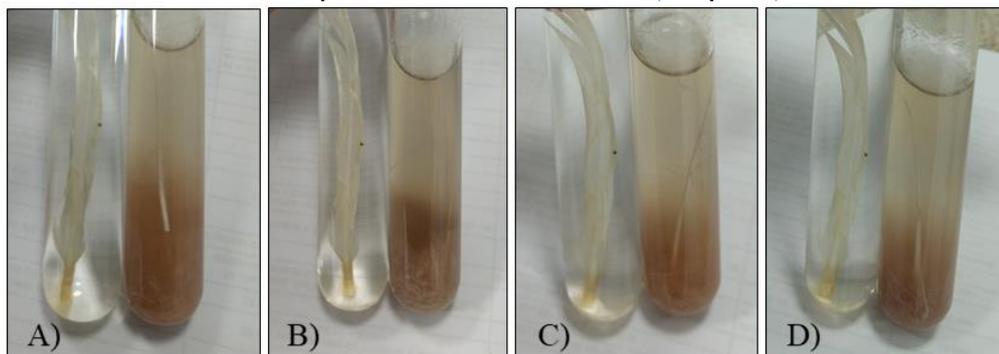
A Figura 3 apresenta os extratos enzimáticos submetidos ao teste de degradação durante 28 dias. As figuras 3A e 3B representam os ensaios no início do teste, e as figuras 3C, 3D e 3E, ao final dos 28 dias de estudo. Nas figuras 3C e 3D é possível observar que houve a decantação dos extratos enzimáticos durante os 28 dias, sendo que após este período os mesmos foram agitados mecanicamente, observando-se a degradação quase completa das penas de frango. Na figura 3E é apresentada a comparação do extrato enzimático contendo penas de frango, em que houve degradação e o ensaio controle, contendo água destilada, sem degradação. Mostrando assim que os extratos enzimáticos possuem potencial para degradar resíduos queratinosos como as penas de frango.

Figura 4 - Pelos suínos não degradados nos ensaios com o extrato enzimático bruto (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Controle, B) Extrato enzimático bruto, C) Extrato enzimático - sonda ultrassônica, D) Extrato enzimático - banho ultrassônico, e E) Extrato enzimático - micro-ondas.



Com relação às penas de frango, foi observada a degradação quase completa das penas, restando somente a raque (estrutura mais rígida da pena). Este comportamento foi observado no extrato enzimático bruto e também nos extratos enzimáticos submetidos à exposição aos sistemas reacionais. O ensaio controle contendo penas de frango não apresentou degradação visualmente (Figura 5).

Figura 5 - Degradação de penas de frango visualizada no extrato enzimático bruto (*homemade*) e nos extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Extrato enzimático bruto, B) Extrato enzimático - sonda ultrassônica, C) Extrato enzimático - banho ultrassônico, e D) Extrato enzimático - micro-ondas, comparados com o ensaio controle (à esquerda).



Pelos suínos e penas de frango fazem parte do grupo das queratinas duras devido à grande concentração de cisteína, o que os torna bastante resistentes (Korniłowicz-Kowalska e Bohacz 2011). No entanto, a α -queratina presente na estrutura do pelo suíno possui grandes quantidades de enxofre, o que confere propriedades mecânicas altamente resistentes (Holkar et

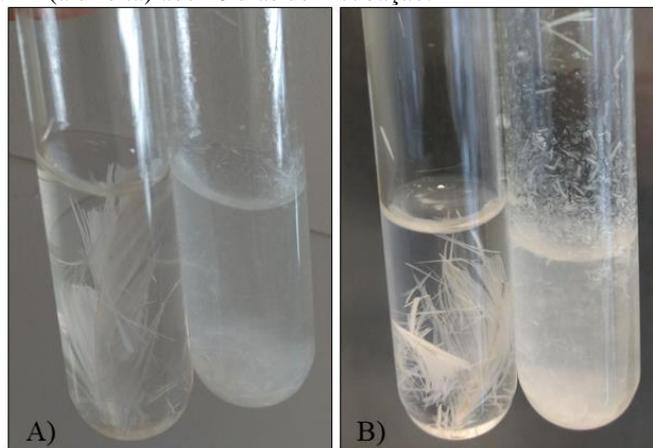
al. 2018). Isto explica o fato das penas de frango serem mais facilmente degradadas em relação aos pelos suínos.

Além disso, a estrutura da queratina formada por ligações dissulfeto garante estabilidade e resistência à degradação enzimática. Kunert (1989) afirma que a redução das ligações dissulfeto pode influenciar consideravelmente na degradação da estrutura da queratina, garantindo uma hidrólise de queratina eficiente. O processo exato de degradação envolve uma série de mecanismos de ação que ocorrem em três etapas. A queratinólise mecânica ocorre pela ação de fungos produtores de micélio, envolvendo a penetração do mesmo no resíduo de queratina. Em seguida, ocorre a hidrólise das ligações dissulfeto, responsáveis por garantir a resistência e a estabilidade da estrutura da queratina. Finalmente, ocorre a proteólise envolvendo a ação da enzima propriamente dita (Kunert 1989; Onifade et al. 1998).

Dessa forma, possivelmente o extrato enzimático *homemade* foi capaz de atuar nas ligações dissulfeto e de reduzir a concentração de cistina, presente na estrutura da queratina de penas de frango, além de converter a molécula de enxofre em estruturas menores (Jaouadi et al. 2013).

Avaliou-se também a degradação de penas de frango nos extratos enzimáticos das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA. Foi observado que ao longo dos 28 dias de incubação somente a enzima CIBENZA foi capaz de degradar quase totalmente as penas de frango, apresentando degradação logo aos 14 dias de incubação. Para o extrato enzimático contendo a enzima comercial K4519 SIGMA não foi observada degradação (Figura 6), assim como não foi visualizada a degradação de pelos suínos.

Figura 6 - Teste de degradação com o extrato enzimático das enzimas comerciais K4519 SIGMA e CIBENZA para penas de frango ao longo de 28 dias de incubação. A) Enzima comercial K4519 SIGMA (à esquerda) e enzima comercial CIBENZA (à direita) aos 14 dias de incubação, B) Enzima comercial K4519 SIGMA (à esquerda) e enzima comercial CIBENZA (à direita) aos 28 dias de incubação.



Visto isso, os resultados obtidos para o teste de degradação com os extratos enzimáticos (*homemade*) são promissores em função do potencial de degradação de resíduos queratinosos obtido. A enzima comercial K4519 SIGMA possui um alto custo de obtenção no mercado, é altamente concentrada e estável, no entanto, não apresentou potencial de degradação dos resíduos queratinosos submetidos aos testes. Já a enzima comercial CIBENZA degradou as penas de frango em apenas 14 dias, apresentando grande potencial de degradação de resíduos queratinosos, igualando-se às enzimas *homemade*, visto que ambas são produzidas a partir de substratos não homogêneos e de baixo custo.

Para o extrato enzimático na forma concentrada e após exposição aos sistemas reacionais, foram observados aumentos expressivos de atividade queratinolítica ao longo dos 28 dias (Tabela 10).

Tabela 10 - Medida de atividade queratinolítica no tempo inicial e após 28 dias para o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após a exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por micro-ondas contendo pelos suínos e penas de frango.

			Pelos suínos		Penas de frango	
			0° dia	28° dia	0° dia	28° dia
Extratos enzimáticos (<i>homemade</i>)			Atividade (U/mL)		Atividade (U/mL)	
Sonda Ultrassônica						
Tempo (min)	Potência (%)	Pulso (un)	159,5	231,0	159,5	192,5
2	40	1				
Banho Ultrassônico						
Temperatura (°C)	Potência (%)	Tempo (min)	141,8	202,0	141,8	181,5
30	100	10				
Micro-ondas						
Temperatura (°C)	Tempo (min)		149,0	229,5	149,0	191,5
55	10					
<i>Extrato enzimático bruto*</i>			103,8	-	103,8	-
<i>Extrato enzimático concentrado*</i>			159,3	-	159,3	-

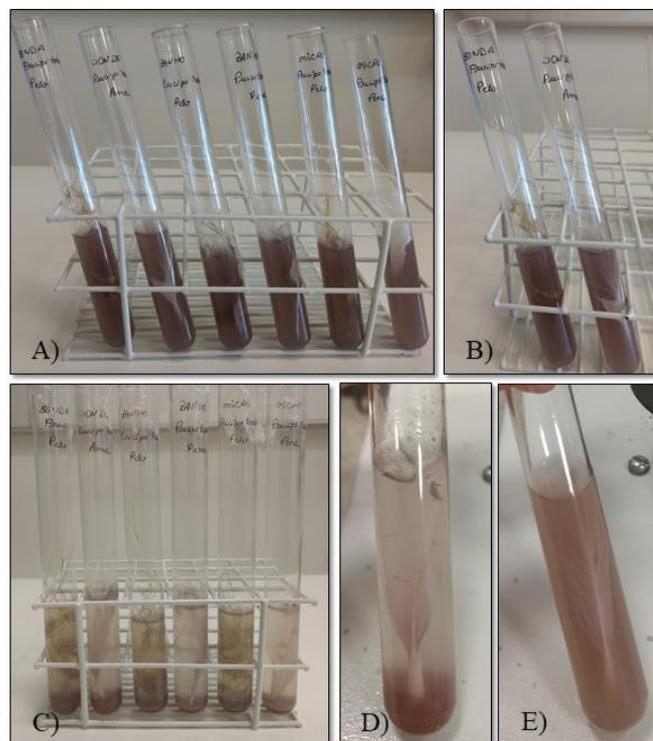
*Extrato enzimático obtido após a FS sem exposição aos sistemas reacionais.

*Extrato enzimático concentrado sem exposição aos sistemas reacionais.

No que diz respeito à degradação, esta não foi visualizada em nenhum dos resíduos estudados (Figuras 7, 8 e 9). Percebe-se que nos ensaios onde houve altos valores de atividade queratinolítica, os percentuais de degradação foram baixos ou quase inexistentes com base na degradação visível dos resíduos. Isto está de acordo com o estudo de Riffel e Brandelli (2006), em que foi verificado altos valores para atividade queratinolítica, porém, a enzima concentrada não foi capaz de degradar penas de frango. Os autores sugerem que nesses casos há a necessidade da atuação de outras enzimas, tais como dissulfeto redutases e proteases, para que então ocorra a degradação de resíduos queratinosos (Fang et al. 2013b).

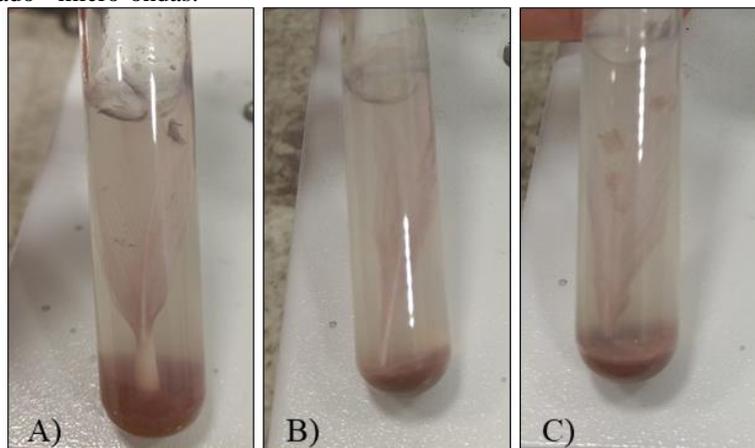
A Figura 7 apresenta os extratos enzimáticos concentrados submetidos ao teste de degradação durante 28 dias. As figuras 7A e 7B representam os ensaios no início do teste, e as figuras 7C, 7D e 7E, os ensaios ao final dos 28 dias de estudo. Nas figuras 7C e 7D é possível observar que houve a decantação dos extratos enzimáticos durante os 28 dias, sendo que após este período os mesmos foram agitados com auxílio de agitador magnético, no entanto, não foi observada a degradação de nenhum dos resíduos avaliados (Figura 7E).

Figura 7 - Teste de degradação contendo o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas com os resíduos queratinosos, pelos suínos e penas de frango, no tempo inicial (A e B) e após 28 dias (C, D e E).



A figura 8 apresenta os extratos enzimáticos concentrados submetidos aos sistemas reacionais ultrassônicos (sonda e banho) e irradiação de micro-ondas. Nota-se que não houve a degradação das penas de frango submetidas ao teste de degradação.

Figura 8 - Extrato enzimático concentrado (*homemade*) e extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas, contendo penas de frango não degradadas. A) Extrato enzimático concentrado - sonda ultrassônica, B) Extrato enzimático concentrado - banho ultrassônico e C) Extrato enzimático concentrado - micro-ondas.



Isto também ocorreu nos extratos enzimáticos concentrados contendo pelos suínos. Observa-se na Figura 9 que não houve a degradação dos resíduos queratinosos em nenhum dos extratos enzimáticos estudados.

Figura 9 - Pelos suínos não degradados nos ensaios com o extrato enzimático concentrado (*homemade*) e os extratos enzimáticos após exposição aos sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas. A) Extrato enzimático concentrado - sonda ultrassônica, B) Extrato enzimático concentrado - banho ultrassônico e C) Extrato enzimático concentrado - micro-ondas.



Ao longo do período de estudo foram observados elevados valores para a atividade enzimática, inclusive aumentando com relação à atividade queratinolítica inicial, porém, não houve degradação dos resíduos queratinosos, possivelmente por conta da presença de inibidores (Hamiche et al. 2019). Outro fator que pode explicar a não degradação é o fato da enzima estar concentrada, conseqüentemente a quantidade de impurezas foi reduzida, e dessa forma ela não possui potencial de degradação de resíduos (Riffel e Brandelli 2006).

5 SÚMULA DOS RESULTADOS OBTIDOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da atividade de queratinases expostas a diferentes sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas e verificar o potencial de pré-tratamento de resíduos agroindustriais por ultrassom. Também foi avaliada a concentração enzimática visando incremento de atividade e o potencial de aplicação dos extratos enzimáticos na degradação de resíduos queratinosos.

Visto isso, observou-se que o pré-tratamento em sonda ultrassônica utilizando a macroponta causa maior dissipação de energia por conta do maior diâmetro em relação à microponta, aumentando assim as taxas de reação e facilitando o processo de degradação das estruturas expostas devido a propagação de ondas ultrassônicas, resultando em maior perda de massa em três dias. Com isso, a utilização da sonda ultrassônica como pré-tratamento pode ser bastante útil quando busca-se maior produção enzimática num menor tempo. Por outro lado, para processos mais longos a utilização de resíduos sem pré-tratamento se torna mais promissora, diminuindo também o gasto energético, pois a atividade enzimática alcançada ao longo do tempo é maior.

Com relação à avaliação do comportamento das queratinases frente aos sistemas reacionais, observaram-se comportamentos diferentes dos extratos enzimáticos obtidos a partir de resíduos pré-tratados em sonda ultrassônica e sem pré-tratamento, mostrando que é possível produzir enzimas com diferentes características e comportamentos. Dentre os sistemas reacionais avaliados, a sonda ultrassônica se mostrou mais promissora, gerando o maior incremento de atividade enzimática.

O extrato enzimático obtido a partir de pelos suínos sem pré-tratamento obteve um incremento de atividade expressivo quando submetido à técnica de concentração enzimática, mostrando que técnicas simples e de baixo custo podem ser eficientes quando o objetivo é a obtenção de maiores atividades enzimáticas. Quando exposto aos sistemas reacionais, o extrato enzimático concentrado apresentou estabilidade devido a separação dos interferentes durante a concentração.

Quanto ao potencial de degradação foi verificado que o extrato enzimático bruto possui potencial de degradar penas de frango. Para o extrato enzimático concentrado não foi observada degradação. Comparando com os extratos enzimáticos das enzimas comerciais, a enzima CIBENZA apresentou degradação visível de penas de frango e a enzima K4519 SIGMA não apresentou esta característica, tornando-se assim um resultado bastante interessante.

6 CONCLUSÃO

Processos biotecnológicos que envolvam a biodegradação de resíduos queratinolíticos por meio da ação de microrganismos e enzimas são uma alternativa promissora para melhorar a degradabilidade destes resíduos, uma vez que isso acarreta em valor agregado ao material. Dessa forma, o uso de sistemas reacionais ultrassônicos e por irradiação de micro-ondas são alternativas viáveis para avaliação do comportamento das queratinases e do potencial de pré-tratamento de resíduos queratinosos. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho são promissores, uma vez que os estudos nesta área são escassos, principalmente no que diz respeito à utilização de sistemas reacionais e queratinases em conjunto.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base na literatura e nas observações realizadas durante o desenvolvimento deste projeto, podem ser avaliados para estudos futuros:

- Aplicação dos extratos enzimáticos como aditivos em detergentes comerciais, para fins de remoção de resíduos de difícil limpeza;
- Aplicação no tratamento de incrustações na tubulação da indústria de curtimento de couro;
- Fermentação em Estado Sólido e exposição aos sistemas reacionais;
- Ampliação de escala em Biorreator;
- Entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., Hashem, A. M. 2018. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 16, 311-318.
- Adetunji, C. O., Adejumo, I. O. 2018. Efficacy of crude and immobilized enzymes from *Bacillus licheniformis* for production of biodegraded feather meal and their assessment on chickens. **Environmental Technology and Innovation**, 11, 116-124.
- ANTON PAAR. Reator de Micro-ondas Monowave 100 ANTON PAAR. Disponível em: <<https://www.anton-paar.com/br-pt/produtos/detalhes/sintese-assistida-por-micro-ondas-monowave-400200/>>. Acesso em: 25 mai. 2018.
- Azmi, N. A., Idris, A., Yusof, N. S. M. 2018. Ultrasonic technology for value added products from feather keratin. **Ultrasonics - Sonochemistry**, 47, 99-107.
- Barton, S., Bullock, C., Weir, D. 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. **Enzyme and Microbial Technology**, 18, 190-194.
- Bhange, K., Chaturvedi, V., Bhatt, R. 2015. Potential biofilm dispersal by a partially purified keratinase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* strain Kb2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4, 801-805.
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. **Food and Bioprocess Technology**, 1, 105-116.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., Riffel, A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied and Environmental Microbiology**, 85, 1735-1750.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, 73, 3-12.
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., Verneuil, B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied and environmental microbiology**, 65, 2570-2578.
- Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Doni, M. B., Arsene, M. L., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, V. 2017. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. **Electronic Journal of Biotechnonology**, 28, 101-112.
- Cervantes-González, E., Rojas-Avelizapa, L. I., Cruz-Camarillo, R., Rojas-Avelizapa, N. G. 2009. Effect of keratinous waste addition on improvement of crude oil hydrocarbon removal by a hydrocarbon-degrading and keratinolytic mixed culture. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 63, 1018-1022.

Choińska-Pulit, A., Łaba, W., Rodziewicz, A. 2019. Enhancement of pig bristles waste bioconversion by inoculum of keratinolytic bacteria during composting. **Waste Management**, 84, 269-276.

Condon, B., Easson, M., Yachmenev, V., Lambert, A., Delhom, C., Smith, J. 2009. Application of a low-level, uniform ultrasound field for the acceleration of enzymatic bio-processing of cotton. **Cellulose Chemistry and Technology**, 43, 443-453.

Coulombe, P. A., Omary, M. B. 2002. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Current Opinion In Cell Biology**, 14, 110-122.

ECO-SONICS. Desruptor de células. Disponível em:
<<https://www.ecosonics.com.br/produto/20/desruptor-de-celulas>>. Acesso em: 02 jun. 2018.

Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G., Chen, J. 2013a. Biodegradation of wool waste and keratinase production in scale-up fermenter with different strategies by *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1. **Bioresource Technology**, 140, 286-291.

Fang, Z., Zhang, J., Liu, C., Du, G., Chen, J. 2013b. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 82, 166-172.

Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E., Ladisch, M. R. 2016. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation process: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, 90, 53-60.

Gegeckas, A., Šimkutė, A., Gudiukaitė, R., Čitavičius, D. J. 2018. Characterization and application of keratinolytic paptidases from *Bacillus* spp. **International Journal of Biological Macromolecules**, 113, 1206-1213.

Golunski, S.M., Scapini, T., Modkovski, T.A., Marques, C.T., Camargo, A.F., Preczeski, K.P., Dalla Rosa, C., Baldissarelli, D.P., Mulinari, J., Venturin, B., Vargas, G.D.L.P., Buffon, J.G., Mossi, A.J., Treichel, H. 2017. Commercial and Noncommercial Peroxidases Activity under Ultrasound and Microwave Treatment: a Pretreatment to Improve Wastewater Treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 28, 1890-1895.

Gupta, R., Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 21-33.

Grintsevich, E.E., Adzerikho, I.E., Mrochek, A.G., Metelitz, D.I. 2001, Polydisulfides of Substituted Phenols as Effective Protectors of Peroxidase against Inactivation by Ultrasonic Cavitation. **Biochemistry**, 66, 740-746.

Hamiche, S., Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Badis, A., Jaouadi, B. 2019. Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 122, 758-769.

Holkar, C.R., Jain, S.S., Jadhav, A.J., Pinjari, D.V. 2018. Valorization of keratin waste. **Process Safety and Environmental Protection**, 115, 85-98.

Ire, F. S., Onyenama, A. C. 2017. Effects of Some Cultural Conditions on Keratinase Production by *Bacillus licheniformis* Strain NBRC 14206. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, 13, 1-13.

Jaouadi, N.Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A.B., Aicha, H.B., Toumi, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2013. Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. **PLOS ONE**, 8, 1-17.

Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Elhoul, M. B., Rahem, F. Z., Hila, C. G., Aicha, H. S. B., Badis, A., Toumi, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2015. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. **International Journal of Biological Macromolecules**, 79, 952-964.

Jin, J., Ma, H., Qu, W., Wang, K., Zhou, C., He, R., Luo, L., Owusu, J. 2015. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: Kinetics and thermodynamics study. **Ultrasonics Sonochemistry**, 27, 46-53.

Kapturowska, A.U., Stolarzewicz, I.A., Krzyczkowska, J. 2012. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, 19, 186-191.

Kaul, S., Sumbali, G. 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. **Mycopathologia**, 139, 137-140.

Khan, N.R., Rathod, V.K. 2018. Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters: A mini - review. **Process Biochemistry**, 75, 89-98.

Kim, J. M., Lim, W. J., Suh, H. J. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. **Process Biochemistry**, 37, 287-291.

Korniłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Management**, 31, 1689-1701.

Kunert, K. 1989. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. **Journal of Basic Microbiology**, 29, 597-604.

Leaes, E.X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A.P., Dal Prá, V., Bassaco, M.M., Terra, L.M., Mazutti, M.A. 2013. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2, 21-25.

Leonelli, C., Mason, T.J. 2010. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, 49, 885-900.

Lippert, T., Bandelin, J., Musch, A., Drewes, J.E., Koch, K. 2018. Energy-positive sewage sludge pre-treatment with a novel ultrasonic flatbed reactor at low energy input. **Bioresource**

Technology, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.073>.

Lopes, F. C., Silva, L. A. D., Tichota, D. M., Daroit, D. J., Velho, R. V., Pereira, J. Q., Corrêa, A. P. F., Brandelli, A. 2011. Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin-Degrading *Aspergillus niger*. **Enzyme Research**, 2011, 1-9.

Lopes, L.C., Barreto, M.T.M., Gonçalves, K.M., Alvarez, H.M., Heredia, M.F., Souza, R.O.M.A., Cordeiro, Y., Dariva, C., Fricks, A.T. 2015. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, 69, 10-18.

Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., Zhu, W. 2011. Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, 18, 419-424.

Manasseh, R., Tho, P., Ooi, A., Petrovic-Duran, K., Zhu, Y. 2010. Cavitation microstreaming and material transport around microbubbles. **Physics Procedia**, 3, 427-432.

Mason, T.J., Cobley, A.J., Graves, J.E., Morgan, D. 2011. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, 18, 226-230.

McClements, D.J. 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. **Trends in Food Science & Technology**, 6, 293-299.

Mazinani, S. A., Delong, B., Yan, H. 2015. Microwave radiation accelerates trypsin-catalyzed peptide hydrolysis at constant bulk temperature. **Tetrahedron Letters**, 56, 5804-5807.

Mazotto, A. M., Melo, A. C. N., Macrae, A., Rosado, A. S., Peixoto, R., Cedrola, S. M. L., Couri, S., Zingali, R. B., Villa, A. L. V., Rabinovitch, L., Chaves, J. Q., Vermelho, A. B. 2011. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27, 1355-1365.

Mazotto, A. M., Couri, S., Damaso, M. C. T., Vermelho, A. B. 2013. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 85, 189-195.

Moritz, J.S., Latshaw, J.D. 2001. Indicators of Nutritional Value of Hydrolyzed Feather Meal. **Poultry Science**, 80, 79-86.

Mulinari, J., Venturin, B., Sbardelotto, M., Dall Agnol, A., Scapini, T., Camargo, A. F., Baldissarelli, D. P., Modkovski, T. A., Rossetto, V., Dalla Rosa, C., Reichert Jr. F. W., Golunski, S. M., Vargas, G. D. L. P., Dalla Rosa, C., Mossi, A. J., Treichel, H. 2017. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by *homemade* lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, 35, 313-318.

Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., Al-Zarban, S. 1998. A Review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, 66, 1-11.

Ovsianko, S.L., Chernyavsky, E.A., Minchenya, V.T., Adzerikho, I.E., Shkumatov, V.M. 2005. Effect of ultrasound on activation of serine proteases precursors. **Ultrasonics Sonochemistry**, 12, 219-223.

Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Bera, S., Maity, C., Mandal, A., Das, P. S., Mohapatra, P. K., Pati, B. R., Mondal, K. C. 2013. Exploitation of chicken feather waste as a plant growth promoting agent using keratinase producing novel isolate *Paenibacillus woosongensis* TKB2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2, 50-57.

Poole, A.J., Church, J.S., Huson, M.G. 2009. Environmentally Sustainable Fibers from Regenerated Protein. **Biomacromolecules**, 10, 1-8.

Potapovich, M.V., Eremin, A.N., Metelitzka, D.I. 2003. Kinetics of Catalase Inactivation Induced by Ultrasonic Cavitation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 39, 140-146.

Preczeski, K. P., Kamanski, A. B., Scapini, T., Camargo, A. F., Modkoski, T. A., Rossetto, V., Venturin, B., Mulinari, J., Golunski, S. M., Mossi, A. J., Treichel, H. 2018. Efficient and low-cost alternative of lipase concentrating aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 41, 851-857.

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. 2020. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as keratinase producers using swine hair from agroindustrial residues. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 10.3389/fbioe.2020.00071

Rai, S. K., Mukherjee, A. K. 2011. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, 54, 47-56.

Rai, S. K., Mukherjee, A. K. 2015. Optimization for production of liquid nitrogen fertilizer from the degradation of chicken feather by iron-oxide (Fe_3O_4) magnetic nanoparticles coupled β -keratinase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 4, 632-644.

Reddy, M. R., Reddy, K. S., Chounhan, Y. R., Bee, H., Reddy, G. 2017. Effective feather degradation and keratinase production by *Bacillus pumilus* GRK for its application as bio-detergent additive. **Bioresource Technology**, 243, 254-263.

Resa, P., Elvira, L., Sierra, C., Espinosa, F.M. 2009. Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts. **Analytical Biochemistry**, 384, 68-73.

Riffel, A., Brandelli, A. 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37, 395-399.

Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. 2014. Protimiza Experimental Design. Disponível em: <http://experimental-design.protimiza.com.br/>. Acesso em: 10 jan. 2019.

Sanghvi, G., Patel, H., Vaishnav, D., Oza, T., Dave, G., Kunjadia, P., Sheth, N. 2016. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, 87, 256-262.

Scott, J. A., Untereiner, W. A. 2004. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. **Medical Mycology**, 42, 239-246.

SIGMA-ALDRICH. K4519 SIGMA Keratinase. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k4519?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 28 mai. 2018.

Su, C., Gong, J., Zhang, R., Tao, L., Dou, W., Zhang, D., Li, H., Lu, Z., Xu, Z., Shi, J. 2017. A novel alkaline surfactant-stable keratinase with superior feather-degrading potential based on library screening strategy. **International Journal of Biological Macromolecules**, 95, 404-411.

Thankaswamy, S. R., Sundaramoorthy, S., Palanivel, S., Ramudu, K. N. 2018. Improved microbial degradation of animal hair waste from leather industry using *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982). **Journal of Cleaner Production**, 189, 701-708.

Wang, L. C. 1981. Soybean Protein Agglomeration: Promotion by Ultrasonic Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 29, 177-180.

Wang, J., Yanping, C., Sun, B., Wang, C., Mo, Y. 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. **Ultrasonics Sonochemistry**, 18, 534-540.

Wang, F., Chen, Z., Zhu, H. 2013. An efficient enzymatic modification of lily polysaccharide in ionic liquid under ultrasonic irradiation. **Biochemical Engineering Journal**, 79, 25-28.

Yadav, G.D., Borkar, I.V. 2009. Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 48, 7915-7922.

Yang, C., Fang, T.J. 2015. Kinetics for enzymatic hydrolysis of rice hulls by the ultrasonic pretreatment with a bio-based basic ionic liquid. **Biochemical Engineering Journal**, 100, 23-29.

Yusof, N. S. M., Ashokkumar, M. 2015. Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles by Using High Intensity Focused Ultrasound. **ChemPhysChem**, 16, 775-781.

Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Khalil, K. A., Dahalan, F. A., Shukor, M. Y. 2016. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-*Alcaligenes* sp. AQ05-001. **Journal of Environmental Management**, 183, 182-195.

Zou, S., Wang, X., Chen, Y., Wan, H., Feng, Y. 2016. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion by ultrasonic pretreatment. **Energy Conversion and Management**, 112, 226-235.

APÊNDICE A - Artigo**REACTIONAL ULTRASONIC SYSTEMS AND MICROWAVE IRRADIATION FOR
PRETREATMENT OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE TO INCREASE ENZYMATIC
ACTIVITY**

Fabiane Fernanda Czapela ^a, Simone Kubeneck ^a, Karina Paula Preczeski ^a, Caroline Dalastra ^a, Thamarys Scapini ^a, Charline Bonatto ^a, Fábio Spitz Stefanski ^a, Aline Frumi Camargo ^a, Jessica Zanivan ^a, Altemir José Mossi ^a, Gislaine Fongaro ^b, Helen Treichel ^{a,*}

^aLaboratory of Microbiology and Bioprocesses, Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Rodovia ERS 135 - km 72, nº 200, Erechim, RS, Brazil. Zip code 99700-970.

^b Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Florianópolis - UFSC, Engenheiro Agrônomo Andrei Cristian Ferreira St., Trindade, Florianópolis, SC, Brazil. Zip code 88040-900.

*Corresponding author: helentreichel@gmail.com

HIGHLIGHTS

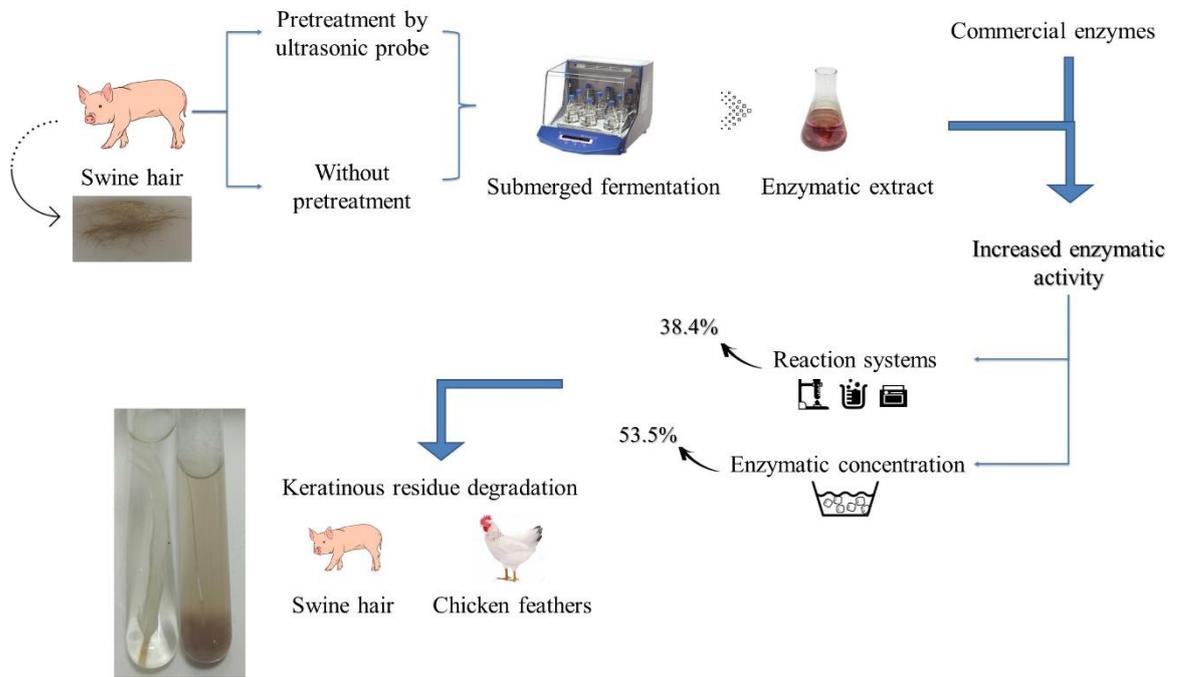
- The macropoint causes greater energy dissipation in less time;
- Swine hair without pretreatment is more efficient in terms of residue degradation;
- Reaction systems are promising in terms of increasing enzyme activity;
- The enzyme concentration technique increases enzymatic activity;
- Homemade enzymes have great potential for degradation of keratinous residues.

Abstract

Keratinous residues are generated in large quantities in industrial processes and because of this they are difficult to manage because the presence of keratin. Keratinases are emerging as promising alternatives in technological processes. The objective of this work was to determine the potential of pretreatment of agro-industrial residues using an ultrasonic probe, and to evaluate activity enhancement strategies by analyzing the behavior of enzymatic activity of keratinases exposed to various reaction systems as well as to enzymatic concentration. We tested the application of enzymatic extracts in the degradation of keratinous residues. Submerged fermentation was performed with swine hair pretreated with and without ultrasonic probe. The enzymatic extracts were exposed to reaction systems and the enzymatic concentration technique to measure the increments of enzymatic activity. We found that the ultrasonic probe increased reaction rates, enabling higher enzyme production in shorter time periods. The ultrasonic probe reached 38.4% of relative activity and the enzyme concentration, increased the enzymatic activity in 53.5%. We observed potential degradation of chicken feathers with homemade enzyme extracts. Taken together, our findings suggest that the results obtained in this work are promising, despite the fact that the data in this area are scarce.

Keywords: Reaction system, Keratin residues, Biotechnological processes.

Graphical Abstract



1. Introduction

Keratinous waste is generated in large quantities; management is hampered by its resilient structure (Onifade et al., 1998; Łaba et al., 2015). These residues consist of fibrous proteins such as keratins that are resistant to physical, chemical and enzymatic actions (Korniłłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011). When found in their solid state, the structure of the keratin increases its stiffness because of cysteine bonds (Barone et al., 2006), as well as by α and β -keratin chains and disulfide bonds (Onifade et al., 1998). A α -keratin can be found in materials such as hair, fur, nails, hooves and animal horns, while β -keratin is present in scales, bird feathers and beaks (Korniłłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011; Mazotto et al., 2011; Ire and Onyenama, 2017).

One way to promote the degradation of these residues is via biotechnological processes, allowing degradation through the action of specific enzymes such as keratinases (Gupta and Ramnani, 2006; Brandelli, 2008; Brandelli, Daroit and Riffel, 2010; Gegeckas et al., 2018). Keratinases (EC 3.4.21/24/99.11) are a class of proteases with the specific potential to hydrolyze keratin, giving them a prominent role over other proteases (Brandelli, Daroit and Riffel, 2010; Gegeckas et al., 2018). These enzymes have applications such as biotechnology (Okoroma et al., 2012; Mazotto et al., 2013; Paul et al., 2014; Brandelli, Sala and Kalil, 2015) and waste degradation (Fang et al., 2013a; Yusuf et al., 2016; Su et al., 2017; Abdel-Fattah et al., 2018; Thankaswamy et al., 2018). They can be obtained commercially or from submerged fermentation (FS) or solid-state fermentation (FES) through microorganisms (Mazotto et al., 2013) such as fungi (Kushwaha, 1983; Santos et al., 1996), considered good producers of keratinases; they can also be isolated from keratinous waste disposal sites (Kaul and Sumbali, 1997; Riffel and Brandelli, 2006). When obtained in this way, they are designated “homemade” and can be used in crude or concentrated form, a technique that combines the interaction of the enzyme with salts and solvents so as to separate out interferents (Preczeski et al., 2018).

Because of the biotechnological importance of keratinases, several studies have been performed to improve the activity and evaluate the conformational change of enzymes in general, when exposed to different reaction systems, including ultrasonic probe and bath and microwave (Ma et al., 2011; Jin et al., 2015; Mazinani, DeLong and Yan, 2015). Simple and efficient heating technologies increase enzyme activity and conformational change (Ma et al., 2011); residue pretreatment techniques using an ultrasonic probe (Azmi, Idris and Yusof, 2018), makes the structures more accessible to microbial and enzymatic attack (Yusof and Ashokkumar, 2015).

The present study aimed to evaluate the potential for pretreatment of agro-industrial residues using an ultrasonic probe and to investigate the behavior of keratinases exposed to the following reaction systems: ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave and enzymatic concentration technique. In addition to comparing the activity of homemade enzymes with commercial enzymes and finally, we applied enzymatic extracts for the degradation of keratinous residues such as swine hair and chicken feathers.

2. Materials and methods

2.1 Keratin substrates

Swine hair and chicken feathers were obtained from a food agroindustry in Rio Grande do Sul, Brazil. Residues were stored at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Prior to use, the residues were washed with water and detergent, and immersed in 70% alcohol for 1 h, followed by drying at $70 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 h (Adapted Călin et al., 2017). Chicken feathers were used in the degradation tests only.

2.2 Swine hair pretreatment by ultrasonic probe

Swine hair (1 g) underwent pretreatment using an ultrasonic probe, comparing the micropoint and macropoint. The variables used were power (100%), pulse (3) and exposure time (15 min) using distilled water as a liquid medium (Adapted from Azmi, Idris and Yusof, 2018). The tests were performed with the ECO-SONICS Ultrasonic Probe/Cell Disrupter Sonicator, 20 KHz ultrasonic frequency and 550 W ultrasonic power, equipped with a 4-mm titanium micropoint and 13 mm diameter titanium macropoint.

The sonicated content was filtered on filter paper and the solid fraction was subjected to a microbial load reduction process using 70% alcohol and heating at $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 h before starting fermentation.

2.3 Submerged fermentation

Submerged fermentation was performed with swine hair. To this end, 10 g L^{-1} of pretreated and not pretreated ultrasonic probe residue was poured into 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.5) with the addition of 10^6 spores mL^{-1} of *Fusarium oxysporum*. The fermentative medium was incubated at 150 rpm and $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 9 days (Preczeski et al., 2020). The fungus used was isolated from soil-borne chicken feather residues and identified by the Next Generation Sequencing (NGS) method.

At the end of the fermentation, the fermented medium was filtered and the retained solid fraction was dried to quantify the degradation percentage of the agro-industrial residue. The filtrate was used to measure keratinolytic activity and exposure in different reaction systems. Keratinolytic activity was quantified at 3, 6 and 9 days and the percentage of residue degradation after 9 days.

2.4 Keratinase assay

Keratinolytic activity was measured using 0.013 g azoqueratin as substrate (SIGMA-ALDRICH K8500 α -K), 3.2 mL 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.5) and 0.8 mL enzyme extract. The reaction took place in an ultrathermostatic bath at 50 °C for 1 h, after which 0.8 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to stop the reaction, reading at 595 nm spectrophotometer (Adapted Bressollier et al., 1999).

One unit of keratinase activity was defined as the amount of enzyme required to produce a 0.01 absorbance increase under the described assay conditions. Enzyme activity was determined before and after exposure to reaction systems. Relative activity (%) was also calculated for activity increment purposes.

2.5 Enzyme activity increase

2.5.1 Exposure of enzyme extracts to reaction systems

Enzymatic extracts produced using swine hair as substrate pretreated with ultrasonic probe with macropoint and not pretreated were exposed to ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave using the experimental design methodology, aiming to evaluate the behavior of the enzymes. Each reaction system was evaluated using central composite design (CCD) based on previously defined independent variables, according to reaction interest and system possibilities. The response variable was relative activity (%), resulting from the variation between keratinolytic activities of the extract before and after exposure to reaction systems.

2.5.1.1 Ultrasonic probe

A 20 mL aliquot of the crude enzyme extract was exposed to the ECO-SONICS Cell Disruptor Probe (20 KHz and 550 W) equipped with a 4-mm diameter titanium micropoint. The behavior of keratinases was evaluated under different conditions of exposure time (2 to 10 minutes), power (40% to 80%) and pulse (1 to 3) following experimental design.

2.5.1.2 Ultrasonic bath

In this reaction system, 2 mL aliquots of the crude enzyme extract were exposed to the ultrasonic bath, varying the temperature (°C), the power (%) and the exposure time (min) of the enzyme extract according to experimental design. The equipment used was the UNIQUE Ultrasonic Washer, model USC-1800 A, frequency US 40 KHz and maximum power of 137 W (0.42 W cm^{-2}). The tests were performed with ultrasonic bath temperature ranging from 30 to 80 °C, ultrasonic power ranging from 0 to 100% and with exposure time of 10 to 40 minutes, following experimental design (Mulinari et al., 2017).

2.5.1.3 Microwave

Aliquots of 3 mL of crude enzyme extract were exposed to microwave, varying conditions according to experimental design. Exposure of the enzyme to microwaves was evaluated in the time range of 5 to 15 minutes, using temperatures between 30 and 80 °C, according to the methodology described by Mazinani, Delong and Yan, (2015). The equipment used was the ANTON PAAR Monowave 100 Microwave Reactor which has unpulsed 500 W output power (ANTON PAAR).

2.5.2 Enzymatic concentration

To test the most economically viable enzymatic activity increment methods, the enzyme concentration technique was performed. Enzyme extracts obtained from the fermentation process were concentrated using 0.5 mol L^{-1} NaCl and 50% (v v⁻¹) acetone. The tests were performed in an ice bath at 4 °C. After centrifugation at $9500 \times g$, 4 °C and 20 min, the supernatant phase was discarded and the precipitate was resuspended with 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.5) (Preczeski et al., 2018).

The concentrated enzymatic extract (homemade) was exposed to reaction systems under the conditions of greatest activity increase in experimental designs and applied to the degradation of swine hair and chicken feathers, aiming to evaluate the degradation potential of keratinous residues.

2.6 Commercial enzymes and reaction systems

The activity of the homemade enzyme extract was compared with that of the commercial enzyme K4519 SIGMA with initial enzymatic activity of 2812.5 U mL^{-1} . K4519 SIGMA keratinase was diluted in 5 mM phosphate buffer (pH 7.0). The enzyme was exposed to the optimal enzymatic increment conditions obtained in the experimental designs for the ultrasonic

probe, ultrasonic bath and microwave and was subsequently used for the degradation of keratinous residues.

2.7 Evaluation of keratin residue degradation

Swine hair and chicken feather degradation was evaluated using crude and concentrated enzyme extracts, both with and without exposure to reaction systems. The degradation potential of agro-industrial residues was also evaluated using the commercial enzyme extract K4519 SIGMA before and after exposure to reaction systems.

One whole feather or 0.1 g of swine hair was used for each 8 mL of enzyme extract. Assays were incubated at 28 °C for 28 days (Scott and Untereiner, 2004), and the result was evaluated based on visible residue degradation.

2.8 Characterization of homemade keratinase enzymes

For the purpose of obtaining the optimal pH and temperature of the enzyme used, a characterization was carried out evaluating different pH conditions, ranging from 5 to 9 and temperature, from 37 °C to 70 °C. The buffers used were: 50 mM citrate buffer pH 5.0 and 5.7; 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.1, pH 8.4 and pH 9.0; 50 mM Tris HCl buffer pH 8.5. The characterization was carried out in an ultrathermostatic bath and the activity measurement followed that specified in item 2.4.

2.9 Statistical analysis

The experiments were statistically evaluated using CCD and the results of the enzymatic activity were analyzed using Protimiza Experimental Design software (Rodrigues and Iemma, 2014), using 95% confidence analysis of variance ($p < 0.05$). Results were presented as mean \pm standard deviation of triplicate experiments. Statistical differences between data sets were verified using ANOVA and Tukey test.

3. Results and Discussion

3.1 Swine hair pretreatment by ultrasonic probe

The fermentative process to obtain the enzymatic extract was performed using swine hair as the substrate that had been pretreated with or without the ultrasonic probe. Enzymatic activities and degradation percentages were evaluated (**Table 1**).

Table 1

Keratinolytic activity after pretreatment in an ultrasonic probe and without pretreatment at 3, 6 and 9 days, as well as the percentage of degradation obtained at the end of the fermentation process.

Swine hair		Enzymatic activity (U mL ⁻¹)			Degradation (%)
		3 days	6 days	9 days	
Pretreatment by ultrasonic probe	<i>Micropoint</i>	38.8 ± 5.3 ^a	81.0 ± 5.2 ^a	55.7 ± 3.0 ^a	31.8 ± 1.1 ^a
	<i>Macropoint</i>	50.8 ± 5.3 ^b	39.5 ± 4.8 ^b	43.8 ± 1.1 ^b	45.5 ± 0.8 ^b
Without pretreatment		25.0 ± 5.6 ^a	82.2 ± 9.4 ^a	75.2 ± 3.2 ^c	36.3 ± 4.0 ^a

*Equal lowercase letters do not differ from each other by the Tukey test on the column.

The keratinolytic activity obtained on the third day of the fermentation in the swine hair pretreated with the ultrasonic probe macropoint was 50.8 ± 5.3 U mL⁻¹. From this result, it can be inferred that the greater energy dissipation caused by the macropoint resulted in more relevant data of enzymatic activity, because it has a larger diameter than that of the micropoint, which achieved enzymatic activity (38.8 ± 5.3 U mL⁻¹) similar to that obtained with the crude residue (25.0 ± 5.6 U mL⁻¹).

We found that the micropoint did not have the same impact on structure in terms of enzymatic activity for the 3rd day, because the ultrasonic system can be influenced by several factors, including energy dissipation, ultrasonic intensity, temperature, exposure time, and diameter (Lippert et al., 2018), all of which may have resulted in lower erosion efficiency of the structure when using the micropoint than when using the macropoint.

The highest keratinolytic activity was observed for swine hair without pretreatment and with micropoint pretreatment at 6 days of fermentation: 82.2 ± 9.4 U mL⁻¹ and 81.0 ± 5.2 U mL⁻¹, respectively. Regarding the degradation percentage, the highest degradation occurred in the pretreatment test with ultrasonic probe with macropoint ($45.5\% \pm 0.8\%$), and it can be inferred that the abrasion and erosion in the structure of swine hair, which resulted in the highest enzymatic activity in three days for the same assay, also presented the highest dissolution of structural chains that make up the residue in question, resulting in the largest mass loss in this experiment.

The ultrasonic probe increases reaction rates, especially hydrolysis processes (Zou et al., 2016). Ultrasonic systems facilitate structural degradation via propagation of ultrasonic waves that cause bubble cavitation, causing temperature rise, favoring the formation of rapidly

reacting radicals (Wang, 1981; Manasseh et al., 2010; Yusof and Ashokkumar, 2015), improving the enzymatic attack on the substrate (Yang and Fang, 2015). The cavitation process is the fundamental factor for the efficiency of ultrasound pretreatment, because the explosion of bubbles near the surface of the material causes abrasion and erosion, reducing the surface area of the structure and, consequently, improving the processes. hydrolysis and enzyme production (McClements, 1995; Barton, Bullock and Weir, 1996; Mason et al., 2011). Similar observations were reported by Jin et al. (2015), who verified changes in the kinetic characteristics between proteins and substrates in ultrasonic systems, observing the increase in hydrolysis rate, improving the affinity between enzyme and substrate.

Pretreatment with an ultrasonic probe can be considered viable with the use of the macropoint when the objective of the process is enzyme production in shorter times. Visualizing the system in search of an efficient residue degradation and relevant enzymatic activities, the system with swine hair without pretreatment presented greater viability in relation to the higher enzymatic productions of the other experiments, considering that in six days there was an enzymatic production of approximately 38% greater than with the pretreated macropoint residue in three days, and only a 10% difference in residue degradation from the same assay. Comparing the data from the pretreated residue with micropoint, there was no significant difference between the data, suggesting that using the residue without pretreatment is more promising, in addition to ensuring lower energy expenditure.

3.2 Enzyme activity increase

3.2.1 Exposure of enzyme extracts to reaction systems

Exposure to reaction systems was performed to evaluate the behavior of keratinases enzymes in various reaction systems. The ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave were evaluated. Two enzyme extracts were exposed to the reaction systems: a) enzymatic extract from FS carried out with swine hair pretreated with ultrasonic probe with macropoint; b) enzymatic extract from FS carried out with swine hair without pretreatment.

3.2.1.1 Ultrasonic Probe

The enzymatic extracts were exposed to an ultrasonic probe using the micropoint. This was studied based on an experimental matrix (**Table 2**), which presents the results obtained for the independent variables of exposure time, power and pulse, and evaluated relative activity in response.

Table 2

Experimental planning matrix (real and coded values) and relative activity results (%) for the conditions evaluated in the reaction system ultrasonic probe with enzymatic extracts produced from swine hair pretreated by ultrasonic probe and without pretreatment.

Assays	Ultrasonic probe			Relative activity (%)	
	Time (min)	Power (%)	Pulse	Pretreatment by ultrasonic probe	Without pretreatment
1	-1 (2)	-1 (40)	-1 (1)	11.3	38.4
2	+1 (10)	-1 (40)	-1 (1)	0.0	1.4
3	-1 (2)	+1 (80)	-1 (1)	2.7	16.3
4	+1 (10)	+1 (80)	-1 (1)	0.0	9.1
5	-1 (2)	-1 (40)	+1 (3)	0.0	21.1
6	+1 (10)	-1 (40)	+1 (3)	0.0	0.0
7	-1 (2)	+1 (80)	+1 (3)	23.3	25.2
8	+1 (10)	+1 (80)	+1 (3)	0.0	10.3
9	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0.0	0.0
10	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0.0	3.0
11	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0.0	0.0
12	0 (6)	0 (60)	0 (2)	0.0	0.0
Crude enzymatic extract*				75.0 U mL ⁻¹	124.3 U mL ⁻¹

* Enzymatic extract obtained after FS without exposure to reaction systems.

For the enzymatic extract produced from swine hair pretreated using the ultrasonic probe, up to 23.3% were observed in test 7, corresponding to the shortest time evaluated (2 min) (**Table 2**). When subjected to effects analysis, only the time variable was significant, affecting it negatively: the shorter the exposure time to the ultrasonic probe, the greater the keratinolytic activity. Power and pulse were not significant.

For the enzymatic extracts obtained with swine hair that was not pretreated, more promising increments were observed. **Table 2** shows that test 1 showed the largest increase in keratinolytic activity in relation to crude enzyme extract, i.e., 38.4% increase in enzymatic activity. The analysis of the effects of the variables on keratinolytic activity showed that only the time variable was significant in the process, negatively affecting the enzymatic activity: the longer the exposure time to the ultrasonic probe, the lower the keratinolytic activity achieved. As before, power and pulse were not significant in the process. In both cases studied, the statistical model was not validated due to $F_{cal} < F_{tab}$.

The largest increases in activity occurred in the shortest exposure time evaluated (2 min), corroborating the statistical analysis. Ultrasonic systems are responsible for generating

waves that propagate through a liquid, which collapse at high temperatures. This phenomenon is called cavitation. The shear force resulting from the explosion of these microbubbles causes rapid heat and mass transfer, promoting increased enzymatic activity (Jin et al., 2015). Thus, the increase in activity may be a result of the shorter exposure time to the ultrasonic probe that favors the decomposition of interfering molecules and the change in enzymatic specificity, making enzymes more easily accessible to the reaction and consequently increasing their activity, providing an ideal environment for the reaction between enzyme and substrate (McClements, 1995; Jin et al., 2015). The enzyme also remains more regular and flexible because thermodynamic parameters such as E_a , ΔH and ΔS are reduced with the use of ultrasound, causing an improvement in its activity and improving the operational stability of enzymes (Ma et al., 2011; Wang, Chen and Zhu, 2013).

In assays where the exposure time was longer (from 6 to 10 min), the activity was lower and, in some cases, lower than the activity obtained in the enzyme extract without exposure to the ultrasonic probe, possibly due to the enzymatic denaturation caused by the longer exposure time to the ultrasonic probe (Kapturowska, Stolarzewicz and Krzyczkowska, 2012). Denaturation of enzymes can occur due to excess pressure, temperature or even shear force generated during the cavitation phenomenon in the ultrasonic system (Grintsevich et al., 2001; Potapovich, Eremin and Metelitz, 2003).

It is important to note that the use of ultrasonic systems is efficient in reducing reaction time, promoting increased enzymatic activity in many cases. On the other hand, depending on the conditions studied, there may be an enzymatic denaturation and consequently a decrease in enzyme activity.

3.2.1.2 Ultrasonic bath

The greatest increase in enzymatic activity obtained for the ultrasonic bath occurred in the enzymatic extract from swine hair pretreated with ultrasonic probe (30.2%), with a temperature of 80 °C during 40 minutes of exposure and 0% power, corresponding to test 6.

Analysis of effects on keratinolytic activity showed that temperature and power were important. The temperature variable had significant positive effects; that is, the higher the temperature, the higher the keratinolytic activity. The power variable affected the enzyme activity negatively; the lower the power, the higher the activity. Time had no influence on enzymatic activity. Because $F_{cal} > F_{tab}$, the statistical model was validated.

For enzymatic extract produced from swine hair without pretreatment, only test 3, corresponding to a temperature of 30 °C during 10 minutes and 100% power, provided an

increase of keratinolytic activity in relation to the crude enzyme, which was 5.9%. However, when the results were subjected to effects analysis, no variable was significant. For this enzyme extract studied, the model was not statistically validated due to $F_{cal} < F_{tab}$.

In the enzymatic extracts evaluated, different behaviors of the enzyme regarding temperature were observed. For the pretreated residues, the enzyme extract increased the activity at a temperature of 80 °C and for the untreated residues, the only activity increase was at the temperature of 30 °C, the mildest within the study range. This shows that the enzymes produced during submerged fermentation with pretreated and untreated residues are different in the mode of action compared to the ultrasonic bath reaction system.

The behavior observed for ultrasonic bath may be related to the synergistic effect of ultrasonic waves with temperature. Several studies show increased activity of enzymes exposed to ultrasonic bath (Leaes et al., 2013; Mulinari et al., 2017). According to the literature, temperature considerably influences the increase or decrease of enzymatic activity. With a rise in temperature the activity may be increased, but depending on the structure of the enzyme, if there is a very significant rise in temperature, denaturation may occur (Resa et al., 2009). This behavior was described in the studies by Wang et al. (2011) and Ovsianko et al. (2005), where enzymatic denaturation occurred due to the effect of ultrasonic sonication causing an increase in temperature, also stimulating the effect of cavitation.

Ultrasonic bath alters the behavior of exposed enzymes. Thus, the use of ultrasonic systems can promote increases in enzymatic activity, possibly due to conformational changes in protein structure, in addition to considerably reducing the reaction time (Leaes et al., 2013) and also the decrease in activity by denaturing (Resa et al., 2009).

3.2.1.3 Microwave

For the enzymatic extract produced from swine hair pretreated using the ultrasonic probe, test 2 showed an increase of activity, 15.1% at 80 °C for 5 minutes. Performing statistical analysis, we noted that the temperature variable was significantly positive: the higher the temperature, the higher the keratinolytic activity achieved. Time had no influence on enzymatic activity. The model was statistically validated by $F_{cal} > F_{tab}$.

For the enzymatic extract obtained from swine hair without pretreatment, we found that no assay showed an increase of keratinolytic activity. However, performing the statistical analysis, we noted that the time variable was significantly negative; that is, the longer the microwave exposure time, the lower the keratinolytic activity achieved. The temperature had no influence on enzymatic activity.

The increase in activity obtained for enzymatic extract produced from swine hair pretreated with ultrasonic probe was because the microwaves provided an increase in enzymatic activity and an increase in reaction efficiency due to instantaneous overheating. Causing tremendous agitation of molecules that induces an increase in energy collisions, also increasing reaction and conversion rates (Ma et al., 2011; Mazinani, DeLong and Yan, 2015).

The mechanism of microwave operation occurs by the interaction of the electromagnetic field with matter. This causes a movement of ions, which in turn cause heat generation by two mechanisms, dipole rotation and ion conduction. In chemical reactions, microwaves cause molecular friction due to the polarization of molecules. This process is responsible for increasing the friction of these molecules, consequently increasing the temperature and the reaction rate (Lopes et al., 2015). In this manner, microwave irradiation can cause conformational changes in the exposed structure, leading to increased enzyme activity or even damage such as enzymatic denaturation (Leonelli and Mason, 2010; Lopes et al., 2015; Mazinani, DeLong and Yan, 2015).

Some authors point out that the use of microwaves can cause changes in thermodynamic properties, providing increased enzymatic activity (Mazinani, DeLong and Yan, 2015; Golunski et al., 2017). These findings suggest that conformational changes in the structure of enzymes occur when exposed to microwaves, possibly due to cleavages that occur during the process and the formation of hot spots by instant heating.

On the other hand, high temperatures and exposure times cause enzymatic denaturation. Possibly this occurred in the assays with enzymatic extract produced from untreated swine hair, where mild temperatures of 30 °C were sufficient to cause decreased enzyme activity.

Temperature is one of the factors that most influence the behavior of enzymes exposed to microwave irradiation. This causes collisions between molecules to increase, and this causes an increase in energy, causing faster reaction rates. However, at very high temperatures, the reaction rate is reduced due to the denaturation of enzymes, caused by heat breakage and also the breakdown of ionic and hydrogen bonds, stabilizing the protein structure (Yadav and Borkar, 2009; Khan and Rathod, 2018).

3.2.1.4 Larger increments of enzymatic activity

Given the results obtained for the three reaction systems evaluated, the ultrasonic probe showed greater potential for increased enzymatic activity compared to the other reaction systems (**Fig. 1**).

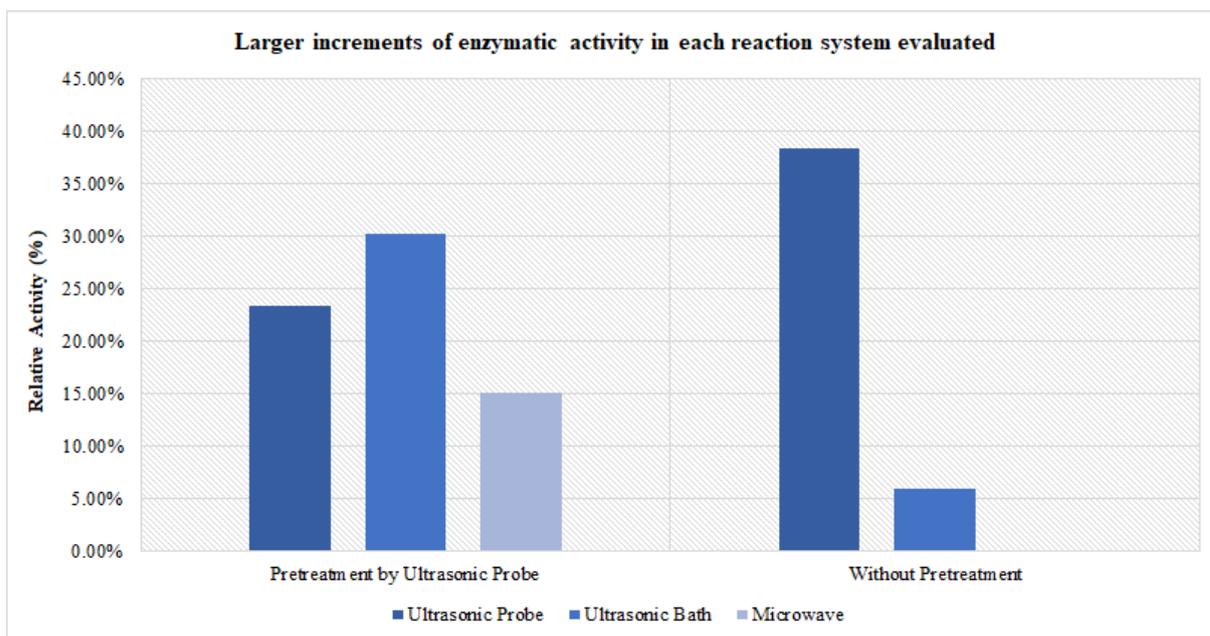


Fig. 1. Larger increments of enzymatic activity of enzymatic extracts obtained from swine hair pretreated using the ultrasonic probe and without pretreatment subjected to the reaction systems ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave.

The largest increase was obtained using the ultrasonic probe (38.4%) with the enzymatic extract produced from swine hair without pretreatment. Ultrasonic systems also showed good results of increased enzymatic activity for the enzymatic extract produced from swine hair pretreated by ultrasonic probe, with the increment values being 23.3% for ultrasonic probe and 30.2% for ultrasonic bath. In addition, these values were reached under mild conditions of time, power and pulse, making the process more viable.

3.2.2 Enzymatic concentration

The enzyme concentration technique was performed to verify the possibility of increasing enzymatic activity from an economically viable and simple operation method. Enzyme extracts produced from swine hair without pretreatment were used and the enzyme concentration technique was performed in the presence of NaCl and acetone.

The homemade extract showed an enzymatic activity of 159.3 U mL^{-1} after the concentration technique, increasing the activity value by 53.5% when compared to the crude enzyme extract (103.8 U mL^{-1}). The concentrated enzymatic extract (homemade) was exposed to reaction systems under the conditions of greatest activity increase in experimental designs, where it presented stability against the ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave, possibly due to the absence of interferents that were separated during enzymatic concentration.

After exposure, the concentrated enzymatic extract (homemade) was applied in the degradation of swine hair and chicken feathers, aiming to evaluate the degradation potential of keratinous residues.

3.3 Commercial enzymes and reaction systems

The commercial enzyme K4519 SIGMA was exposed to ultrasonic probe, ultrasonic bath and microwave under the conditions of higher relative activity of homemade enzyme, in order to compare with the obtained data.

The enzyme K4519 SIGMA keratinase had initial activity of 2812.5 U mL⁻¹. When subjected to an ultrasonic probe and bath, it showed an 11.1% increase in enzymatic activity. In microwave irradiation, there was a reduction in activity. There was high stability because it is a highly pure enzyme, with little variation when subjected to reaction systems. The activity increase observed for the enzyme K4519 SIGMA keratinase was smaller than that obtained for the homemade enzyme when subjected to ultrasonic probe (38.4%). This behavior is expected because it is a pure enzyme with high stability.

It should be noted that the production of the homemade enzyme is low-cost because it uses a highly available residue, being an inhomogeneous residue with large variations, in addition to the fact of disposal problems secondary to difficult degradation. The produced enzyme gave good values of enzymatic activity and activity increases when subjected to reaction systems, becoming competitive against commercial enzymes.

3.4 Evaluation of keratin residue degradation

Crude and concentrated enzymatic extracts (homemade) without and with exposure to reaction systems were evaluated for degradation potential of keratinous residues. We also compared enzymatic extract with commercial enzyme K4519 SIGMA. Enzyme extracts were incubated at 28 °C for 28 days and the result was presented based on visible residue degradation and enzymatic activity.

We found that, for the crude enzyme extract and after exposure to reaction systems, the values for keratinolytic activity of the assays containing swine hair and chicken feathers showed small decreases in relation to the initial value for enzymatic activity over the 28 days, however, remaining stable over time, suggesting that the enzyme was active and showing very promising enzyme activity. For the enzyme extract in concentrated form and after exposure to reaction

systems, significant increases in keratinolytic activity were observed over the 28 days of study (Table 3).

Table 3

Measure of keratinolytic activity at initial time and after 28 days for homemade enzymatic extract crude and concentrated and enzymatic extracts after exposure to ultrasonic reaction systems and microwave irradiation containing swine hair and chicken feathers.

	Enzyme Extracts (homemade)	Swine hair		Chicken feathers	
		0° day	28° day	0° day	28° day
		Enzymatic Activity (U mL ⁻¹)		Enzymatic Activity (U mL ⁻¹)	
CRUDE	Assays				
	Ultrasonic Probe	172.0	137.0	172.0	133.0
	Ultrasonic Bath	153.0	124.0	153.0	115.5
	Microwave	96.0	106.5	96.0	141.0
	Crude Extract	171.0	151.5	171.0	121.5
	Enzyme Extracts (homemade)	Swine hair		Chicken feathers	
		0° day	28° day	0° day	28° day
		Enzymatic Activity (U mL ⁻¹)		Enzymatic Activity (U mL ⁻¹)	
CONCENTRATED	Assays				
	Ultrasonic Probe	159.5	231.0	159.5	192.5
	Ultrasonic Bath	141.8	202.0	141.8	181.5
	Microwave	149.0	229.5	149.0	191.5
	Crude Extract	103.8	-	103.8	-
Concentrated Extract	159.3	-	159.3	-	

Almost total degradation of chicken feathers was observed in the crude enzyme extract and enzyme extracts after exposure to reaction systems (Fig. 2), while for swine hair, there was no degradation in any of the enzyme extracts evaluated. Possibly the enzyme could not access the resistant structure of swine hair. One factor that may explain the ease with which chicken feathers were degraded is the less rigid structure compared to swine hair. Because they are part of the keratin family, swine hair exhibits a structure that is extremely resistant to physical, chemical and also enzymatic actions (Choińska-Pulit, Łaba and Rodziewicz, 2019).

The degradation potential of chicken feathers containing the commercial enzyme extract K4519 SIGMA was also evaluated. We found that, during the 28 days of incubation, the

commercial enzyme was not able to degrade the chicken feathers, thereby favoring the homemade enzyme extract (**Fig. 2**).

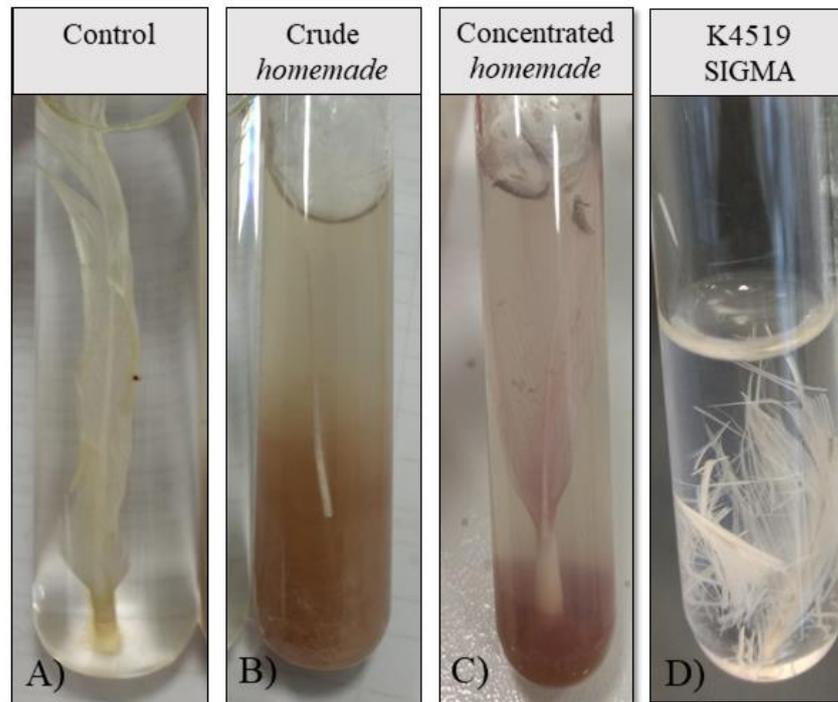


Fig. 2. Total degradation of chicken feathers observed in crude enzymatic extracts and after exposure to reaction systems. A) Control; B) Crude; C) Concentrated; D) K4519 SIGMA commercial enzyme.

The results obtained for the degradation test containing the homemade extracts in crude form and after exposure to the reaction systems are promising as evidenced by the degradation potential on keratinous residues. The commercial enzyme K4519 SIGMA is expensive, highly concentrated and stable; nevertheless, it did not degrade the chicken feathers used in the tests.

Swine hair and chicken feathers are part of the group of hard keratins owing to their high concentrations of cysteine, rendering them very resistant (Kornilłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011). However, α -keratin present in the swine hair structure has large amounts of sulfur, which confers highly resistant mechanical properties (Holkar et al., 2018). This explains why chicken feathers are more easily degraded than swine hair.

In addition, the keratin structure formed by disulfide bonds ensures stability and resistance to enzymatic degradation. Kunert (1989) found that the reduction of disulfide bonds considerably influenced the degradation of keratin structure, ensuring efficient keratin hydrolysis. This suggests that the homemade enzyme extract acted on disulfide bonds and reduced the cystine concentration present in the keratin structure, as well as converting the sulfur molecule into smaller structures (Jaouadi et al., 2013).

However, the exact process of degradation involves a series of mechanisms of action that occur in 3 stages. Mechanical keratinolysis occurs by the action of mycelium-producing

fungi, involving the penetration of the mycelium into the keratin residue. Then, the hydrolysis of the disulfide bonds occurs, responsible for ensure the resistance and stability of the keratin structure. Finally, proteolysis occurs involving the action of the enzyme itself (Kunert, 1989; Onifade et al., 1998).

For the concentrated enzymatic extract, no residue degradation was observed in any of the evaluated extracts. In the tests where there were high values of keratinolytic activity, the degradation percentages were low or almost nonexistent. This agrees with the study by Riffel and Brandelli, (2006), where high values for keratinolytic activity were verified; nevertheless, the purified enzyme was not able to degrade chicken feathers. The authors suggest that in these cases, enzymes such as disulfide reductases and proteases need to act so that feather degradation occurs (Fang et al., 2013b).

The presence of inhibitors may explain why there was no residue degradation (Hamiche et al., 2019). Despite the fact that the enzyme is concentrated and the amount of impurities is reduced, it has no potential for degradation of residues (Riffel and Brandelli, 2006).

3.5 Characterization of homemade keratinase enzymes

The characterization of homemade keratinases was carried out by evaluating different pH and temperature conditions in an ultrathermostatic bath for 1 h. The highest enzyme activity was achieved at pH 8.5 (50 mM Tris HCl buffer) and 50 °C temperature.

Most of keratinases producing microorganisms operate in the neutral and alkaline pH range, and the degradation of keratin is favored in alkaline pH, with the modification of cysteine residues and making them more accessible for the action of the enzyme. The optimum temperature is in the range of 28 °C to 50 °C, reaching 70 °C depending on the microorganism. In addition, most keratinases have good stability over wide pH and temperature ranges (Anbu et al., 2005).

4. Conclusion

Biotechnological processes involving the biodegradation of keratinolytic materials by action of microorganisms and enzymes are promising alternatives to improve the degradability of these materials, thereby adding value to the material. Ultrasonic and microwave reaction systems are viable alternatives for evaluating the behavior of keratinases and the potential for pretreatment of keratinous residues.

The pretreatment in an ultrasonic probe using the macropoint causes greater energy dissipation due to the larger diameter in relation to the micropoint, thus increasing the reaction

rates and facilitating the degradation process of the exposed structures due to the propagation of ultrasonic waves, resulting in greater weight loss. Thus, the use of the ultrasonic probe as a pretreatment can be quite useful when looking for greater enzyme production in a shorter time. For longer processes, the use of waste without pretreatment becomes more promising, also decreasing energy expenditure, since the enzymatic activity achieved over time is greater.

Regarding the evaluation of the behavior of keratinases in relation to reaction systems, different behaviors were observed from enzymatic extracts, showing that it is possible to produce enzymes with different characteristics and behaviors. The ultrasonic probe proved to be more promising, generating the greatest increase in enzymatic activity. The enzymatic concentration showed a significant increase in activity, showing that simple and low-cost techniques can be efficient.

It was found that the crude enzymatic extract has the potential to degrade chicken feathers, while the other extracts used did not show potential for degradation, thus making it a very interesting result.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS, to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq; and to the research group at Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos - LAMIBI da UFFS campus Erechim.

References

- Abdel-Fattah, A. M., El-Gamal, M. S., Ismail, S. A., Emran, M. A., Hashem, A. M. 2018. Biodegradation of feather waste by keratinase produced from newly isolated *Bacillus licheniformis* ALW1. J. Genet. Eng. Biotechnol. 16, 311-318. Doi: 10.1016/j.jgeb.2018.05.005
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Hilda, A., Lakshmi priya, T., Annadurai, G. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. Enzyme Microb. Technol. 36, 639-647. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.07.019
- ANTON PAAR. Reator de Micro-ondas Monowave 100 ANTON PAAR. <https://www.anton-paar.com/br-pt/produtos/detalhes/sintese-assistida-por-micro-ondas-monowave-400200/> (accessed 25 May 2018).
- Azmi, N. A., Idris, A., Yusof, N. S. M. 2018. Ultrasonic technology for value added products from feather keratin. Ultrason. Sonochem. 47, 99-107. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2018.04.016

- Barone, J. R., Schmidt, W. F., Gregoire, N. T. 2006. Extrusion of Feather Keratin. *J. Appl. Polym. Sci.* 100, 1432-1442. Doi: 10.1002/app.23501
- Barton, S., Bullock, C., Weir, D. 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 190-194. Doi: 10.1016/0141-0229(95)00092-5
- Brandelli, A. 2008. Bacterial Keratinases: Useful Enzymes for Bioprocessing Agroindustrial Wastes and Beyond. *Food Bioproc. Tech.* 1, 105-116. Doi: 10.1007/s11947-007-0025-y
- Brandelli, A., Daroit, D. J., Riffel, A. 2010. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 1735-1750. Doi: 10.1007/s00253-009-2398-5
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S.J. 2015. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Res. Int.* 73, 3-12. Doi: 10.1016/j.foodres.2015.01.015
- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M., Verneuil, B. 1999. Purification and Characterization of a Keratinolytic Serine Proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2570-2578. Doi: 10.1128/AEM.65.6.2570-2576.1999
- Călin, M., Constantinescu-Aruxandei, D., Alexandrescu, E., Răut, I., Doni, M. B., Arsene, M. L., Oancea, F., Jecu, L., Lazăr, V. 2017. Degradation of keratin substrates by keratinolytic fungi. *Electron. J. Biotechn.* 28, 101-112. Doi: 10.1016/j.ejbt.2017.05.007
- Choińska-Pulit, A., Łaba, W., Rodziewicz, A. 2019. Enhancement of pig bristles waste bioconversion by inoculum of keratinolytic bacteria during composting. *Waste Manage.* 84, 269-276. Doi: 10.1016/j.wasman.2018.11.052
- ECO-SONICS. Desruptor de células. <https://www.ecosonics.com.br/produto/20/desruptor-de-celulas> (accessed 02 June 2018).
- Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G., Chen, J. 2013a. Biodegradation of wool waste and keratinase production in scale-up fermenter with different strategies by *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1. *Bioresour. Technol.* 140, 286-291. Doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.091
- Fang, Z., Zhang, J., Liu, C., Du, G., Chen, J. 2013b. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82, 166-172. Doi: 10.1016/j.ibiod.2013.03.008
- Gegeckas, A., Šimkutė, A., Gudiukaitė, R., Čitavičius, D. J. 2018. Characterization and application of keratinolytic paptidases from *Bacillus* spp. *Int. J. Biol. Macromol.* 113, 1206-1213. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.046
- Golunski, S.M., Scapini, T., Modkovski, T.A., Marques, C.T., Camargo, A.F., Preczeski, K.P., Dalla Rosa, C., Baldissarelli, D.P., Mulinari, J., Venturin, B., Vargas, G.D.L.P., Buffon, J.G., Mossi, A.J., Treichel, H. 2017. Commercial and Noncommercial Peroxidases Activity under Ultrasound and Microwave Treatment: a Pretreatment to Improve Wastewater Treatment. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 1890-1895. Doi: 10.21577/0103-5053.20170023

Grintsevich, E.E., Adzerikho, I.E., Mrochek, A.G., Metelitz, D.I. 2001, Polydisulfides of Substituted Phenols as Effective Protectors of Peroxidase against Inactivation by Ultrasonic Cavitation. *Biochemistry* 66, 740-746. Doi: 10.1023/a:1010256511200

Gupta, R., Ramnani, P. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 21-33. Doi: 10.1007/s00253-005-0239-8

Hamiche, S., Mechri, S., Khelouia, L., Annane, R., El Hattab, M., Badis, A., Jaouadi, B. 2019. Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 758-769. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.174

Holkar, C.R., Jain, S.S., Jadhav, A.J., Pinjari, D.V. 2018. Valorization of keratin waste. *Process Saf. Environ.* 115, 85-98. Doi: 10.1016/j.psep.2017.08.045

Ire, F. S., Onyenama, A. C. 2017. Effects of Some Cultural Conditions on Keratinase Production by *Bacillus licheniformis* Strain NBRC 14206. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 13, 1-13. Doi: 10.9734/JABB/2017/32726

Jaouadi, N.Z., Rekik, H., Badis, A., Trabelsi, S., Belhoul, M., Yahiaoui, A.B., Aicha, H.B., Toumi, A., Bejar, S., Jaouadi, B. 2013. Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. *PLoS One* 8, 1-17. Doi: 10.1371/journal.pone.0076722

Jin, J., Ma, H., Qu, W., Wang, K., Zhou, C., He, R., Luo, L., Owusu, J. 2015. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: Kinetics and thermodynamics study. *Ultrason. Sonochem.* 27, 46-53. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2015.04.031

Kapturowska, A.U., Stolarzewicz, I.A., Krzyczkowska, J. 2012. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. *Ultrason. Sonochem.* 19, 186-191. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2011.06.015

Kaul, S., Sumbali, G. 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi. *Mycopathologia* 139, 137-140. Doi: 10.1023/a:1006896030739

Khan, N.R., Rathod, V.K. 2018. Microwave assisted enzymatic synthesis of speciality esters: A mini - review. *Process Biochem.* 75, 89-98. Doi: 10.1016/j.procbio.2018.08.019

Korniłowicz-Kowalska, T., Bohacz, J. 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Manage.* 31, 1689-1701. Doi: 10.1016/j.wasman.2011.03.024

Kunert, K. 1989. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *J. Basic Microbiol.* 29, 597-604. Doi: 10.1002/jobm.3620290909

Kushwaha, R. K. S. 1983. The In Vitro Degradation of Peacock Feathers by Some Fungi. *Mykosen* 26, 324-326. Doi: 10.1111/j.1439-0507.1983.tb03218.x

Łaba, W., Kopeć, W., Chorążyk, D., Kancelista, A. 2015. Biodegradation of pretreated pig bristles by *Bacillus cereus* B5esz. Int. Biodeterior. Biodegrad. 100, 116-123. Doi: 10.1016/j.ibiod.2015.02.024

Leaes, E.X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A.P., Dal Prá, V., Bassaco, M.M., Terra, L.M., Mazutti, M.A. 2013. Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. Biocatal. Agric. Biotechnol. 2, 21-25. Doi: 10.1016/j.bcab.2012.08.003

Leonelli, C., Mason, T.J. 2010. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. Chem. Eng. Process. 49, 885-900. Doi: 10.1016/j.cep.2010.05.006

Lippert, T., Bandelin, J., Musch, A., Drewes, J.E., Koch, K. 2018. Energy-positive sewage sludge pre-treatment with a novel ultrasonic flatbed reactor at low energy input. Bioresour. Technol. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.073.

Lopes, L.C., Barreto, M.T.M., Gonçalves, K.M., Alvarez, H.M., Heredia, M.F., Souza, R.O.M.A., Cordeiro, Y., Dariva, C., Fricks, A.T. 2015. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment. Enzyme Microb. Technol. 69, 10-18. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.11.002

Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., Zhu, W. 2011. Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. Ultrason. Sonochem. 18, 419-424. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.07.014

Manasseh, R., Tho, P., Ooi, A., Petrovic-Duran, K., Zhu, Y. 2010. Cavitation microstreaming and material transport around microbubbles. Phys. Procedia 3, 427-432. Doi: 10.1016/j.phpro.2010.01.056

Mason, T.J., Cobley, A.J., Graves, J.E., Morgan, D. 2011. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. Ultrason. Sonochem. 18, 226-230. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.05.008

Mazinani, S. A., DeLong, B., Yan, H. 2015. Microwave radiation accelerates trypsin-catalyzed peptide hydrolysis at constant bulk temperature. Tetrahedron Lett. 56, 5804-5807. Doi: 10.1016/j.tetlet.2015.09.003

Mazotto, A. M., Melo, A. C. N., Macrae, A., Rosado, A. S., Peixoto, R., Cedrola, S. M. L., Couri, S., Zingali, R. B., Villa, A. L. V., Rabinovitch, L., Chaves, J. Q., Vermelho, A. B. 2011. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. World J. Microbiol. Biotechnol. 27, 1355-1365. Doi: 10.1007/s11274-010-0586-1

Mazotto, A. M., Couri, S., Damaso, M. C. T., Vermelho, A. B. 2013. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. Int. Biodeterior. Biodegrad. 85, 189-195. Doi: 10.1016/j.ibiod.2013.07.003

McClements, D.J. 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. Trends Food Sci. Tech. 6, 293-299. Doi: 10.1016/S0924-2244(00)89139-6

- Mulinari, J., Venturin, B., Sbardelotto, M., Dall Agnol, A., Scapini, T., Camargo, A. F., Baldissarelli, D. P., Modkovski, T. A., Rossetto, V., Dalla Rosa, C., Reichert Jr. F. W., Golunski, S. M., Vargas, G. D. L. P., Dalla Rosa, C., Mossi, A. J., Treichel, H. 2017. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by *homemade* lipases. *Ultrason. Sonochem.* 35, 313-318. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.10.007
- Okoroma, E. A., Garelick, H., Abiola, O. O., Purchase, D. 2012. Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 74, 54-60. Doi: 10.1016/j.ibiod.2012.07.013
- Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., Al-Zarban, S. 1998. A Review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour. Technol.* 66, 1-11. Doi: 10.1016/S0960-8524(98)00033-9
- Ovsianko, S.L., Chernyavsky, E.A., Minchenya, V.T., Adzerikho, I.E., Shkumatov, V.M. 2005. Effect of ultrasound on activation of serine proteases precursors. *Ultrason. Sonochem.* 12, 219-223. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2003.10.012
- Paul, T., Das, A., Mandal, A., Halder, S. K., Jana, A., Maity, C., DasMohapatra, P. K., Pati, B. R., Mondal, K. C. 2014a. An efficient cloth cleaning property of a crude keratinase combined with detergent: Towards industrial viewpoint. *J. Clean. Prod.* 66, 672-684. Doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.054
- Potapovich, M.V., Eremin, A.N., Metelitz, D.I. 2003. Kinetics of Catalase Inactivation Induced by Ultrasonic Cavitation. *Appl. Biochem. Micro.* 39, 140-146. Doi: 10.1023/A:1022577611056
- Preczeski, K. P., Kamanski, A. B., Scapini, T., Camargo, A. F., Modkoski, T. A., Rossetto, V., Venturin, B., Mulinari, J., Golunski, S. M., Mossi, A. J., Treichel, H. 2018. Efficient and low-cost alternative of lipase concentrating aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41, 851-857. Doi: 10.1007/s00449-018-1919-y
- 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. 2020. *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. as keratinase producers using swine hair from agroindustrial residues. *Fronti. Bioeng. Biotech.* Doi: 10.3389/fbioe.2020.00071
- Resa, P., Elvira, L., Sierra, C., Espinosa, F.M. 2009. Ultrasonic velocity assay of extracellular invertase in living yeasts. *Anal. Biochem.* 384, 68-73. Doi: 10.1016/j.ab.2008.09.025
- Riffel, A., Brandelli, A. 2006. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Braz. J. Microbiol.* 37, 395-399. Doi: 10.1590/S1517-83822006000300036
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F. 2014. Protimiza Experimental Design. <http://experimental-design.protimiza.com.br/> (accessed 10 January 2019).
- Santos, R. M. D. B., Firmino, A. A. P., Sá, C. M., Felix, C. R. 1996. Keratinolytic Activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr. Microbiol.* 33, 364-370. Doi: 10.1007/s002849900129

Scott, J. A., Untereiner, W. A. 2004. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Med. Mycol. J.* 42, 239-246. Doi: 10.1080/13693780310001644680

SIGMA-ALDRICH. K4519 SIGMA Keratinase.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k4519?lang=pt®ion=BR> (accessed 28 May 2018).

Su, C., Gong, J., Zhang, R., Tao, L., Dou, W., Zhang, D., Li, H., Lu, Z., Xu, Z., Shi, J. 2017. A novel alkaline surfactant-stable keratinase with superior feather-degrading potential based on library screening strategy. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 404-411. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.045

Thankaswamy, S. R., Sundaramoorthy, S., Palanivel, S., Ramudu, K. N. 2018. Improved microbial degradation of animal hair waste from leather industry using *Brevibacterium luteolum* (MTCC 5982). *J. Clean. Prod.* 189, 701-708. Doi: 10.1016/j.jclepro.2018.04.095

Wang, L. C. 1981. Soybean Protein Agglomeration: Promotion by Ultrasonic Treatment. *J. Agr. Food Chem.* 29, 177-180. Doi: 10.1021/jf00103a044

Wang, J., Yanping, C., Sun, B., Wang, C., Mo, Y. 2011. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic. *Ultrason. Sonochem.* 18, 534-540. Doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.09.008

Wang, F., Chen, Z., Zhu, H. 2013. An efficient enzymatic modification of lily polysaccharide in ionic liquid under ultrasonic irradiation. *Biochem. Eng. J.* 79, 25-28. Doi: 10.1016/j.bej.2013.06.020

Yadav, G.D., Borkar, I.V. 2009. Kinetic and Mechanistic Investigation of Microwave-Assisted Lipase Catalyzed Synthesis of Citronellyl Acetate. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 7915-7922. Doi: 10.1021/ie800591c

Yang, C., Fang, T.J. 2015. Kinetics for enzymatic hydrolysis of rice hulls by the ultrasonic pretreatment with a bio-based basic ionic liquid. *Biochem. Eng. J.* 100, 23-29. Doi: 10.1016/j.bej.2015.04.012

Yusof, N. S. M., Ashokkumar, M. 2015. Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles by Using High Intensity Focused Ultrasound. *ChemPhysChem.* 16, 775-781. Doi: 10.1002/cphc.201402697

Yusuf, I., Ahmad, S. A., Phang, L. Y., Syed, M. A., Shamaan, N. A., Khalil, K. A., Dahalan, F. A., Shukor, M. Y. 2016. Keratinase production and biodegradation of polluted secondary chicken feather wastes by a newly isolated multi heavy metal tolerant bacterium-*Alcaligenes* sp. AQ05-001. *J. Environ. Manage.* 183, 182-195. Doi: 10.1016/j.jenvman.2016.08.059

Zou, S., Wang, X., Chen, Y., Wan, H., Feng, Y. 2016. Enhancement of biogas production in anaerobic co-digestion by ultrasonic pretreatment. *Energ. Convers. Manage.* 112, 226-235. Doi: 10.1016/j.enconman.2015.12.087