



IX OKTOBERFÓRUM – PPGEQ

19, 20 E 21 DE OUTUBRO DE 2010

BIOTECNOLOGIA PARA A PRODUÇÃO MAIS LIMPA DE COUROS

Aline Dettmer¹, Mariliz Gutterres¹, Marco A. Z. Ayub²

¹ Lacouro – Laboratório de estudos em Couro e Meio Ambiente

² BiotecLab – Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {alinedet, mariliz}@enq.ufrgs.br

Resumo: A indústria coureira tem grande impacto ambiental, pois utiliza grandes quantidades de água e produtos tóxicos, e gera grande volume de efluente e resíduos sólidos. A utilização de enzimas na produção de couros é uma alternativa para a redução do impacto ambiental desta atividade, porém, as características das enzimas comerciais existentes não são conhecidas em detalhes. Além disso, sua atividade é determinada utilizando caseína como substrato, sendo que as peles bovinas não possuem esta proteína. Desta forma, é importante que características tais como atividade sobre colágeno e queratina sejam conhecidas. A temperatura ótima de ação das enzimas ficou em torno de 55°C, em valores de pH que variaram de 9 a 12. Com base nestes dados, foram isoladas 10 bactérias produtoras de enzimas com possível aplicação na produção mais limpa de couros. Dentre estas 10, o meio de cultivo, pH e temperatura foram otimizados através do planejamento experimental. Os fatores que apresentaram efeito significativo para o meio de cultivo foram extrato de levedura, peptona, extrato de levedura, o pH não teve efeito significativo, enquanto que a temperatura apresentou efeito significativo. O conhecimento das cinéticas reacionais e das propriedades enzimáticas possibilitará a melhor aplicação destas enzimas nas etapas do processo de transformação da pele em couro.

Palavras-chave: biotecnologia, enzimas, caracterização enzimática, isolamento de bactérias, planejamento de experimentos

1. Introdução

A indústria que transforma a pele em couro tem grande impacto ambiental, uma vez que, atualmente, utiliza grandes quantidades de água e produtos tóxicos, como cromo e sulfeto. Os processos de ribeira e curtimento produzem de 80 a 90% da poluição gerada pelos curtumes, destacando-se a geração de gases nocivos como sulfeto de hidrogênio, lodos contendo cal, enxofre e cromo, além da imensa quantidade de água utilizada.

Apesar do impacto ambiental, a indústria do couro tem papel importante na economia nacional. O Brasil produziu, em 2009, 43,60 milhões de peles e apresenta o maior rebanho comercializável do mundo. Dados do Ministério do Trabalho indicam que o setor coureiro brasileiro dispunha em 2008 de 809 estabelecimentos e 38 mil trabalhadores. O Rio Grande do Sul, por sua vez, contribui com o maior número de estabelecimentos de curtimento (GUIA DO COURO, 2010).

Entre as alternativas para redução da carga poluidora dos efluentes de curtume e diminuição do impacto ambiental está o uso da biotecnologia, através do emprego de enzimas, por exemplo. Entre as principais vantagens da utilização de enzimas estão a diminuição do tempo de algumas etapas do processo produtivo e a criação de sítios ativos que podem vir a melhorar o aproveitamento de

alguns produtos químicos, como corantes e curtentes (KANTH *et al.* 2008 e 2009).

Na primeira etapa deste trabalho, realizou-se a caracterização de enzimas comerciais aplicadas à produção de couros. Os dados obtidos serviram como referência para seleção e isolamento de microrganismos produtores de novas enzimas com possível aplicação no processamento de peles, especialmente, nas etapas de caleiro e depilação. O cultivo de um destes microrganismos selecionados foi otimizado através do uso de ferramentas estatísticas e será apresentado neste trabalho.

2. Materiais e Métodos

PARTE I

2.1 Materiais

Cinco proteases comerciais foram usadas neste trabalho, e foram identificadas como “A, B, C, D e E”. As enzimas A (Buzyme 7703, Buckman Laboratórios), B e C (Tanzyme RD 04 e CD 05, foram ambas fornecidas pela Tanquímica) são preparados não especificados de enzimas proteolíticas microbianas, recomendadas para o remolho e o caleiro pelos seus fornecedores. A enzima D (Tanzyme P 10, da empresa Tanquímica), é uma tripsina microbiana, enquanto a enzima E (Buzyme 7706, da Buckman

Laboratórios) é um preparado de enzimas proteolíticas. Ambas são aplicadas durante a etapa de purga da pele.

Para a caracterização das enzimas foram utilizados os substratos comerciais azocaseína, *azocoll* e *keratin azure*, todos fornecidos pela empresa Sigma. Demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

2.2 Atividade Proteolítica

As cinco enzimas comerciais foram testadas utilizando três substratos diferentes. As soluções enzimáticas foram preparadas imediatamente antes do uso, na concentração de 5 mg de enzima/ml água destilada. A atividade proteolítica foi determinada baseada na metodologia utilizada por GIONGO (2006) e utilizou azocaseína como substrato. Foram misturados 100 µl do substrato (azocaseína 10 mg/ml) com 100 µl do tampão e adicionou-se 100 µl da solução enzimática. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C, a reação foi interrompida adicionando-se 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Após a centrifugação, a 10.000x g por 5 minutos, adicionou-se aos 800 µl do sobrenadante 200 µl de NaOH 1,8N. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 a 420 nm nas condições de tempo e temperatura do teste. O “branco” foi preparado adicionando-se as mesmas quantidades de tampão, TCA e solução enzimática ao substrato, porém o TCA foi adicionado antes da solução enzimática.

2.3 Atividade Queratinolítica e Colagenolítica

A atividade enzimática sobre queratina e colágeno foi determinada utilizando os substratos *keratin azure* e *azocoll*, respectivamente. A metodologia foi adaptada de ADIGÜZEL *et al.* (2009) e IONATA *et al.* (2008). Foram pesados 4 mg de *keratin azure* em cada eppendorf e adicionados 500 µl de tampão e 500 µl da solução enzimática. A mistura foi incubada por 30 minutos a 55°C, sob agitação. Após incubação, foi centrifugada a 10.000x g por 5 minutos. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,01 a 595 nm nas condições de tempo e temperatura do teste. O “branco” foi realizado adicionando-se as mesmas quantidades de solução enzimática e tampão sem substrato.

Para a determinação da atividade sobre o colágeno foi utilizado o mesmo método, porém usando *azocoll* como substrato.

2.4 Influência do pH e da Temperatura sobre a Atividade Enzimática

O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática foram determinados. Foi determinada também, a estabilidade térmica das enzimas. Os valores de pH variaram entre 6-13, os tampões utilizados foram: fosfato de sódio 0,1M (pH 6 – 8), carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M (9 – 13). A faixa de temperatura testada variou de 28 a 75°C. Para determinar a estabilidade térmica, a atividade foi determinada após 15, 30, 60 e 120 min de incubação, nas temperaturas de 37, 45 e 55°C.

2.5 Efeito de Inibidores e alguns Produtos utilizados na Produção de Couros sobre a Atividade Enzimática

Foram determinados os efeitos de inibidores (EDTA) e outros produtos comumente utilizados durante o processamento de couros (tensoativos, alcoóis graxos, sais e sulfetos) sobre a atividade da enzima. Os inibidores/produtos foram incubados com a enzima durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a determinação da atividade enzimática.

PARTE II

2.6 Isolamento de bactérias produtoras de enzimas proteolíticas

A seleção de novos microrganismos, capazes de produzir enzimas com possível aplicação na produção de couros, foi feita a partir de lodo da estação de tratamento de efluentes de um curtume. Um ml de lodo foi resuspenso em 9 ml de solução salina estéril, a qual sofreu diluição seriada e foi plaqueada em placas contendo agar LB e 1% de leite desnatado (PILLAI e ARCHANA, 2008). As placas foram incubadas por 48h a 37°C. Microrganismos com atividade proteolítica formaram halos translúcidos ao redor da colônia e foram selecionados para estudos mais detalhados.

Para estimar a quantidade de protease extracelular produzida por cada bactéria, culturas puras das colônias selecionadas foram cultivadas em meio (M) contendo: 0,7% K₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,01% MgSO₄, 0,5% extrato de levedura, 1% farelo de soja (PILLAI e ARCHANA, 2008), 37°C, pH 7 e agitação de 80 rpm em um shaker. A atividade de cada microrganismo sobre azocaseína, *keratin azure* e *azocoll* foi determinada.

2.7 Identificação das bactérias isoladas

Dez microrganismos selecionados foram identificados com base no sequenciamento 16S rRNA. O sequenciamento foi realizado no equipamento ABI-PRISM 3100 utilizando o reagente Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing RR-100 (Applied Biosystems).

2.8 Preparação do inóculo

Para a produção das enzimas, colônias de bactérias foram inoculadas em erlenmeyers de 250ml, contendo 100 ml de meio (M) e incubados a 37°C em um shaker com 80 rpm de agitação. Após atingir densidade óptica (D.O.) a 600 nm igual a 1, a cultura foi utilizada para inocular os frascos utilizados para a produção da enzima [10% (v/v)].

2.9 Determinação da atividade proteolítica, queratinolítica, colagenolítica

A determinação da atividade proteolítica, queratinolítica e colagenolítica foi realizada conforme descrito anteriormente, na parte I.

2.10 Identificação dos fatores significativos através do planejamento Plackett-Burman

Após seleção dos microrganismos com as melhores atividades enzimáticas, foi realizada a otimização das condições de cultura. Para a seleção das variáveis significativas para a produção de proteases, uma variedade de fontes de carbono (glicose, maltose, glicerol), fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, farelo de soja),

sais inorgânicos (sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, sulfato de ferro heptahidratado) foram testados e identificados através do planejamento experimental Plackett-Burmann (RODRIGUES e IEMMA, 2005). No total nove fatores foram testados, as variáveis e os seus níveis estão apresentados na Tabela 1, três pontos centrais e seis variáveis inertes foram adicionados. O projeto experimental e os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 1 – Matriz de planejamento experimental Plackett-Burmann

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Glicose (X ₁)	2,00	6,00	10,00
Maltose (X ₂)	4,00	6,00	8,00
Peptona (X ₃)	2,50	5,00	7,50
Farelo de soja (X ₄)	10,00	20,00	30,00
Sulfato de magnésio (X ₅)	0,10	0,55	1,00
Cloreto de cálcio (X ₆)	0,10	0,55	1,00
Extrato de levedura (X ₇)	2,00	6,00	10,00
Glicerol (X ₈)	2,00	6,00	10,00
Sulfato de ferro heptahidratado (X ₉)	0,10	0,55	1,00

2.11 Otimização do meio de cultivo através da metodologia de superfície de resposta

O próximo estágio na formulação do meio de cultura foi determinar o nível ótimo das variáveis significativas para a produção de proteases. Para tanto, o planejamento composto central rotacional (CCR) foi utilizado. As variáveis significativas utilizadas foram: peptona, farelo de

soja, extrato de levedura, cada um das quais foi avaliada em cinco níveis codificados como mostra a tabela 2. O planejamento experimental e as respostas obtidas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 2 – Matriz do planejamento CCR com os níveis codificados e reais das variáveis

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Peptona (X ₃)	1,00	1,50	2,25	3,00	3,51
Farelo de soja (X ₄)	3,96	6,00	9,00	12,00	14,04
Extrato de levedura (X ₇)	1,32	2,00	3,00	4,00	4,68

O modelo quadrático para as variáveis é o seguinte:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2$$

Onde Y é a variável de resposta, b₀ a constante, b_i o coeficiente do efeito linear, b_{ii} o coeficiente do efeito quadrático, b_{ij} o coeficiente do efeito de interação. O modelo quadrático acima foi usado para plotar superfícies de resposta para as variáveis acima.

2.12 Efeito do pH e da temperatura sobre a produção de proteases

Após otimização do caldo de fermentação, o efeito do pH do meio de cultura e a temperatura de cultivo foram avaliados e otimizados. As variáveis e seus níveis estão apresentados na tabela 5, três pontos centrais foram adicionados. O projeto experimental e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 3 – Matriz de planejamento experimental Plackett-Burmann com as respostas experimentais correspondentes

Exp	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	Y (Atividade enzimática)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	105,07
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	145,30
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	76,53
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	122,60
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	57,73
6	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	70,90
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	67,30
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	55,50
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	40,70
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	38,60
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	72,35
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	88,47
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	1	-1	183,30
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	77,97
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	35,33
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	184,10
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46,80
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40,43
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37,15

*D1 a D6 são as variáveis inertes

Tabela 4 – Matriz do planejamento CCR com os valores para a atividade enzimática experimental e a predita pelo modelo

Exp	X ₃	X ₄	X ₇	Y (Atividade enzimática, U/ml)	Atividade enzimática predita (U/ml)
1	-1	-1	-1	19,37	41,91
2	-1	-1	1	12,60	22,68
3	-1	1	-1	139,25	143,98
4	-1	1	1	129,33	116,29
5	1	-1	-1	14,50	39,27
6	1	-1	1	20,30	27,30
7	1	1	-1	125,40	127,05
8	1	1	1	117,43	106,62
9	-1,68	0	0	126,07	117,14
10	1,68	0	0	114,77	106,93
11	0	-1,68	0	15,13	-17,54
12	0	1,68	0	118,77	134,83
13	0	0	-1,68	111,60	85,30
14	0	0	1,68	42,30	51,99
15	0	0	0	102,37	106,18
16	0	0	0	106,90	106,18

Tabela 5 – Matriz do planejamento CCR para o pH e a temperatura de cultivo

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	5,59	6,00	7,00	8,00	8,41
Temperatura (°C)	31,36	33,00	37,00	41,00	42,64

Tabela 6 - Matriz do planejamento CCR para o pH e a temperatura de cultivo com as valores experimentais para a atividade enzimática

Exp	pH	T (°C)	Y (Atividade enzimática)
1	-1	-1	180,80
2	1	-1	169,83
3	-1	1	129,63
4	1	1	101,97
5	0	0	155,43
6	0	0	152,82
7	0	0	153,00
8	0	1,41	97,37
9	0	-1,41	130,85
10	1,41	0	132,83
11	-1,41	0	66,70

3. Resultados e Discussões

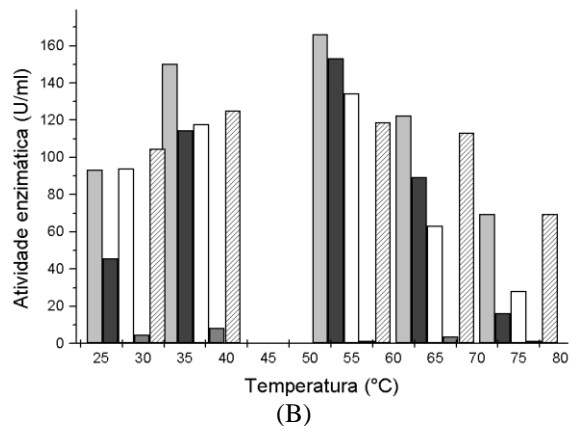
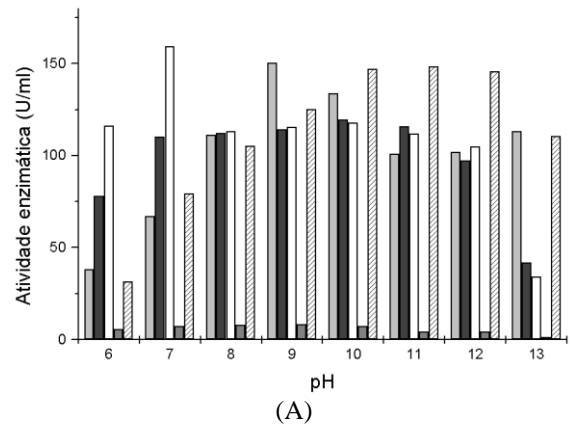
3.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática de enzimas comerciais

Para a caracterização enzimática quanto ao pH e a temperatura foi utilizado o substrato azocaseína.

Os resultados para diferentes valores de pH estão apresentados na Figura 1 (A). As enzimas A, B e C são recomendadas pelo fabricante para utilização em processos de remolho e caleiro, onde o pH varia entre 7 e 13. Enquanto isso, as enzimas D e E são recomendadas para o processo de purga, onde o pH varia entre 7,5 e 10. A maioria das enzimas testadas teve uma perda notável de atividade para valores de pH menor que 7 e maior que 12.

A influência da temperatura sobre a atividade enzimática pode ser observada na Figura 1 (B), com atividades máximas em torno de 55°C para as enzimas A,

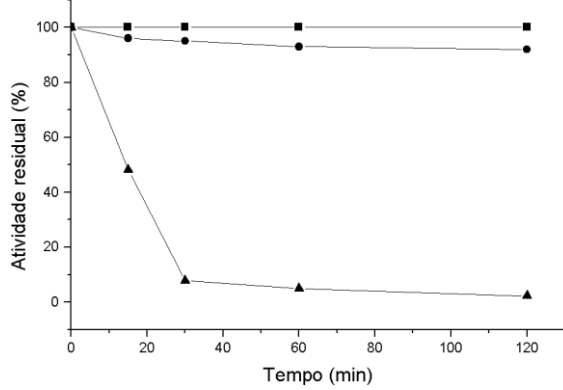
B e C, enquanto que as enzimas D e E apresentaram maior atividade na temperatura de 37°C. As enzimas utilizadas para a etapa de purga (enzima D) normalmente são enzimas pancreáticas, como a tripsina, isto explica a sua atividade mais baixa em altas temperatura. Acima de 60°C todas as enzimas apresentaram redução na atividade. Estes perfis de temperatura são semelhantes aos encontrados por outros autores. A enzima descrita por IONATA *et al.* (2008) apresentou atividade ótima a 55°C, enquanto HASSAN e FARAG (2004), também relataram maiores atividades de queratinase de *Aspergillus oryzae*, a 55°C.

**Figura 1** – Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade enzimática. Enzima A (■), enzima B (■), enzima C (□), enzima D (■), enzima E (▨).

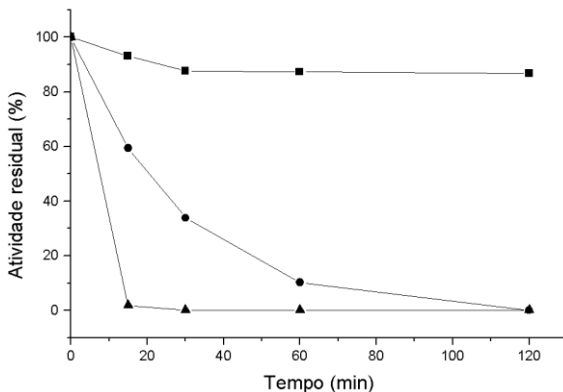
3.2 Estabilidade térmica das enzimas

A estabilidade térmica das enzimas é muito importante quando se leva em conta a sua utilização industrial. Na figura 2, os perfis de estabilidade térmica de todas as enzimas testadas são apresentados. A enzima A foi a mais estável, mantendo a sua atividade durante 120 minutos a 37 e 45°C, porém a 55°C, mesmo após curtos períodos de incubação, a enzima foi inativada. As demais enzimas apresentaram menor estabilidade. TATIENI *et al.* (2008) relataram que a enzima obtida a partir de uma espécie de *Streptomyces* manteve 80% de sua atividade quando exposta a temperatura de 50°C e foi completamente inativada a 70°C e temperaturas mais elevadas. OGINO *et al.* (2008) avaliaram a estabilidade térmica de uma enzima de *Bacillus* sp. Os autores relataram que a enzima manteve-se estável nas temperaturas de 30 a 40°C e manteve cerca de 60% de sua atividade para a temperatura de 50°C, perdendo

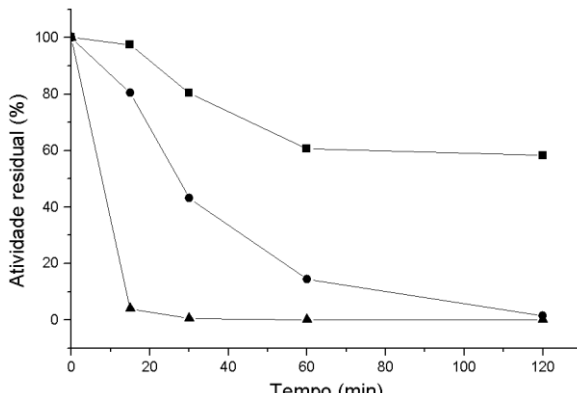
completamente sua atividade quando submetida a 60°C por 10 min.



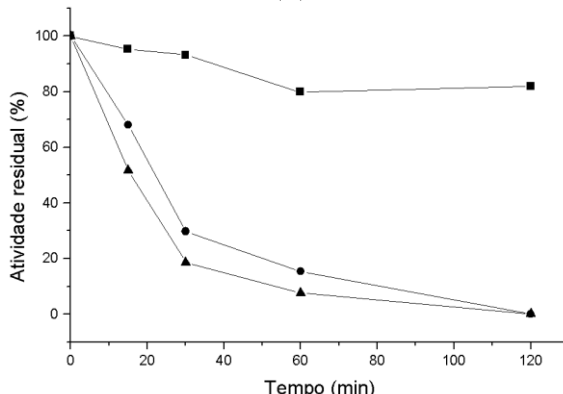
(A)



(B)



(C)



(D)

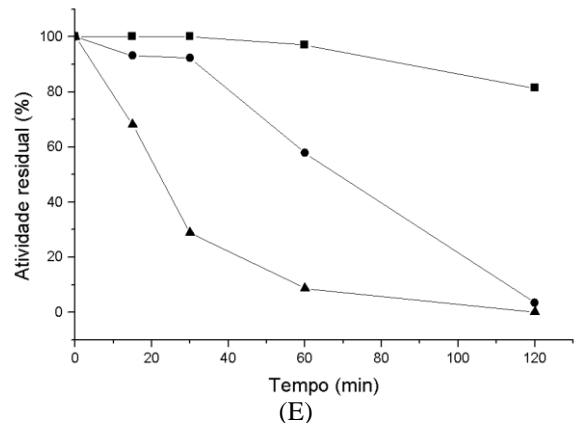


Figura 2 – Estabilidade térmica das enzimas A, B, C, D e E. 37°C (—■—), 45°C (—●—), 55°C (—▲—).

3.3 Atividade enzimática sobre diferentes substratos enzimáticos: azocoll, keratin azure e azocaseína

Peles são constituídas, principalmente, por três camadas: epiderme, a qual é formada, basicamente, por queratina; derme, que é composta pelas fibras de colágeno e hipoderme que é constituída principalmente por gorduras e é totalmente removida durante o processo de descarte. Assim, foram realizados experimentos para testar a atividade das 5 enzimas sobre diferentes substratos, simulando diferentes estruturas protéicas. Estes foram azocoll, *keratin azure* e *azocaseína*, os resultados estão resumidos na tabela 7.

Tabela 7 – Atividade enzimática sobre diferentes substratos

Substrato	Atividade enzimática (U/ml)				
	Enzima				
	A	B	C	D	E
Keratin azure	25±1,98	11±3,00	12±0,2	5±0,3	13±1,76
Azocoll	110±0,85	32±1,70	25±5,2	8±1,3	76±0,6
Azocaseína	166±3,96	153±1,27	134±2,1	8±0,57	145±1,91

Valores são as médias ± desvio padrão, experimentos realizados em triplicata

Todas as enzimas apresentaram maior atividade sobre a azocaseína, porém também foram ativas sobre os outros substratos, *keratin azure* e *azocoll*. De acordo com IONATA *et al.* (2008), resultados provenientes da utilização de substratos solúveis, como a azocaseína, não podem ser comparados com resultados obtidos quando substratos insolúveis foram utilizados, já que a atividade sobre os insolúveis é função da área superficial. Isto justifica a menor atividade das enzimas sobre *keratin azure* e *azocoll*, pois estes são insolúveis. Conforme GUPTA e RAMNANI (2006), proteases queratinolíticas com atividade leve sobre o colágeno podem ser benéficas para o processo de depilação, desde que não prejudiquem a resistência à tração do couro.

3.4 Inidores da atividade enzimática

A presença de sais e outros produtos químicos no banho (durante o processamento de couros na indústria) pode interferir na atividade enzimática e, portanto, é interessante que os mesmos sejam testados. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados dos efeitos dos inibidores e outros produtos químicos na atividade enzimática das enzimas testadas neste trabalho.

Tabela 8 – Efeito de alguns inibidores e produtos químicos sobre a atividade enzimática

Prod. Quím./ Inibidor	[C]	Atividade residual (%)				
		Enzima				
		A	B	C	D	E
EDTA	5mM	87±3,9	33±1,7	69±0,7	87±0,7	104±2,5
Alcool graxo	0,1%	111±1,5	96±1,60	100±3,4	85±0,76	96±2,7
Carbonato de sódio	0,3%	103±0,2	97±1,37	97±3,9	103±0,2	98±2,9
Carbonato de cálcio	0,5%	85±3,30	107±4,33	77±0,7	0	83±0,6
	1%	76±6,9	113±13,7	79±1,2	0	85±8,7
Tensoativo	0,1%	87±7,20	92±1,77	87±1,3	161±1,6	82±4,3
Sulfeto de sódio	1%	138±2,5	54±1,30	57±3,9	44±1,4	75±0,7

Valores são as médias ± desvio padrão, experimentos realizados em triplicata

O EDTA causou redução de atividade nas enzimas B e C, com pouco ou nenhum efeito sobre as enzimas A, D e E. Isso pode indicar cátions metálicos no centro ativo das enzimas B e C, suscetíveis ao seqüestro por EDTA (KUMAR E TAKAGI, 1999). TATINENI *et al.* (2008) relataram que uma queratinase de *Streptomyces sp.* mantém apenas 27% de sua atividade inicial após incubação com EDTA.

Álcool graxo, o qual é um solvente orgânico, carbonato de sódio e o tensoativo não causaram variações significativas na atividade das enzimas, exceto para a enzima D, a qual apresentou aumento de atividade na presença do tensoativo, possivelmente, porque este produto facilitou a sua ação. Riffel *et al.* (2003) determinaram a atividade residual de enzimas bacterianas, após incubação com solventes orgânicos, a atividade residual das enzimas ficou entre 56 e 70%.

A enzima D foi totalmente inibida quando incubada com carbonato de cálcio. As enzimas B, C e D foram inibidas por sulfeto de sódio, enquanto a enzima A foi ativada por este produto químico. Syed *et al.* (2009) relataram que uma queratinase de *S. gulbargensis* foi totalmente inibida pelos compostos de cálcio e sua atividade aumentada na presença de sulfeto de sódio. Riffel *et al.* (2007) descreveram que uma protease de *Chryseobacterium sp.* apresentou aumento de 3,5 vezes em sua atividade na presença de íons de cálcio.

PARTE II

3.5 Isolamento e identificação de microrganismos produtores de proteases

As características bioquímicas e morfológicas das cepas isoladas revelaram que os microrganismos pertencem ao gênero *Bacillus*. A Tabela 9 mostra a atividade de cada um dos 10 microrganismos isolados sobre azocaseína, *keratin azure* e *azocoll* e a sua identificação. Bactérias 11 e 17 foram selecionadas para a realização de mais estudos sobre sua capacidade de depilação. Neste trabalho serão apresentados apenas os resultados obtidos para a bactéria 11.

3.6 Seleção de variáveis significativas através do planejamento Plackett-Burmann

Nove variáveis foram analisadas quanto aos seus efeitos sobre a produção de proteases, para isto utilizou-se o planejamento experimental Plackett-Burmann (PB). As variáveis investigadas e as respostas correspondentes estão apresentadas na Tabela 10. Fatores com P-valores inferiores a 0,10 foram considerados como tendo um

impacto significativo sobre a resposta, e, portanto, selecionadas para estudos de otimização.

Tabela 9 – Identificação das bactérias isoladas e atividade das respectivas enzimas sobre diferentes substratos

Isolado	Atividade sobre azocaseína	Atividade sobre <i>keratin azure</i>	Atividade sobre <i>azocoll</i>	Identificação
11	114,97	9,20	61,33	<i>Bacillus subtilis</i>
15.1	114,07	5,70	112,83	<i>B. atrophaeus</i>
15.2	117,73	7,95	116,17	<i>Bacillus subtilis</i>
17	103,73	13,45	135,70	<i>Bacillus subtilis</i>
18	105,70	8,35	103,80	<i>Bacilluspumilus</i>
19	104,63	9,75	92,25	<i>Bacillus subtilis</i>
21	110,47	5,00	74,07	<i>Bacillus subtilis</i>
22	104,10	5,20	97,97	<i>Bacillus subtilis</i>
24	104,43	4,45	90,77	<i>Bacillus subtilis</i>
26	110,95	5,85	71,15	<i>Bacillus subtilis</i>

Tabela 10 – Efeitos estimados para a atividade enzimática resultantes do planejamento PB para bactéria 11

Variáveis	Fatores	Efeito	P-Valor
X ₁	Glicose	-1,45	0,9385
X ₂	Maltose	5,30	0,7788
X ₃	Peptona*	-34,67	0,0907
X ₄	Farelo de soja*	-38,87	0,0627
X ₅	Sulfato de magnésio	-11,00	0,5627
X ₆	Cloreto de cálcio	0,61	0,9741
X ₇	Extrato de levedura*	-57,62	0,0118
X ₈	Glicerol	-14,36	0,4531
	Sulfato de ferro	-21,17	0,2772
X ₉	heptahidratado		

*Estatisticamente significativos a 90% de confiança

Extrato de levedura, com valor de probabilidade de 0,0118, foi determinado como o fator mais importante, seguido pelo farelo de soja (0,0627) e a peptona (0,0907). Os menores valores de P indicam os fatores mais significativos na produção de proteases. Os três fatores significativos foram selecionadas para otimização pela metodologia de superfície resposta. Todas as outras variáveis insignificantes foram negligenciadas.

3.7 Otimização das variáveis significativas usando metodologia de superfície de resposta

Projeto composto central foi utilizado para determinar a concentração ótima das três variáveis significativas selecionadas (peptona, farelo de soja, extrato de levedura) para a produção de proteases. Um total de 16 experimentos com diferentes combinações das três variáveis selecionadas foi realizado. A tabela com resultados dos experimentos, bem como os resultados previstos estão apresentados na Tabela 4.

A Tabela 11 apresenta os coeficientes determinados pelo teste *t-Student's* e os valores de p (*p-values*). O coeficiente de primeira ordem do farelo de soja dado pelo modelo foi significativo a 95% de confiança e os demais não foram significativos. Apesar de somente o coeficiente de primeira ordem do farelo de soja ter sido significativo, a análise de variância mostrou que o modelo usando todos os coeficientes foi muito confiável, com $R^2 = 0,9$, que significa que 90% da variação total é explicada pelo modelo. Os coeficientes da equação de regressão foram calculados e os dados foram ajustados a uma equação de segunda ordem polinomial. A resposta da produção de protease (Y) por *Bacillus sp.*, pode ser expressa em termos da equação de regressão que segue:

$$Y = -278.14 - 13.87X_3 + 3.73X_3^2 + 54.49X_4 - 1.87X_4^2 + 70.79X_7 - 13.30X_7^2 - 1.59X_3X_4 + 2.42X_3X_7 - 0.71X_4X_7$$

Tabela 11 – Coeficientes estimados pelo modelo de regressão no planejamento CCR

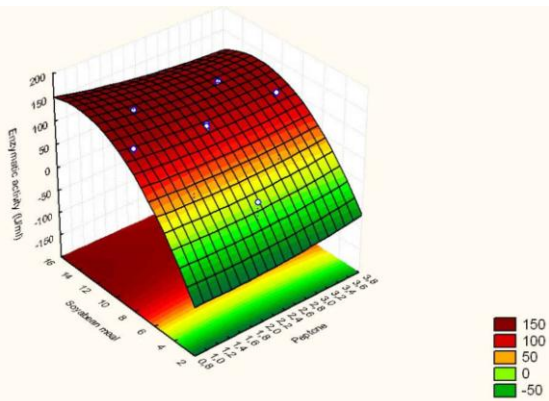
Variáveis	Coefficiente (b)	Valor t	P-valor
Média	-278,14	-1,29	0,24
X ₃	-13,87	-0,16	0,88
X ₃ X ₃	3,73	0,25	0,81
X ₄ *	54,49	2,59	0,04
X ₄ X ₄	-1,87	-2,02	0,09
X ₇	70,79	1,12	0,31
X ₇ X ₇	-13,30	-1,60	0,16
X ₃ X ₄	-1,59	-0,40	0,70
X ₃ X ₇	2,42	0,20	0,85
X ₄ X ₇	-0,71	-0,24	0,82

*Estatisticamente significativo a 95% de confiança

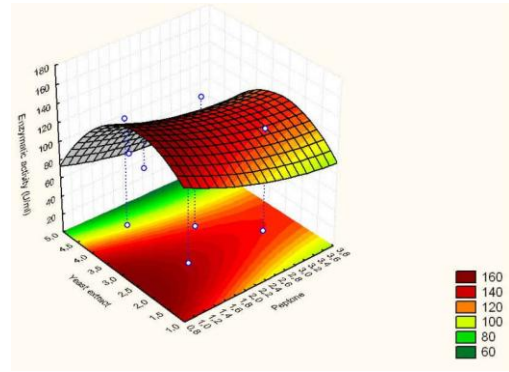
Os gráficos tridimensionais para a superfície de resposta (Fig.3) foram plotados para mostrar a interação entre a composição do meio de cultura e a concentração ótima dos components para a produção de proteases.

A Figura 3 (A) mostra a superfície de resposta para os fatores farelo de soja e peptona, quando a concentração de extrato de levedura foi mantida em 2g/l. A atividade enzimática máxima predita para esta condição foi de 150 U/ml, correspondendo a uma alta concentração de farelo de soja e (14g/l) e baixa concentração de peptona (1g/l). Isto indica o efeito positivo da alta concentração do farelo de soja, na produção de proteases.

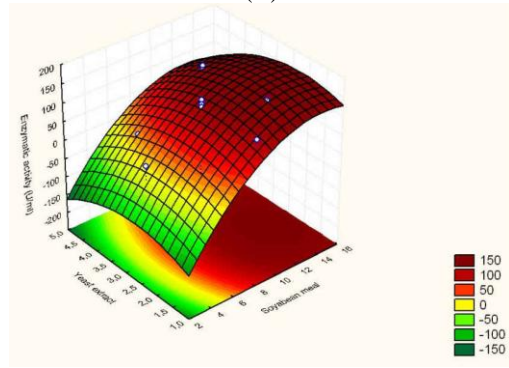
A Figura 3 (B) mostra que a resposta variou em função da concentração de extrato de levedura. Para valores acima de 3,5 g/l, e abaixo de 1,5 g/l houve um efeito negativo sobre a produção de protease. A Figura 3 (C) apresenta a interação entre extrato de levedura e farelo de soja, e mostra que a alta concentração de farelo de soja (14g / l) e a concentração de extrato de levedura em torno de 2,5 g/l apresentaram a melhor atividade enzimática, a concentração de peptona, foi mantida a 1g/l.



(A)



(B)



(C)

Figura 3 – Superfícies de resposta para produção de proteases. (A) farelo de soja e peptona, (B) extrato de levedura e peptona, (C) extrato de levedura e farelo de soja após 48 de cultivo.

3.8 Efeito do pH e da temperatura

O efeito do pH e da temperatura sobre o meio de cultivo otimizado foi avaliado usando o planejamento CCR, os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Efeitos estimados para a atividade enzimática, resultantes do DCCR para a bactéria 11

Variáveis	Parâmetros	Efeitos	P valor
X ₁₀	pH	-19,32	0,055
X ₁₁ *	Temperatura	-59,52	0,003
X ₁₀ X ₁₁		-8,35	0,278

*Estatisticamente significativo a 95% de confiança

De acordo com os resultados da tabela 10, apenas a temperatura apresentou efeito significativo sobre a produção de proteases a 95% de confiança. A temperatura foi ajustada a 32°C e o pH foi ajustado a 7 (valor este, normalmente apresentado pelo meio de cultivo, após o seu preparo).

4. Conclusão

O processamento de couros permanece como um desafio quanto ao desenvolvimento de tecnologias mais limpas, as enzimas podem desempenhar um papel importante como uma migração de tecnologia com uso de produtos químicos para produtos naturais, mais corretos, ambientalmente. No entanto, os custos da sua aplicação continuam elevados, assim, mais pesquisas nesta área se fazem necessárias. Os resultados obtidos neste trabalho serão úteis tanto para futuros trabalhos acadêmicos como também para utilização na indústria, já que características importantes das enzimas em questão foram detalhadas. Esses dados podem ser utilizados para maior e melhor aplicação das enzimas nos processos produtivos, pois a inibição ou não por produtos normalmente utilizados nas

etapas produtivas do couro também estão apresentadas, bem como as faixas de pH e temperaturas em que as enzimas apresentam as maiores atividades.

A nova bactéria isolada apresentou boa atividade sobre os substratos *keratin azure* e *azocoll*, o que possibilitará sua utilização nas etapas de depilação e caleiro, na remoção de pelos e proteínas interfibrilares. A aplicação do planejamento estatístico para a seleção e otimização das condições de cultivo permite uma rápida identificação dos fatores importantes. O planejamento Plackett-Burman indicou que as variáveis significativas sobre a atividade proteolítica foram extrato de levedura, peptona e farelo de soja. Esses fatores testados em planejamento CCR produziram um modelo otimizado para a produção de proteases. Após a otimização do meio de cultivo, a temperatura e o pH foram otimizados com base em outro planejamento CCR, somente a temperatura apresentou influência significativa sobre a produção de protease.

Os próximos passos serão o cultivo desses microrganismos em biorreatores e posterior aplicação na produção de couros. Além disso, será realizado também o estudo detalhado de seus efeitos sobre a pele animal e sobre o processo produtivo (redução do tempo de processamento, redução da carga poluidora e menor utilização de produtos químicos, etc.).

5. Agradecimentos

A Capes pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

6. Referências

- ADIGÜZEL, A.C.; BITLISLI, B.O.; YASA, I.; ERIKSEN, N.T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 226-234, 2009.
- FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 85-93, 2004.
- GIONGO, J.L.; LUCAS, F.S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 375-382, 2007.
- GUIA DO COURO ABQTIC, 2010.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **70**, 21-33, 2006.
- IONATA, E.; CANGANELLA, F.; BIANCONI, G.; BENNO, Y.; SAKAMOTO, M.; CAPASSO, A.; ROSSI, M.; LA CARA, F. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov. a thermotolerant organism isolated from sulfatic muds. *Microbiol. Research*, **163**, 105-112, 2008.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. Dyes and pigments, **76**, 338-347, 2008.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. *J. of Cleaner Production*, **17**, 507-515, 2009.
- KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Advances*, **17**, 561-594, 1999.
- OGINO, H.; OTSUBO, T.; ISHIKAWA H. Screening, purification and characterization of a leather-degrading protease. *Biochem. Engineering J.*, **38**, p. 234-240, 2008.
- PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 643-650, 2008.
- RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.*, **179**, 258-265, 2003.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J. of Biotechnol.* **128**, 693-703, 2007.
- RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F., *Planejamento de experimentos e otimização de processos*, 1ªEd, Casa do Pão editora, Campinas – SP, 2005.
- SYED, D.G.; LEE J.C.; LI, W.J.; KIM, C.J.; AGASA, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.*, **100**, 1868-1871, 2009.
- TATINENI, R.; DODDAPANENI, K.K.; POTUMARTHI, R.C.; VELLANKI, R.N.; KANDATHIL, M.T.; KOLLI, N.; MANGAMOORI, L.N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technol.*, **99**, 1596-1602, 2008.