

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Produção de extrato enzimático constituído por lipase
como insumo para o processamento de couros**

Dissertação de Mestrado

Viviane Kogler

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Produção de extrato enzimático constituído por lipase como insumo para o processamento de couros

Viviane Kogler

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e nos Laboratórios de Aplicação Técnica e Controle de Qualidade da MK Química do Brasil Ltda, sob financiamento da Fapergs e MK Química do Brasil Ltda através do Programa de Apoio ao Setor Coureiro-Calçadista do Rio Grande do Sul e CNPq através de bolsa.

“A melhor coisa do futuro é que ele chega à razão de um dia de cada vez.”
Abraham Lincoln

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1. JUSTIFICATIVA.....	16
2. INTRODUÇÃO	17
2.1. A ESTRUTURA DA PELE BOVINA	17
2.2. O PROCESSO DE CURTIMENTO DO COURO	20
2.3. ASPECTOS ECONÔMICOS DA INDÚSTRIA DO COURO	24
2.4. ASPECTOS AMBIENTAIS DA INDÚSTRIA DO COURO	25
2.5. A UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA INDÚSTRIA DO COURO	27
2.6. ENZIMAS	28
2.7. LIPASES	31
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. MICRORGANISMOS.....	42
4.1.1. <i>Isolamento</i>	42
4.1.2. <i>Manutenção das culturas</i>	42
4.1.3. <i>Identificação dos Microrganismos Isolados</i>	44
4.1.4. <i>Coloração de Gram</i>	44
4.1.5. <i>Coloração de endósporos</i>	45
4.1.6. <i>Produção de catalase</i>	45
4.1.7. <i>Teste do meio SIM (Gás-sulfídrico, indol e motilidade)</i>	46
4.1.8. <i>Teste de desaminação da Fenilalanina</i>	46
4.1.9. <i>Teste Voges-Proskauer (VP)</i>	46
4.1.10. <i>Teste da liquefação da gelatina</i>	47
4.1.11. <i>Hidrólise de amido</i>	47
4.1.12. <i>Teste de Urease</i>	47

4.1.13. Teste de assimilação de fontes de carbono	48
4.1.14. Teste de utilização do citrato de sódio	48
4.1.15. Teste de crescimento a 55°C.....	49
4.1.16. Teste de tolerância a NaCl 2% e 5%	49
4.1.17. Seqüenciamento do gene 23S rDNA das culturas bacterianas	49
4.2. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO PARA PRODUÇÃO DE LIPASE	50
4.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS	51
4.3.1. Determinação da atividade de lipase.....	51
4.3.2. Determinação da atividade de protease.....	52
4.4. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS	52
4.5. CULTIVO EM BIORREATOR.....	53
4.6. CONSUMO DE GLICOSE	54
4.7. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DA CULTURA	55
4.8. TESTES DE ESTABILIDADE DA ENZIMA AOS PROCESSOS DE CURTIMENTO	55
4.9. EXPERIMENTOS PRÁTICOS EM CURTUME	56
4.10. QUANTIFICAÇÃO DAS GORDURAS NAS PELES	56
4.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	57
4.12. MÉTODOS ESTATÍSTICOS	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	59
5.2. SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DA ENZIMA DE INTERESSE	59
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS.....	63
5.4. OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS.....	71
5.5. ESTABILIDADE DA LIPASE AOS PROCESSOS DE CURTIMENTO.....	83
5.6. ATUAÇÃO DA ENZIMA NO PROCESSO DE CURTIMENTO.....	85
6. DISCUSSÃO	88
7. PERSPECTIVAS	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

%	Porcento – Valor proporcional à parte, quando se considera o todo igual a cem
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromolar
µm	Micrometro
ALCA	Área de livre comércio das Américas
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucléico
g	Gramma
h	Hora
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da DNA-polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
rDNA	Ácido desoxirribonucléico codificador de rRNA
RNA	Ácido ribonucléico

s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
rpm	Rotações por minuto
TM	<i>Trade Mark</i> – Marca comercial
Triton X-100	Éter octilfenólico do decaetilenoglicol
U	Unidade enzimática
US\$	Dólar, moeda dos Estados Unidos da América
v/v	Volume por volume

Lista de figuras

FIGURA 2. PELE FRESCA.	18
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ALGUMAS DAS ATIVIDADES CATALISADAS POR LIPASES (CASTRO ET AL.,2004).	32
FIGURA 6. FULÃO PARA EXPERIMENTOS DE UM CURTUME COM PELE EM PROCESSO DE DEPILAÇÃO.	43
FIGURA 7. BIORREATOR UTILIZADO. REATOR NEW BRUNSWICK – MICROFERMENTOR® FERMENTOR 14.....	54
FIGURA 13. EFEITO DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA PRODUÇÃO DE LIPASE DE B. CEREUS. (A) CULTIVO DE 24 H SEM ADIÇÃO DE SURFACTANTE. (B) SURFACTANTE ADICIONADO NO INÍCIO DO CULTIVO. (C) SURFACTANTE 30 MIN*. (D) SURFACTANTE 16 H*. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM AGITADOR ORBITAL DE PLATAFORMA COM AGITAÇÃO DE 200 RPM E TEMPERATURA DE 36°C EM FRASCOS ERLLENMEYER DE 125 ML, CONTENDO 20 ML DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL E SURFACTANTE (0,25%). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	73
FIGURA 14. EFEITO DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA PRODUÇÃO DE LIPASE DE P. PASTORIS. (A) CULTIVO DE 72 H HORAS SEM ADIÇÃO DE SURFACTANTE. (B) SURFACTANTE ADICIONADO AO INÍCIO DO CULTIVO. (C) SURFACTANTE 30 MIN*. (D) SURFACTANTE 16 H*. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM AGITADOR ORBITAL DE PLATAFORMA COM AGITAÇÃO DE 200 RPM E TEMPERATURA DE 36°C EM FRASCOS ERLLENMEYER DE 125 ML, CONTENDO 20 ML DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL E SURFACTANTE (0,25%). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA. AS COLUNAS QUE POSSUEM AS MESMAS LETRAS (A, B, C, D OU E) NÃO APRESENTAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA PELO TESTE DE DUNCAN (A=0,05).	74
FIGURA 15. EFEITO DA ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA PRODUÇÃO DE LÍPASE B. SUBTILIS (ISOLADO 32). (A) CULTIVO DE 24 H SEM ADIÇÃO DE SURFACTANTE. (B) SURFACTANTE ADICIONADO AO INÍCIO DO CULTIVO. (C) SURFACTANTE 30 MIN*. (D) SURFACTANTE 16 HORAS*. (E) CULTIVO DE 48 HORAS SEM ADIÇÃO DE SURFACTANTE. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM AGITADOR ORBITAL DE PLATAFORMA COM AGITAÇÃO DE 200 RPM E TEMPERATURA DE 36°C EM FRASCOS ERLLENMEYER DE 125 ML, CONTENDO 20 ML DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL E SURFACTANTE (0,25%). OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	75
FIGURA 19. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR P. PASTORIS EM 10 L DE CULTURA. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM BIORREATOR NEW BRUNSWICK MF-14, COM 10 L DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL. AGITAÇÃO DE 200 RPM, TEMPERATURA DE 28°C, PH 8,0 E TAXA DE AERAÇÃO DE 1,0 VVM. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	80
FIGURA 20. ATIVIDADE ESPECÍFICA DE LIPASE PRODUZIDA POR P. PASTORIS EM 10 L DE CULTURA. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM BIORREATOR NEW BRUNSWICK MF-14, COM 10 L DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL. AGITAÇÃO DE 200 RPM, TEMPERATURA DE 28°C, PH 8,0 E TAXA DE AERAÇÃO DE 1,0 VVM. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	80
FIGURA 21. CONSUMO DE GLICOSE POR P. PASTORIS EM CULTURA DE 10 L PARA PRODUÇÃO DE LIPASE. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM BIORREATOR NEW BRUNSWICK MF-14, COM 10 L DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL. AGITAÇÃO DE 200 RPM, TEMPERATURA DE 28°C, PH 8,0 E TAXA DE AERAÇÃO DE 1,0 VVM. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	81

FIGURA 23. CRESCIMENTO POPULACIONAL DE P. PASTORIS EM 10 L DE CULTURA, ATRAVÉS DA DENSIDADE ÓPTICA A 600 NM. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM BIORREATOR NEW BRUNSWICK MF-14, COM 10 L DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL. AGITAÇÃO DE 200 RPM, TEMPERATURA DE 28°C, pH 8,0 E TAXA DE AERAÇÃO DE 1,0 VVM. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	82
FIGURA 24. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE LIPASE POR P. PASTORIS EM 10 L DE CULTURA E 96 H DE CULTIVO. OS CULTIVOS FORAM REALIZADOS EM BIORREATOR NEW BRUNSWICK MF-14, COM 10 L DE MEIO POBRE ENRIQUECIDO COM GORDURA ANIMAL. AGITAÇÃO DE 200 RPM, TEMPERATURA DE 28°C, pH 8,0 E TAXA DE AERAÇÃO DE 1,0 VVM. OS ENSAIOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA.	82
FIGURA 26. ESTABILIDADE DA LIPASE DE P. PASTORIS À CAL E Na ₂ S. AS REFERIDAS CONCENTRAÇÕES DE CAL E Na ₂ S FORAM ADICIONADAS A 10 mL DO CULTIVO E 10 mL DE ÁGUA UTILIZADA NO CURTUME. A MISTURA FOI INCUBADA EM AGITADOR ORBITAL DE PLATAFORMA COM AGITAÇÃO DE 100 RPM E 28°C. COMO CONTROLE FOI UTILIZADO 10 mL DE ÁGUA DESTILADA ADICIONADA A 10 mL DO CULTIVO.	84

Lista de Tabelas

TABELA 1. ALGUMAS DAS ENZIMAS UTILIZADAS NAS DIFERENTES ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE PELES.....	28
TABELA 2. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE LIPASES MICROBIANAS.....	34
TABELA 3. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE LIPASE DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NO CURTUME.....	61
TABELA 4. PROVAS BIOQUÍMICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS NO CURTUME.	65
TABELA 5. AÇÃO DA ENZIMA LIPOLÍTICA SOBRE AS PELES VERDES NA OPERAÇÃO DE REMOLHO.	86

Resumo

Na indústria coureira há uma grande preocupação com o meio ambiente, já que a maioria das etapas para o processamento do couro são realizadas através de processos químicos. Estes processos devem ser controlados para um baixo impacto ambiental e menor custo de tratamento de resíduos. Este trabalho visa desenvolver um extrato enzimático completamente biodegradável, constituído por lipases de microrganismos, para diminuir o uso de tensoativos nos curtumes. Para tal foi necessário o uso de microrganismos que produzem lipases de maneira eficiente para substratos específicos com a variação no espectro de temperatura e pH utilizados nos processos de processamento do couro. Portanto, foi realizado o isolamento de diversos microrganismos em um curtume e estes foram submetidos à análise da produção de lipases induzida por gordura animal. A partir destes isolados foram selecionados e identificados os melhores produtores de lipases: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris* e *Proteus* sp. Dentre estes microrganismos, o mais promissor, foi a levedura *P. pastoris*. A produção de lipases é afetada por diferentes fatores ambientais, assim foram testados, em escala piloto, a influência do tempo de cultivo, pH, temperatura de cultivo e agitação. Além disso, também foram testados o uso de goma arábica e três diferentes surfactantes no

cultivo para o possível aumento da produção da enzima. As melhores condições de crescimento para uma maior produção de lipase por *P. pastoris* foram otimizadas em 72 h, 28°C, pH 8,0 e 200 rpm. A adição de Triton X-100 ao final do cultivo também aumentou a atividade de lipase. A partir destes resultados a levedura foi submetida ao cultivo em reator de 10 L e determinados o melhor tempo de cultivo, o consumo de glicose e a densidade óptica a 600 nm. O melhor tempo de cultivo manteve-se em 72 h. Ao final deste cultivo, o extrato bruto foi utilizado para determinar a estabilidade da enzima à formulação empregada nos processos de curtimento, já que as condições destes processos podem afetar a atividade de algumas enzimas. A enzima não se mostrou estável aos químicos utilizados no processamento de couros. Por isto, para testar a eficácia da enzima em relação aos produtos encontrados no mercado algumas etapas foram reformuladas para que a enzima pudesse manter a sua atividade original. Os resultados destes experimentos mostraram-se satisfatórios, provando que a produção e utilização desta enzima no mercado é promissora.

Abstract

The tanning industry has a great concern with the environment, since the majority of stages for leather processing is carried out using chemicals. These processes must be controlled for a low ambient impact and lesser cost of residues treatment. This work aims to develop a completely biodegrading enzymatic extract consisting of microbial lipases, to diminish the use of surfactants in the tanneries. For this product production is necessary the use of efficient microorganisms producing lipases for specific substrates with the variation in the specter of temperature and pH used in the tannery. Therefore, the screening of diverse microorganisms in a tannery was carried out and these had been submitted to the analysis of the induced lipases production with animal fat. It had been selected and identified the best lipases producers: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris* and *Proteus sp.* Among these microorganisms, the most promising was *P. pastoris*. The lipase production is affected by different ambiantal factors, thus it was tested, in scale pilot, the influence of the growth time, pH, growth temperature and agitation. Moreover, also the use of arabic gum and three different surfactants in the culture for the possible increase of the enzyme production was tested. The best

growth conditions for the best lipase production of *P. pastoris* are 72 h, 28°C, pH 8.0 and 200 rpm. The addition of Triton X-100 in the cultivation end also increases the lipase activity. Through these results the yeast was grown in 10 L culture reactor. During this cultivation the best growth time, the glucose consumption and the optical density at 600 nm were determined. The best growth time remained in 72 h. This culture crude extract was used to determine the enzyme stability to the formulation used in the tanning processes, since the conditions of these processes may affect enzyme activity. The enzyme was not stable in the presence of these chemicals. To compare the enzyme effectiveness with the chemicals and commercial enzymes, some processing stages were improved, so that the enzyme could keep its original activity. These results were satisfactory, suggesting that this enzyme production and its commercial use are promising.

1.

Justificativa

Atualmente o meio ambiente tem sido alvo de muitas preocupações e as indústrias têm mostrado um grande interesse em reavaliar os processos existentes. Muitos dos produtos químicos utilizados estão sendo substituídos por enzimas, melhorando a qualidade do produto final e minimizando as cargas poluentes ao meio ambiente. A indústria coureira possui uma grande preocupação com o impacto ambiental causado pelo uso de produtos químicos nos curtumes. Para proteger o meio-ambiente e diminuir o custo de tratamento de resíduos, as indústrias possuem interesse e potencial para substituir os produtos químicos por enzimas.

2.

Introdução

2.1. A estrutura da pele bovina

A pele bovina é composta pela epiderme, derme, pêlos, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e por uma ampla variedade de estruturas glandulares especializadas (Figura 1 e 2).

A epiderme, a camada mais externa da pele, é um epitélio estratificado pavimentoso e queratinizado, com espessura variada conforme a localização, sendo a região provida de pêlos a mais delgada. Além das células queratinizantes regulares da epiderme, há também os melanócitos localizados entre as células do estrato basal e a camada do estrato espinhoso. Grânulos de melanina fornecem a cor aos pêlos e à pele, e protegem o tecido dos raios ultravioletas da luz solar (Dellman & Brown, 1982).

A derme, localizada abaixo da epiderme é um tecido conjuntivo elástico e reticular, rico em colágeno. Folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e nervos estão distribuídos em vários níveis por toda a derme. As glândulas sudoríparas são pequenos adenômetros responsáveis pelo resfriamento

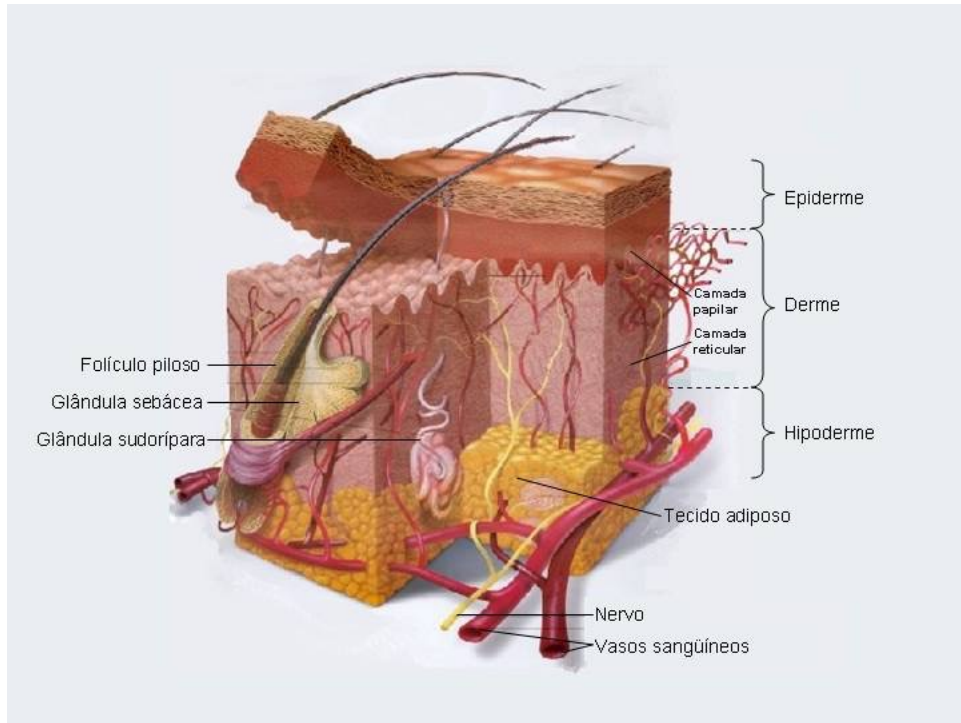


Figura 1. Desenho esquemático da anatomia da pele. Adaptado de www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/anatomia.htm.

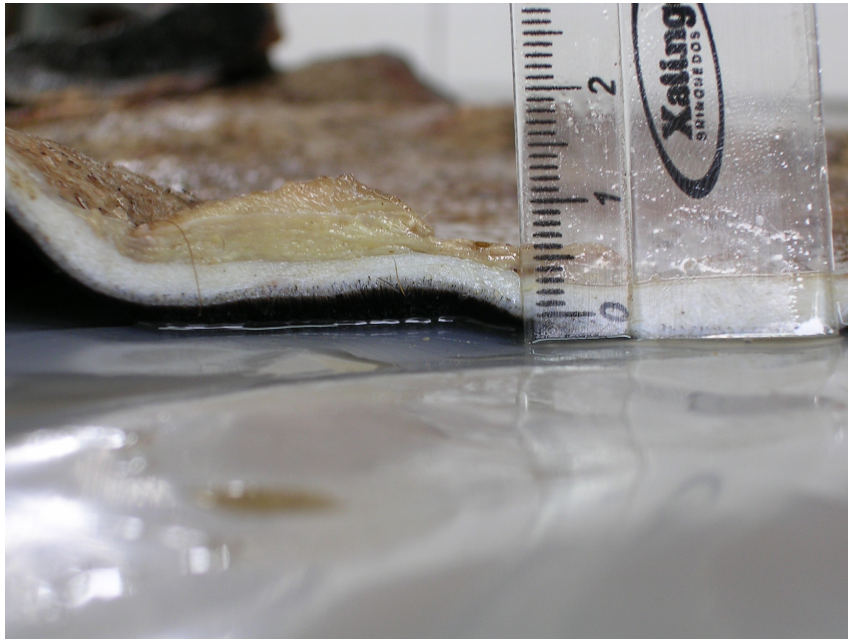


Figura 2. Pele fresca.

da pele excretando água, uréia e sais, juntamente com outros produtos. Já as glândulas sebáceas são sacos membranosos que contêm células cujo citoplasma apresenta gotas de lipídios, sendo responsáveis por evitar perdas de calor excretando essa gordura sobre a superfície da pele, evitando a evaporação de água. A derme está geralmente dividida numa camada superficial (papilar), que é composta por uma malha de fibras finas, células plasmáticas e fibroblastos, e de uma camada profunda (reticular), que é bem mais espessa e mais densa, contendo grandes feixes de fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície. A hipoderme ou tecido celular subcutâneo é a camada de tecido conjuntivo que ancora a derme ao músculo ou ao osso. Por ser um meio de união da pele com os tecido e órgãos que recobre, não é considerada, num sentido restrito, como constituinte da pele (Dellman & Brown, 1982; Hoinacki, 1989).

A hipoderme consiste em fibras colágenas frouxamente dispostas, que proporcionam flexibilidade e movimento livre sobre as estruturas subjacentes. Quando a pele é removida da carcaça, parte do tecido areolar permanece ligado a ela, juntamente com quantidades variáveis de tecido adiposo, tecido conectivo, vasos sanguíneos, nervos e músculos (Hoinacki, 1989).

Para o curtidor, a derme é a parte da pele mais importante, pelo fato de ser a camada constituinte da pele que será transformada em couro. A epiderme e a hipoderme são eliminadas nas operações que antecedem a operação de curtimento propriamente dita (Hoinacki, 1989).

A queratina é o principal componente da epiderme, enquanto o colágeno é o principal componente da derme. A queratina e o colágeno são proteínas de

composição diferente e o seu comportamento perante os agentes depilantes difere: enquanto a queratina é destruída, o colágeno permanece intacto. Assim, na depilação temos a destruição da epiderme e de todos os componentes presentes nela constituídos por queratina como os pêlos, as glândulas sebáceas e sudoríparas. Dada a necessidade de remover a epiderme antes do curtimento, a diferença da composição química das duas camadas tem grande importância (Dellman & Brown, 1982; Hoinacki, 1989).

2.2. O processo de curtimento do couro

O couro constitui-se da pele de animais processada pelo curtimento preservando-a da putrefação e que a tornam flexível e macia (Hoinacki, 1989). O couro é o único material conhecido que absorve até 75% de umidade mantendo o tato seco. Por isso é considerado o melhor material para estar em contato com o corpo (Castro, 2002).

A transformação da pele em couro é um processo que implica a passagem da pele por uma série de etapas e processos, que são basicamente, a ribeira, o curtimento, o acabamento molhado e o acabamento (Figura 3). Ao passar por estes processos, a natureza fibrosa da pele é mantida, porém as fibras são previamente separadas pela remoção do tecido interfibrilar e pela ação de produtos químicos. Após a separação das fibras e a remoção do material interfibrilar as peles são tratadas com os curtentes, transformando-as em couros (Hoinacki, 1989).

Geralmente as peles chegam aos curtumes na forma fresca, mas se não é possível iniciar imediatamente o processo de curtimento elas podem chegar em

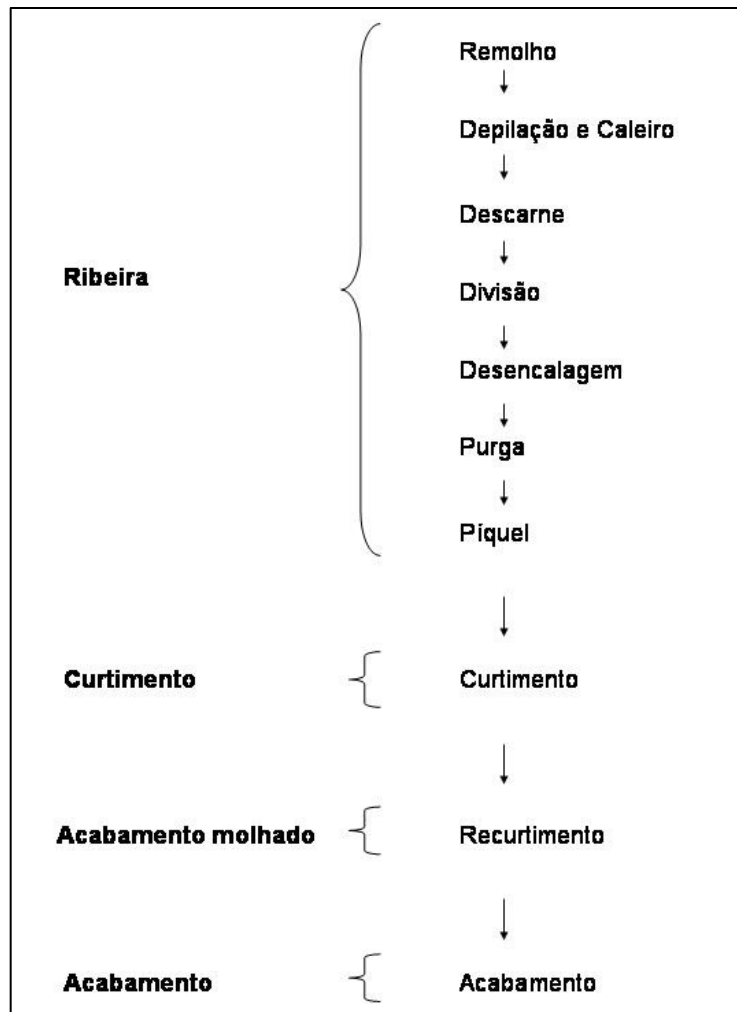


Figura 3. Diagrama do processamento de couros. (Grupo MK, 1999).

estado desidratado, conservadas por processos que utilizam a secagem ou a salga. Assim, o primeiro processo pelo qual a pele é submetida é o remolho, que tem a finalidade de repor o teor de água apresentado pelas peles quando estas recobriam o animal e retirar parcialmente o excesso de gorduras indesejáveis. Para tal, é utilizada uma solução aquosa de tensoativo (Hoinacki, 1989).

A importância do remolho está principalmente no fato de que em todas as operações posteriores a água é o veículo dos diferentes reagentes, que estão em solução, para entrarem em contato com as fibras, possibilitando a ocorrência de

reações. Hidratada, a pele estará pronta para a depilação e o caleiro, que são responsáveis pela remoção do sistema epidérmico, das gorduras excessivas remanescentes nas peles, assim como prepará-las para as operações posteriores (Hoinacki, 1989).

Usualmente a operação de depilação é realizada em duas etapas, na primeira ocorre a hidrólise das ligações dissulfeto, em meio alcalino, e na segunda os agentes depilantes, como os sulfetos e as aminas, reagem com os produtos da hidrólise (Hoinacki, 1989).

No caleiro, os reagentes, dentre eles o principal é o cal, agem sobre o colágeno e outras proteínas, abrindo e intumescendo a estrutura fibrosa. Após o caleiro, quando as peles estarão em seu estado intumescido, é executada a operação de descarne, que elimina os materiais aderidos ao carnal, ou seja, a derme é separada da hipoderme em máquina de descarne (Hoinacki, 1989). Posteriormente, a pele, agora constituída apenas pela derme, é submetida à divisão, que consiste na separação da pele em camadas: a parte superior, a mais nobre, onde originalmente estavam implantados os pêlos, denominada “flor”; e a parte inferior, denominada de “raspa” ou “crosta”, considerada como subproduto, embora também sirva para a elaboração de produtos nobres tais como camurções para calçados e vestimentas (Castro, 2002).

A cal, após completado o caleiro, encontra-se na pele, combinada à estrutura protéica, depositada nas camadas externas e dentre as fibras, como também em solução entre os constituintes da estrutura. Nesta etapa é necessário um tratamento para preparar as peles para as etapas posteriores, removendo as substâncias

alcalinas. A cal não ligada à estrutura pode ser eliminada por lavagem, mas aquela que está quimicamente combinada, somente pode ser removida por sais e ácidos. Quando reagem, a cal, os sais e os ácidos resultam em produtos de grande solubilidade, facilmente removíveis por lavagem. Este processo denomina-se desengalagem (Hoinacki, 1989).

Antes do curtimento, ainda é necessária uma etapa para retirada de alguns resíduos presentes na estrutura fibrosa. Esta etapa é a purga, onde se utilizam enzimas proteolíticas, provenientes de diferentes fontes, para eliminar os materiais queratinosos degradados, submetendo os materiais a certa digestão (Hoinacki, 1989).

No píquel, ocorre principalmente a complementação da desengalagem, a desidratação das peles e a interrupção da atividade enzimática. As peles serão tratadas com soluções salino-ácidas. Os ácidos atuam sobre as proteínas convertendo-as em um composto ácido e o sal tem a finalidade de controlar o grau de intumescimento da pele (Hoinacki, 1989).

Após estas etapas as peles estão preparadas para o curtimento, que irá transformá-las em material estável e imputrescível. No curtimento, ocorre um aumento na estabilidade de todo o colágeno formando enlaces transversais que garantem características importantes couro, dentre elas o aumento da temperatura de retração, a estabilização face às enzimas e a diminuição da capacidade de intumescimento do colágeno. As moléculas dos agentes curtentes ligam-se entre as cadeias polipeptídicas de uma macromolécula de colágeno, e entre cadeias de macromoléculas distintas, sendo capazes de se combinar com dois grupos

funcionais, pertencentes a cadeias polipeptídicas distintas. Os agentes curtentes podem ser sais de cromo, zircônio, alumínio e ferro, curtentes vegetais, sintéticos, aldeídos, parafinas sulfocloradas ou ainda gorduras como por exemplo o óleo de peixe. Atualmente apenas o curtimento com sais de metal, curtentes vegetais tem importância econômica. O curtimento com sais de metal, permite um acabamento mais refinado, onde o couro adquire maior maleabilidade e maciez. No curtimento com substâncias vegetais (tanino), o couro se torna mais endurecido e armado. O curtimento através de gordura é um processo mais artesanal e circunscrito ao universo das comunidades dos esquimós a fim de atender suas necessidades mais peculiares (Hoinacki, 1989; Castro, 2002).

Depois de curtido o couro é submetido à neutralização que consiste da eliminação dos ácidos livres, por meio de produtos auxiliares suaves e sem prejuízo das fibras do couro e da flor. A partir daí realizam-se as etapas de acabamento molhado e acabamento, que irão dar ao couro as características desejadas para cada finalidade (Hoinacki, 1999).

2.3. Aspectos econômicos da indústria do couro

Estima-se uma produção mundial de 326 milhões de couros bovinos por ano, sendo 40 milhões no Brasil, onde, 65% dos couros são exportados como tal, 22% são exportados de forma indireta, como calçados, e outros 13% são consumidos no mercado interno. A Ásia importa 50% da produção, enquanto a União Européia 40% e a ALCA 6,5%. Atualmente, há 787 estabelecimentos curtidores no Brasil, 40% deles localizam-se na região Sul, 37% na região Sudeste, 11% na região Nordeste,

9% na região Centro-Oeste, e 3% na região Norte, empregando mais de 38 mil pessoas (AICSUL, 2004).

O Rio Grande do Sul já teve o maior rebanho bovino do Brasil, viabilizando o desenvolvimento da indústria curtidora gaúcha, fundamental para o surgimento do maior pólo calçadista da América do Sul, situado no Vale do Rio dos Sinos. Atualmente, no estado, há 220 empresas, que geram mais de 14 mil empregos diretos e um faturamento anual estimado em US\$ 800 milhões. A produção é estimada em 12 milhões de couros bovinos. Destes, três milhões resultam em produtos manufaturados para o mercado interno; quatro milhões de couros são transformados em produtos manufaturados exportados e cinco milhões são exportados como couro. As exportações dos curtumes gaúchos geraram faturamento de US\$ 418 milhões em 2004, o que equivale a 32,3% do total das vendas externas do Brasil (AICSUL, 2005). Considerando o custo para o tratamento de resíduos de US\$ 0,30 por metro quadrado de couro produzido, tem-se o custo total mundial de mais de US\$ 370 milhões por ano ou cerca de US\$ 1 milhão por dia (AICSUL, 2000).

2.4. Aspectos ambientais da indústria do couro

O meio ambiente está se deteriorando gradualmente como um resultado das atividades sócio-econômicas do homem. As indústrias causam imediatas mudanças adversas no ambiente e são um desafio para a sociedade. A indústria do couro é uma destas indústrias. Apesar disso, o couro e o ambiente podem ser descritos como dois lados de uma moeda. Por exemplo, o processamento de couros pode ser visto como um processo que usa o subproduto da indústria da carne para criar couro

através do curtimento. De qualquer maneira, uma análise detalhada das conseqüências ambientais do curtimento também é crucial. Apesar de a indústria do couro trazer visíveis impactos sócio-econômicos positivos através de empregos e lucros, a indústria ganhou uma imagem negativa na sociedade devido à poluição (Thanikaivelan *et al.*, 2004).

Em cada estágio do processamento de couros, vários químicos são utilizados e uma variedade deles é expelido no meio ambiente. Aproximadamente 35 litros de água são utilizados por quilograma de pele processada. Com a presente capacidade global anual de processamento de 9×10^9 kg de peles, é estimado que 30×10^{10} litros de efluente líquido seja gerado. Isto acarreta nos dois principais problemas da indústria do couro: a disponibilidade de água de boa qualidade e o tratamento de quantidades tão grandes de efluentes (Thanikaivelan *et al.*, 2004).

Atualmente, o aumento no controle do descarte de resíduos e os custos de tratamento têm motivado pesquisas em todas as áreas industriais para encontrar alternativas a processos que geram alto teor de poluentes. A utilização de enzimas que auxiliem na diminuição dos resíduos indesejáveis poderia tornar os processos de curtimento mais viáveis econômica e ecologicamente (Pal *et al.*, 1996). Esforços têm sido feitos para substituir ou minimizar o uso de químicos tóxicos, em cada processo individual, para diminuir a poluição ou até chegar à produção de um couro natural com taxas de poluição próximas à zero (Saravanabhavan *et al.*, 2004). Um destes processos, onde se pode e deve ser substituído o uso de produtos químicos é no desengraxa de couros, realizado em diversas etapas do curtimento, como no remolho e no caleiro, utilizando tensoativos.

2.5. A utilização de enzimas na indústria do couro

A biotecnologia tem sido utilizada na indústria do curtimento por muitos anos, desde a descoberta do uso de enzimas. Já em 1910, utilizavam-se enzimas de forma comercial para auxiliar na indústria do couro (Green, 1952). Até cerca de 15 anos atrás, a maioria das enzimas utilizadas na indústria do couro eram de origem animal, como as extraídas do pâncreas bovino. O desenvolvimento da biotecnologia fez surgir uma nova era de produtos enzimáticos, oriundos de microrganismos (Jaquess *et al.*, 1999).

As enzimas podem ser utilizadas em todos os estágios do processamento do couro, com exceção, talvez, do atual processo de curtimento. Atualmente, métodos biológicos têm sido utilizados com sucesso no remolho (para limpeza e hidratação), na depilação, na lavagem (remoção de proteínas indesejáveis) e, raramente no desengraxa (Thanikaivelan *et al.*, 2004). Algumas das aplicações das enzimas no processamento de peles estão apresentadas na Tabela 1.

O uso de lipases para o desengraxa tem sido motivo de muita atenção nos últimos anos, devido à crescente pressão para diminuição do uso de tensoativos. O desengraxa enzimático pode resultar em um couro de melhor qualidade, com tingimento mais homogêneo, e melhor absorção dos corantes e diminuição da opacidade do couro.

2.6. Enzimas

Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas específicas. Essas reações são a base do metabolismo de todos os organismos vivos, e proporcionam

Tabela 1. Algumas das enzimas utilizadas nas diferentes etapas do processamento de peles.

<i>Etapa do processo</i>	<i>Enzima utilizada</i>	<i>Função da enzima</i>
Remolho	Protease	Degradar proteínas solúveis
	Lipase	Degradar a gordura da pele permitindo a re-hidratação das peles
Caleiro	Protease	Degradar queratina (depilação)
	Lipase	Degradar gordura da pele
Purga	Protease	Degradar resíduos de proteínas completando a limpeza da estrutura fibrosa
	Lipase	Degradar os resíduos de gordura ainda presentes completando a limpeza da estrutura fibrosa.
	Enzimas pancreáticas	Remover todos os resíduos de materiais parcialmente degradados
Desengraxe	Lipase	Desengraxar
Neutralização	Protease	Preparar a pele para o re-curtimento

muitas oportunidades para a indústria realizar conversões biocatalíticas eficientes e econômicas (Van Beilen & Li, 2002).

Os sistemas enzimáticos solucionam uma variedade de problemas ambientais, trazendo benefícios também na sua utilização. As enzimas tornam estes sistemas tão vantajosos, pois atuam em temperaturas e condições físicas moderadas substituindo solventes orgânicos e muitas condições severas, o que reduz o gasto energético e elimina a poluição ambiental. Também são altamente específicas o que significa menos efeitos indesejáveis e a não liberação de produtos intermediários impróprios durante a sua utilização. Podem ainda ser utilizadas para o tratamento de resíduos de dejetos biológicos, inclusive em grande volume e são totalmente biodegradáveis. Além disso, as enzimas são sistemas naturais e ao serem degradadas são reaproveitadas em aminoácidos. As de origem microbiana são utilizadas no processamento de alimentos, manufatura de detergentes, têxteis, indústria farmacêutica e terapêutica (Pilnik & Ronbouts, 1985; Peczyn´ska-czoch & Mordaski, 1988; Falch, 1991).

As reações catalisadas por enzimas ou os sistemas enzimáticos possuem uma especificidade muito maior comparados com as formas convencionais de reações orgânicas (Ogawa & Shimizu, 2002). Entretanto, enzimas produzidas por diferentes microrganismos, com ação idêntica, variam significativamente nas condições ótimas de suas reações. Por isto, é necessário encontrar microrganismos que produzam enzimas para substratos específicos com variação no espectro de

temperatura e pH referidos em diferentes processos de produção (Peczyn´ska-czoch & Mordaski, 1988). Desta forma, o *screening* de novas enzimas que sejam capazes de catalisar novas reações é constantemente necessário. Uma das mais eficientes e mais significantes maneiras de encontrar novas enzimas é investigar grandes números de microrganismos, devido à sua diversidade e versatilidade características (Ogawa & Shimizu, 2002).

O uso de processos mediados por enzimas remonta a antigas civilizações, quando as enzimas encontradas na natureza já eram utilizadas na produção de alimentos, como queijo, pão, cerveja, vinho e vinagre, e em produtos manufaturados como couro, tecidos e corantes. Todos esses processos estão baseados em enzimas produzidas pelo crescimento espontâneo dos microrganismos ou por enzimas presentes em preparações adicionadas, como extrato de frutas ou pâncreas animal. Atualmente, aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas, aproximadamente 2000 estão em uso comercial. A maioria das enzimas é de origem microbiana. Até a década de 60, a venda total de enzimas era de apenas alguns milhões de dólares anualmente, mas desde então, o mercado tem crescido espetacularmente graças à evolução da biotecnologia moderna. Devido ao melhor entendimento da bioquímica da produção, do processo de fermentação, e dos métodos de recuperação, um número cada vez maior de enzimas pode ser produzido. Igualmente, avanços nos métodos de utilização de enzimas têm aumentado muito a sua demanda. Além disso, devido as diferentes transformações que as enzimas podem catalisar, o número de enzimas utilizadas comercialmente continua a se multiplicar (Sharma *et al.*, 2001, Kirk *et al.*, 2002).

A demanda mundial de enzimas é satisfeita por 12 maiores produtores e 400 menores fornecedores. Aproximadamente 60% de todo o abastecimento mundial de enzimas industriais é produzido na Europa. Pelo menos 75% de todas as enzimas industriais é de ação hidrolítica, sendo utilizadas para a degradação de várias substâncias naturais. As proteases dominam o mercado, somando aproximadamente 40% do mercado de enzimas, seguidas das amilases e celulasas (Sharma *et al.*, 2001, Kirk *et al.*, 2002).

Em 1995, o valor estimado do uso mundial de enzimas industriais era de US\$1 bilhão; em 1998, as vendas de enzimas do mundo todo somaram mais de US\$1,5 bilhões, com um crescimento anual prognóstico de 2% para a indústria do couro, 15% na indústria do papel e 25% em enzimas para alimentos (Beilen & Li, 2002).

Recentemente, um estudo publicado pela OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), mostrou como a indústria implementou processos biotecnológicos e alcançou benefícios em termos de custos e sustentabilidade. A partir de 21 casos estudados pode-se ter uma proveitosa impressão da experiência de algumas empresas que analisaram o potencial da biotecnologia e decidiram adotar ou rejeitar os processos biotecnológicos. Em 15 casos os processos foram baseados no uso da tecnologia de enzimas e em todos, os custos de operação reduziram de 9% a 90%, além de uma economia de energia e matéria-prima (Beilen & Li, 2002).

2.7. Lipases

Lipases são enzimas que catalisam a hidrólise ou a formação de lipídios. Em geral as lipases hidrolisam triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos, mas são um

grupo versátil de enzimas e podem apresentar outras atividades, como de fosfolipase, lisofosfolipase, colesterol esterase, cutinase, amidase e outros tipos de atividades de esterase (Svendsen, 2000). Algumas das atividades exercidas pelas lipases estão apresentadas na Figura 4.

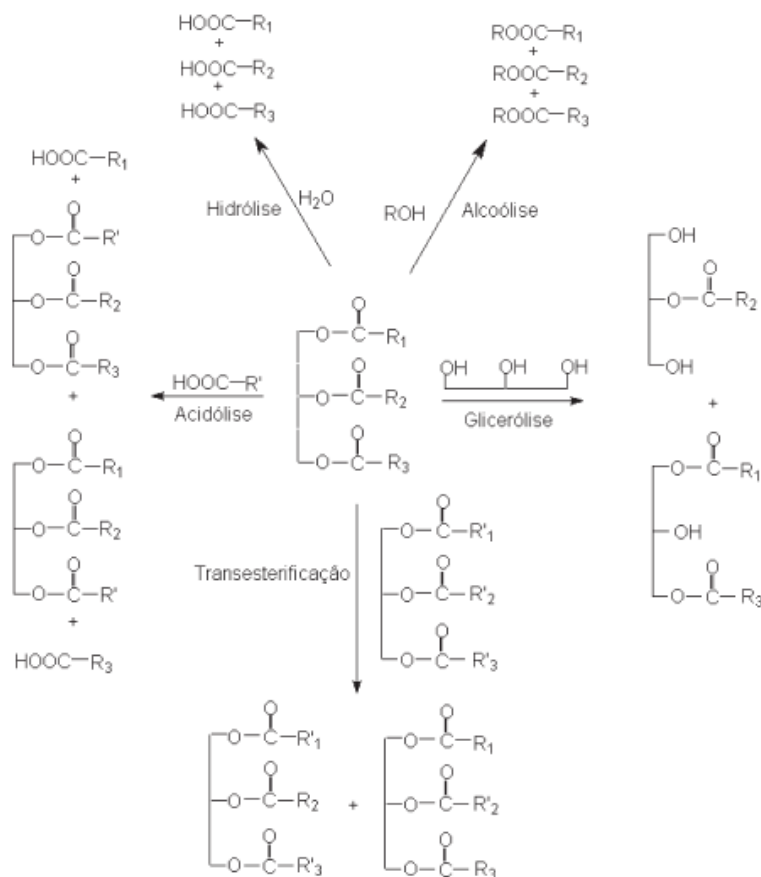


Figura 4. Representação esquemática de algumas das atividades catalisadas por lipases (Castro *et al.*,2004).

Lipases são enzimas ubíquas indispensáveis para a bioconversão de lipídeos (triacilgliceróis) em um organismo. Em eucariotos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios incluindo a digestão, absorção e

reconstituição de gorduras e o metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas nos tecidos de reserva de energia (Sharma *et al.*, 2001). Embora presentes em toda a flora e fauna da Terra é na microbiota que compreende as bactérias, os fungos e as leveduras que as lipases são encontradas mais abundantemente (Pandey *et al.*, 1999).

Em adição ao seu significado biológico, as lipases têm um grande potencial industrial. Pesquisas têm sido realizadas com lipases de plantas, animais e microbianas. Apesar de tradicionalmente as lipases pancreáticas terem sido usadas para variados propósitos, está bem estabelecido que as lipases microbianas são preferidas para aplicações industriais devido à sua flexibilidade de reação, fácil extração e fonte de suprimento ilimitado (Saxena *et al.*, 1999).

As lipases encontram promissoras aplicações industriais (Tabela 2), dentre elas, no processamento de químicos orgânicos, formulação de detergentes, síntese de biossurfactantes, indústria química de óleos, indústria de laticínios, indústria agroquímica, produção de papel, nutrição, cosméticos, processamento de fármacos e na indústria do couro. O desenvolvimento de tecnologias baseadas em lipases para a síntese de novos compostos está rapidamente expandindo o uso e a demanda destas enzimas. Um fator limitante é a falta de lipases com características específicas necessárias para um determinado processo (Sharma *et al.*, 2001). Na natureza, as lipases disponíveis das diversas fontes têm considerável variação em especificidade. Algumas lipases possuem afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (acético, butírico, cáprico, capríco, caprílico, etc.), outras possuem preferência por ácidos graxos não-saturados (oléico, linoléico, linolênico, etc.), enquanto muitas

outras são não-específicos e randomicamente hidrolisam os triglicerídeos à ácidos graxos (Saxena *et al.*, 1999).

No entanto, o número de lipases disponíveis tem aumentado consideravelmente. Isso é principalmente um resultado dos enormes avanços feitos em clonagem, expressão e produção de enzimas de microrganismos. É possível que

Tabela 2. Aplicação industrial de lipases microbianas.

Indústria	Ação
Detergentes	Hidrólise de gorduras para remoção de manchas de óleos de tecidos
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite, maturação do queijo e modificação da gordura de manteiga para o desenvolvimento de agentes aromatizantes
Padarias	Melhoramento do sabor e da qualidade e prolongação do tempo de prateleira
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação por remoção de lipídeos
Molhos para alimentos	Melhoramento da qualidade de maioneses, molhos e cremes
Alimentos saudáveis	Transesterificação para tornar alimentos mais saudáveis
Carne e peixes	Desenvolvimento de aroma e remoção de gorduras, principalmente para embutidos
Indústrias de gorduras e óleos	Hidrólise e transesterificação de manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos
Químicos	Enantiosseletividade e síntese de compostos quirais puros

Fármacos	Transesterificação e hidrólise para produzir lipídios específicos e auxiliar no processo digestivo
Cosméticos	Síntese em emulsificadores e hidratantes
Couro	Desengordurante da pele dos animais
Papel	Papel de melhor qualidade e remoção de depósitos de piche
Limpeza	Remoção de gorduras

Adaptado de Sharma *et al.*, 2001.

mais de 1000 diferentes substâncias tenham sido resolvidas eficientemente através da utilização de lipases. Em adição, muitos processos industriais baseados na catálise de lipases foram estabelecidos. Em termos de valor de produto, os processos de larga escala (aproximadamente 2000 toneladas ao ano operadas pela BASF (Ludwigshafen, Alemanha)) para a resolução cinética de aminas, provavelmente representam o exemplo mais notável de sucesso industrial (Bornscheuer *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, a maior aplicação comercial de lipases é a indústria de detergentes para lavanderia. As enzimas para detergentes constituem aproximadamente 32% do total da venda de lipases. Estima-se que 1000 toneladas de lipases são adicionadas a aproximadamente 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos por ano (Jaeger & Reetz, 1998).

Na indústria da síntese química, a aplicação das lipases como catalisadores em síntese orgânica também é muito vantajosa. Já que o catalisador é sempre um fator oneroso em uma síntese química, estratégias para a reciclagem de enzimas têm sido desenvolvidas. Estratégias sintéticas envolvendo lipases microbianas

podem ser utilizadas para preparar moléculas de alta pureza posicional e configuracional. As lipases podem ser utilizadas para criar análogos biologicamente ativos de moléculas mensageiras que existem naturalmente como antagonistas e inibidores de sistemas biológicos (Saxena *et al.*, 1999).

Apenas na última década as lipases ganharam importância, até certo ponto, sobre as proteases e amilases (Saxena *et al.*, 1999). A expectativa é que, no futuro, as lipases sejam tão importantes quanto hoje são as proteases e as amilases (Sharma *et al.*, 2001).

Várias características fazem das lipases enzimas atrativas. Em primeiro lugar, as lipases estão disponíveis em grandes quantidades já que muitas delas podem ser produzidas por microrganismos. Não necessitam de cofatores, nem catalisam reações secundárias e ainda oferecem boa estabilidade. Usualmente possuem uma refinada quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade. A estrutura cristalográfica de muitas lipases já foi resolvida, facilitando consideravelmente o desenho de estratégias de engenharia (Jaeger & Eggert, 2002). Além disso, os processos catalisados por lipases oferecem maior custo-benefício, em comparação com os processos tradicionais nos quais a energia consumida e os produtos tóxicos resultantes podem muitas vezes apresentar problemas (Pandey *et al.*, 1999).

Pertencentes ao grupo das serino hidrolases, as lipases (triacylglycerol hydrolases; EC 3.1.1.3) hidrolisam ou sintetizam os triglicerídeos na interface água-lipídio. A quantidade de água na mistura de reação vai determinar a direção da reação catalisada pela lipase. Enquanto na ausência de água ou na sua presença em quantidades traço a esterificação e a formação de glicerídeos a partir de ácidos

graxos e glicerol são favorecidas, na presença de excesso de água a sua hidrólise acontece (Saxena *et al.*, 1999).

A notável característica de atuar na interface água-lipídio diferencia as lipases das esterases, que apenas hidrolisam substratos solúveis em água. A maioria das lipases mostra um fenômeno chamado ativação interfacial. Este conceito vem do fato de que a sua atividade catalítica geralmente depende do estado de agregação dos substratos, ou seja, alta atividade catalítica é observada somente na fase hidrofóbica, numa gota de lipídio dispersa na água ou em um solvente orgânico. Este fenômeno tem sido relacionado a um oligopeptídeo hidrofóbico (uma tampa) que cobre a entrada do sítio ativo. Em um ambiente hidrofóbico, este oligopeptídeo desmascara o sítio ativo que sofre uma estruturação através de mudanças conformacionais, permitindo a entrada e a ligação do substrato. Assim, a atividade de lipase depende da disponibilidade da superfície. Exceções à ativação interfacial ocorrem em lipases de *Pseudomonas glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antarctica*, mas todas essas lipases contêm um oligopeptídeo menor (Pandey *et al.*, 1999; Bornscheuer *et al.*, 2002).

A maioria das lipases utilizadas é extracelular de origem microbiana e produzida principalmente pelo processo de cultivo submerso, embora métodos de cultivo sólido (Germano *et al.*, 2003) também podem ser utilizados. Culturas com células imobilizadas (Balcão *et al.* 1996; Betigeri & Neau, 2002) também têm sido utilizadas em alguns casos. Muitos estudos têm sido feitos para definir as condições ótimas para produção de lipase em cultura submersa. A produção de lipase é influenciada pelo tipo e pela concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pelo

pH da cultura, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido. As fontes lipídicas de carbono parecem ser essenciais para obter uma alta produção de lipase, embora alguns autores tenham conseguido uma boa produção na ausência de gorduras e óleos (Sharma *et al.*, 2001).

Devido à facilidade de produção, as lipases permitem a produção de extratos brutos de enzimas de baixo custo. Entretanto, essas preparações podem sofrer variações entre os lotes, especialmente no caso dos fungos, que podem produzir isoformas de enzimas em quantidades variáveis dependendo das condições de cultivo. Técnicas modernas de engenharia genética facilitam a produção econômica de enzimas puras e a preparação de enzimas sob medida para aplicações específicas (Schmidt-Dannert *et al.*, 1998). Contudo, pesquisas com lipases de espécies de *Pseudomonas* determinaram que estas enzimas necessitam da assistência funcional de aproximadamente 30 diferentes proteínas celulares antes de serem recuperadas do sobrenadante das culturas em um estado enzimaticamente ativo, o que indica que a conformação e a secreção das lipases são processos altamente específicos que normalmente não estão presentes em hospedeiros heterólogos (Jaeger & Eggert, 2002).

Em 1994, a Novo Nordisk introduziu a primeira lipase recombinante comercial 'Lipolase', que se originou do fungo *Thermomyces lanuginosus* e foi expressada em *Aspergillus oryzae*. Em 1995, duas lipases bacterianas foram introduzidas - 'Lumafast' de *Pseudomonas mendocina* e 'Lipomax' de *Pseudomonas alcaligenes* - pela Genencor Internacional (Jaeger e Reetz, 1998).

Nos últimos dez anos, as seqüências e estruturas de muitas lipases de mamíferos e microbianas têm sido elucidadas e depositadas em bases de dados, como a EMBL, *Swiss Prot* e *Protein Data Bank*. Adicionalmente, as propriedades físico-químicas e especificidade de substratos de muitas lipases têm sido publicadas. Com a descrição dos modelos dos sítios de ligação dos ácidos graxos nas lipases, essas bases de dados ajudarão a selecionar a lipase mais adequada para uma determinada reação específica e, se necessário aperfeiçoá-la através de mutagênese (Schmidt-Dannert *et al.*, 1998).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto é a formulação de um produto biológico, constituído por lípase, para a aplicação na indústria do couro. Este produto, de origem natural e biodegradável, substituiria os tensoativos atualmente em uso nos curtumes melhorando a qualidade do produto final e minimizando as cargas poluentes ao meio ambiente.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Isolar microrganismos no curtume;
- 2) Selecionar e identificar os microrganismos isolados que produzem enzimas lipolíticas;
- 3) Otimizar os processos de cultivo dos microrganismos para produção de lipase em escala laboratorial;

- 4) Testar a viabilidade da utilização da lipase produzida no processo de curtimento;
- 5) Comparar a eficiência da enzima com a formulação química e com as enzimas importadas atualmente em uso;
- 6) Aplicar a enzima produzida no processamento de couros em curtume piloto e realizar a caracterização físico-química dos couros obtidos conforme as normas da ABNT.

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismos

4.1.1. Isolamento

Os microrganismos utilizados foram isolados em um curtume localizado no município de Portão no estado do Rio Grande do Sul. Placas de Petri contendo o meio de cultura MYG (0,5% de extrato de malte (p/v), 0,25% de extrato de levedura (p/v), 1% de glicose (p/v) e 2% de ágar (p/v)) foram distribuídas pela barraca (Figura 5) local onde as peles que chegam ao curtume são armazenadas. Algumas placas receberam gotas do sobrenadante da operação de remolho (Figura 6) ou pedaços de couro retirados da barraca.

Estas placas foram incubadas à 28°C por até 10 dias e observadas diariamente quando novas colônias microbianas em desenvolvimento sempre eram isoladas para placas individuais.

4.1.2. Manutenção das culturas

Para estocagem os microrganismos foram cultivados em tubos contendo meio Sabouraud (2% de glicose (p/v), 1% de peptona (p/v), 2% de agar (p/v); pH 5,0) para



Figura 5. Barraca. Local onde as peles que chegam ao curtume são armazenadas. As peles que estão na barraca encontram-se sempre conservadas por salga.



Figura 6. Fulão para experimentos de um curtume com pele em processo de depilação.

as leveduras, ou meio LB (1% de triptona (p/v), 5% de extrato de levedura (p/v), 1% NaCl (p/v), 2% de ágar (p/v); pH 7,0) para as bactérias, e mantidos à 4°C. Estes microrganismos eram periodicamente repicados ou re-isolados das culturas onde a produção de lipase era induzida.

4.1.3. Identificação dos Microrganismos Isolados

Os microrganismos selecionados foram primeiramente identificados quanto à forma e afinidade tintorial, através da técnica de coloração de Gram e microscopia óptica utilizando lentes oculares com aumento de 10X e lentes objetivas com aumento de 40X. Posteriormente, as bactérias foram identificadas por testes bioquímicos segundo Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1994) e submetidas ao sequenciamento do gene 23S rDNA.

As leveduras foram fenotipicamente caracterizados por testes padrões morfológicos e fisiológicos (Yarrow,1998). A identificação das leveduras foi realizada de acordo com Barnett *et al.* (2000) e o software YEASTCOMPARE (C. Ciriello e M.A. Lachance, Copyright ® 1999-2001), que compara as características fisiológicas das leveduras com as de espécies conhecidas. Esta identificação foi realizada no Departamento de Microbiologia da UFRGS por Alexandre Fuentefria orientado pela Profa. Patrícia Valente.

4.1.4. Coloração de Gram

Para coloração um esfregaço da cultura a ser corada foi flambado para a fixação dos microrganismos à lâmina. Esta foi então exposta a Cristal Violeta (1% de

violeta genciana (p/v), 2% de ácido fênico (p/v), 10% de etanol 95% (v/v)) por 1 minuto, lavada com água destilada, exposta a Lugol (1% de iodo metálico (p/v), 2% de iodeto de potássio (p/v)) por 1 min, lavada com álcool acetona (30 mL de acetona e 70 mL de etanol 95%) e água, exposta à Fucsina (1% de fucsina (p/v), 10% de álcool 95% (v/v), 5% de ácido fênico (p/v)) por 30 seg e novamente lavada com água. Após a secagem a lâmina foi observada ao microscópio óptico para identificação morfológica dos microrganismos (Bier, 1975).

4.1.5. Coloração de endósporos

Para coloração um esfregaço da cultura a ser corada foi flambado para a fixação dos microrganismos à lâmina. A amostra fixada foi coberta com verde malaquita (solução aquosa 5%) por 3 a 6 min, esquentando-se a lâmina numa chama de um bico de Bunsen. A amostra foi então coberta com safranina (solução aquosa 0,5%) por 30 seg. As lâminas coradas foram analisadas por microscopia óptica.

4.1.6. Produção de catalase

O isolado foi cultivado por incubação a 37°C, por 24 h em ágar nutritivo (1% de peptona (p/v), 0,3% de extrato de carne (p/v) e 1,5% de agar, pH 7,0). Após este período gotas de uma solução de H₂O₂ a 3% foram adicionadas sobre as colônias e a formação de bolhas de oxigênio observadas (MacFaddin, 1999).

4.1.7. Teste do meio SIM (Gás-sulfídrico, indol e motilidade)

No meio de cultura SIM em tubos de ensaio (0,3% de extrato de carne (p/v), 1% de peptona (p/v); 1% de tripticase, 0,002% de sulfato ferroso amoniacal (p/v), 0,02% de tiosulfato de sódio (p/v), 0,5% de cloreto de sódio (p/v) e 0,4% de agar (p/v)) os isolados foram inoculados em picada de modo a não ultrapassar 2/3 da altura da coluna. Os isolados foram então cultivados durante 24 h a 37°C. Ao final do período o Reativo de Braun-Silbersten (5 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído, 50 mL de álcool metílico e 10 mL de ácido orto-fosfórico) foi gotejado sobre a cultura (MacFaddin, 1999).

4.1.8. Teste de desaminação da Fenilalanina

O isolado foi cultivado por incubação a 37°C, por 24 h em meio contendo 0,2% de DL-fenilalanina (p/v), 0,3% de extrato de levedura (p/v), 0,5% de cloreto de sódio (p/v), 0,1% de fosfato dissódico e 1,2% de agar (p/v), pH 7,3. Posteriormente, foi utilizado o reagente para revelação (solução aquosa de cloreto férrico a 10%) (MacFaddin, 1999).

4.1.9. Teste Voges-Proskauer (VP)

O isolado foi cultivado por incubação a 37°C, por 24 h em meio contendo 0,5% de peptona (p/v), 0,5% de glicose (p/v), 0,5% de tampão fosfato de potássio 100 mM (v/v), pH 7,0. Para este teste foi utilizado o Reativo de Barrit (solução A: 5% de α -

naftol em etanol absoluto; solução B: 40% de hidróxido de potássio) (MacFaddin, 1999).

4.1.10. Teste da liquefação da gelatina

Foram inoculados 10 µL de uma cultura cultivada em caldo nutritivo (1% de peptona (p/v), 0,3% de extrato de carne (p/v), pH 7,0) por 12 h, sobre uma placa de Petri contendo o meio de crescimento: 1,5% de peptona de caseína (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v), 0,2% de glicose (p/v), 0,25% de cloreto de sódio (p/v), 0,075% agar (p/v), 5% de gelatina (p/v)) com pH 7,0. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h (MacFaddin, 1999).

4.1.11. Hidrólise de amido

O isolado foi cultivado em meio de cultura ágar nutritivo acrescido de 1% de amido solúvel pH 6,8-7,0. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após este período as zonas de degradação foram reveladas submetendo-se as placas a vapores de iodo metálico (MacFaddin, 1999).

4.1.12. Teste de Urease

O isolado foi cultivado em meio de cultura contendo 0,1% de peptona (p/v), 0,5% de cloreto de sódio (p/v), 0,1% de glicose (p/v); 0,2% de potássio fosfato monobásico (p/v), 0,0012% de vermelho de fenol (p/v) e 2% de uréia (p/v) e incubado por 96 h a 37°C. A observação foi feita em intervalos de 24 h (MacFaddin, 1999).

4.1.13. Teste de assimilação de fontes de carbono

Esse teste baseou-se na capacidade de assimilação das bactérias nas respectivas fontes de carbono a 1%: L-arabinose, D-xilose, manitol, maltose, sacarose e glicose. A habilidade ou não de assimilar diferentes açúcares permite a separação das espécies de acordo com o seu padrão de assimilação.

O teste foi realizado em tubos contendo meio de cultura (1% de peptona (p/p), 0,5% de cloreto de sódio (p/p), 1% de glicose (p/p) e 1% de indicador de Andrade (p/v), pH entre 7,2 a 7,6) e as fontes de carbono esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μm e adicionadas após a autoclavação do meio. Os tubos foram inoculados com 10 μL de uma cultura crescida por 24 h em caldo nutritivo (MacFaddin, 1999).

4.1.14. Teste de utilização do citrato de sódio

O isolado foi incubado no meio de cultura contendo 0,5% de cloreto de sódio (p/v), 0,02% de sulfato de magnésio (p/v), 0,1% de fosfato diácido de amônio (p/v), 0,1% de fosfato monoácido de potássio (p/v), 0,2% de citrato de sódio (p/v), 4% de azul de bromofenol (v/v) e ágar 2%, a 37°C durante 96 h. A observação foi feita em intervalos de 24 h (MacFaddin, 1999).

4.1.15. Teste de crescimento a 55°C

Os isolados foram inoculados em meio LB e incubados a 55°C. Ao final de 24 h foi verificado se houve crescimento microbiano.

4.1.16. Teste de tolerância a NaCl 2% e 5%

Os isolados foram inoculados em meio LB acrescido de 2% ou 5% de NaCl e incubados a 37°C. Após 24 h de incubação foi verificado se houve crescimento microbiano.

4.1.17. Seqüenciamento do gene 23S rDNA das culturas bacterianas

As culturas bacterianas do gênero *Bacillus* também foram submetidas a identificação através do seqüenciamento de um fragmento do gene 23S rDNA. Para tal os microrganismos foram cultivados em placa de Petri contendo o meio de cultura LB. Com uma alça de platina, uma colônia de cada microrganismo foi retirada da placa e diluída em água MiliQ estéril. Estas amostras foram fervidas por 10 min e centrifugadas por 10 min a 6000 rpm em microcentrífuga Eppendorf. O sobrenadante obtido foi utilizado como molde para amplificação por PCR (30 ciclos de 5 min a 94°C, 45 s a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C) com os oligonucleotídeos MS37 (5´AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCA 3´) e MS38 (5´CCCGACAAGGAATTCGCTACCTTA 3´) (Kotilainen *et al.*, 1998). Os produtos de PCR resultantes, de aproximadamente 850 pb cada, foram purificados com o “kit” GFX (Amersham Pharmacia Biotech) e seqüenciados com o “kit Dyenamic ET Dye

Terminator cycle” no sistema de análise de DNA MegaBace (*Amersham Pharmacia Biotech*).

O programa *PHRED* foi utilizado para aferição da qualidade das seqüências analisadas (Ewing *et al.*,1998). As seqüências resultantes foram submetidas ao *GenBank* utilizando o programa Blastn (Altschul *et al.*, 1997).

4.2. Condições de crescimento para produção de lipase

Colônias isoladas dos microrganismos foram assepticamente transferidas com alça de platina para frascos Erlenmeyers e incubadas em meio de cultura à 36°C até atingirem uma densidade óptica equivalente a 1 a 600 nm (aproximadamente 24 h de incubação). Para as leveduras o meio de cultura utilizado foi Sabouraud e para as bactérias LB. Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo (10% v/v) em frascos Erlenmeyers contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal (0,5% de peptona (p/v), 0,1% de potássio fosfato dibásico (p/v), 0,01% de sulfato de magnésio (p/v), 0,2% de glicose (p/v); pH 8,0). Após esterilização em autoclave, foram adicionados assepticamente 2% de gordura animal (v/v), previamente esterilizada por calor seco (180°C por 60 min). Inicialmente também foi testada a adição de 2% de goma arábica (p/v) ao meio de cultura. Nos experimentos de seleção dos microrganismos, após o final do tempo de cultivo, 0,5% de Triton X-100 era adicionado ao cultivo, que era mantido sob agitação por mais 16 h. Todas as culturas foram incubadas em agitadores orbitais operando a 200 rpm.

Para determinação do tempo ideal de cultivo, a cada intervalo de 24 h, amostras eram coletadas e a atividade lipolítica era mensurada. A determinação do pH e temperatura ideal para o crescimento foi realizada simultaneamente. O pH era

ajustado ao início de cada cultivo utilizando-se soluções de 0,1 M à 1 M de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio e as temperaturas foram mantidas estáveis durante todo o período de incubação.

Nos experimentos com surfactantes foram utilizados SDS, Triton X-100 e tensoativo MK IV TP (MK Química do Brasil Ltda, Anexo 1), todos em uma concentração de 0,25%. Os surfactantes foram adicionados no início ou no final do cultivo conforme o experimento. Quando adicionados ao final do cultivo foram mantidos em agitação por 30 min ou 16 h. Os surfactantes foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm .

4.3. Ensaios enzimáticos

Para os ensaios enzimáticos e determinação de proteínas totais foram utilizados os sobrenadantes das culturas centrifugados a 5.000 rpm por 10 min.

4.3.1. Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase do sobrenadante da cultura foi determinada utilizando *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP - Sigma) como substrato. Uma solução de 30 mg de pNPP, dissolvido em 10 mL de isopropanol foi emulsificada em 90 mL de tampão 50mM Tris HCl pH 8,0, contendo 400 mg de Triton X-100 e 100 mg de goma arábica. Uma alíquota de 100 μL da enzima foi misturada a 900 μL da emulsão contendo pNPP e a absorbância foi medida espectrofotometricamente a 410 nm. Um branco era sempre utilizado com o tampão substituindo o sobrenadante de cultura contendo a enzima. Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada uma curva padrão com *p*-

nitrofenol diluído em água destilada a diferentes concentrações entre 0,01 e 0,09 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ (v/v). Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNPP por h (Maia *et al.*, 2001).

A atividade específica de lipase foi considerada a razão entre a atividade de lipase (U.mL^{-1}) e a proteína total presente na amostra ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3.2. Determinação da atividade de protease

Para a determinação da atividade de proteases foi utilizado o substrato azocaseína 2% (p/v) (Sigma). Uma solução contendo 100 μL da amostra misturados à 100 μL do substrato e 200 μL de tampão fosfato 200 mM pH 8,3 foi incubada a 50°C por 15 min e resfriada em gelo. Adicionou-se 200 μL de ácido tricloroacético 20% (p/v) e as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 7 min. A absorbância do sobrenadante da reação foi determinada por espectrofotometria a 340 nm. Um branco foi sempre utilizado e neste a adição de ácido tricloroacético foi anterior à adição da amostra. Uma unidade enzimática (U) foi definida como o valor de absorbância encontrado por mL por hora de reação (Sagorrín *et al.*, 2001).

4.4. Determinação das proteínas totais

Para quantificar as proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos utilizou-se o método de Bradford (1976). Foram adicionados 200 μL do reagente de Bradford (Protein Assay, *Bio Rad*) à 800 μL da amostra. Após agitação vigorosa a mistura de reação foi incubada à temperatura ambiente por 5 min e, a seguir, foi

efetuada a leitura da absorbância a 595 nm. Para curva-padrão foi utilizada albumina sérica bovina (BSA), dissolvida em água destilada a diferentes concentração entre 1,6 e 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (p/v).

4.5. Cultivo em biorreator

Os ensaios em batelada foram realizados em um biorreator (New Brunswick – Microfermentor® Fermentor 14) com capacidade para 14 L (Figura 7). O reator possui controles automatizados de temperatura e agitação. O volume utilizado de trabalho foi de 10 L, mantendo-se agitação de 200 rpm e aeração de 1,0 vvm. O pH utilizado foi 8,0 e a temperatura 28°C. Todos estes parâmetros foram previamente determinados nos cultivos em agitador orbital.

Para o inóculo, colônias isoladas dos microrganismos foram assepticamente transferidas para frascos Erlenmeyers e cultivadas em meio Saubouraud à 28°C e 200 rpm em um agitador orbital. Quando atingida a densidade óptica equivalente a 1 a 600 nm (aproximadamente 24 h), 600 mL desta cultura era adicionada ao reator como inóculo.



Figura 7. Biorreator utilizado. Reator New Brunswick – Microfermentor® Fermentor 14.

4.6. Consumo de glicose

Para verificar o consumo de glicose durante o cultivo em reator foi determinada a quantidade de açúcar redutor liberado. Para a reação, 100 μL do sobrenadante centrifugado foi misturado à 1 mL de DNS (1% de Ácido 2,5-dinitrossalicílico, 0,4M de NaOH e 30% de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$) (Miller, 1959). Esta mistura foi aquecida em água fervente por 3 min e a absorbância foi medida espectrofotometricamente a 550 nm. Um branco com água substituindo o sobrenadante do cultivo foi sempre utilizado. A curva padrão foi preparada utilizando-se glicose diluída em água em diferentes concentrações entre 10 e 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

4.7. Determinação do crescimento da cultura

Para estimar o crescimento da cultura, alíquotas de 1 mL foram centrifugadas (10 min, 5000 rpm), as células ressuspendidas em água destilada e a sua densidade óptica a 600 nm verificada. Um branco com apenas água destilada foi utilizado.

4.8. Testes de estabilidade da enzima aos processos de curtimento

Para testar a estabilidade da lipase nos processos de curtimento em que a enzima será aplicada, o cultivo foi submetido à ação dos agentes aplicados nas etapas do processo nas quais a enzima será utilizada. Para simular o processo de remolho de peles salgadas foram adicionados 10 mL de água utilizada no curtume e 0,5% ou 1% de NaCl a 10 mL do cultivo centrifugado (5000 rpm por 10 min). Estas soluções foram mantidas em agitador orbital de plataforma operando a 100 rpm e 28°C durante 6 h. Amostras foram coletadas a cada duas horas de incubação. Para simulação do processo de caleiro e depilação, 10 mL de água utilizada no curtume, 3% de Cal e 1,5% de Na₂S foram adicionados a 10 mL do cultivo centrifugado (5000 rpm por 10 min). As soluções foram mantidas em agitador orbital de plataforma operando a 100 rpm, 28°C durante 12 h. As amostras foram coletadas em 4, 6 e 12 h de incubação. Como controle, em ambos experimentos, 10 mL de água destilada foram adicionadas a 10 mL do cultivo e esta solução foi mantida nas mesmas condições dos experimentos.

4.9. Experimentos práticos em curtume

Para os experimentos práticos no curtume o extrato enzimático total do cultivo foi filtrado com filtro de tecido de polietileno malha 50 (Processo Industrial) para diminuir a quantidade de gordura no sobrenadante. Este extrato bruto foi utilizado na operação de remolho de peles verdes adicionado à formulação recomendada ao processo, diminuindo em 90% o volume de tensoativo utilizado (Anexo 3). Nestes experimentos utilizamos três controles, um com a formulação para esta operação utilizada no curtume, outro com a mesma formulação utilizada no curtume, mas com um aumento da quantidade de água e o terceiro controle com a enzima lipolítica comercial (GreaseX™ 200MG, Novo Nordisk, Anexo 2) e a sua formulação recomendada. Foram medidos o pH do banho, a quantidade de óleos e graxas no banho e o índice de gordura das peles antes e depois do processo de curtimento completo. Os testes foram realizados em triplicata.

4.10. Quantificação das gorduras nas peles

As gorduras nas peles foram medidas pelo método de extração com diclorometano (CH_2Cl_2). Este método consiste em expor as peles ao diclorometano, com o objetivo de solubilizar no solvente toda a gordura presente na pele para uma destilação. Pela diferença das massas obtemos a quantidade de gordura fixada e sabendo-se a quantidade encontrada anteriormente nas peles a eficiência do

processo é obtida. O resultado é expresso em percentagem de substâncias extraíveis em diclorometano utilizando a seguinte fórmula:

$$ED = \frac{M_2 - M_1 \times 100}{MA}$$

Onde ED é o teor de substâncias extraíveis em diclorometano, em percentagem; M_1 é a massa do balão seco com resíduos, em gramas; M_2 é a massa do balão seco e vazio, em gramas; e MA é a massa da amostra, em gramas (ABNT, NBR 11.030 julho/1997).

4.11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud para as leveduras e o meio de cultura LB para as bactérias. Pequenas amostras do meio de cultura contendo uma colônia do microrganismo foram retiradas das placas e estas amostras foram fixadas “overnight” em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Em seguida, as amostras foram lavadas por 4 vezes 15 min cada em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e submetidas a desidratação em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% por 30 min cada e 2 vezes 100% por 30 min cada). Após este procedimento as amostras foram secas ao ponto crítico utilizando-se o aparelho *Critical Point Dryer* (CPD 030 Baltec), coladas com fita dupla face em suportes de alumínio (*stubs*) e levadas ao aparelho *Sputter Coater* (SCD 050 Baltec) para serem cobertas com uma película de ouro e em seguida analisados ao

microscópio de varredura Jeol JSM 5800 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

4.12.Métodos estatísticos

Todos os experimentos foram feitos em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas de acordo com o teste de Duncan. A probabilidade de erro de $\alpha=0,05$ foi considerada significativa.

5.

Resultados

5.1. Isolamento dos microrganismos

A partir do isolamento realizado no curtume foram encontrados 51 microrganismos. Através da caracterização morfológica por coloração de Gram e microscopia óptica os microrganismos foram identificados como bacilos Gram positivos e negativos, leveduras, cocos Gram positivos, fungos filamentosos, bacilocócoides Gram positivos, e cocos Gram negativos (Figura 8, Tabela 3).

5.2. Seleção dos microrganismos produtores da enzima de interesse

Para seleção dos microrganismos produtores de lipases, os isolados foram cultivados em meio podre enriquecido com gordura animal e incubados por 48 h. Também foi testada a adição de 2% de goma arábica ao meio de cultura, para verificar a sua capacidade emulsionante sobre a gordura do meio de cultura. Ao final, o sobrenadante de todos os cultivos foi analisado quanto à produção de lipase.

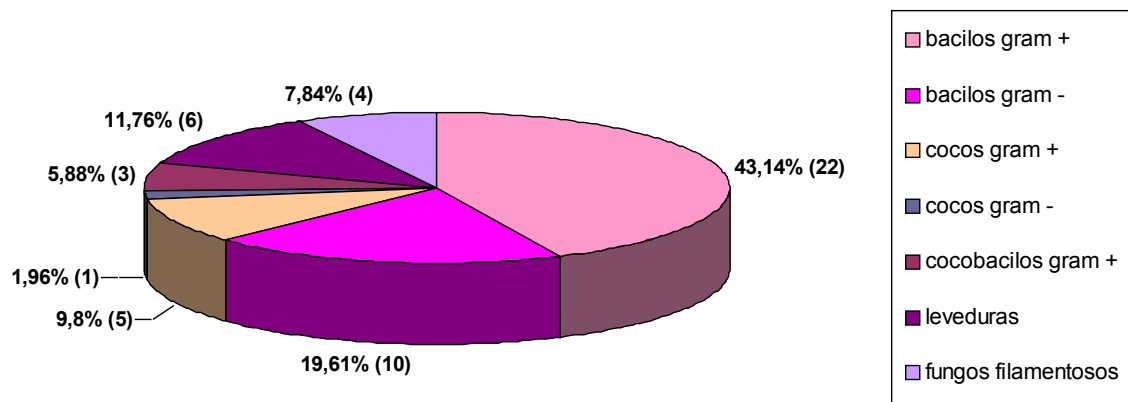


Figura 8. Distribuição dos microrganismos isolados no curtume. Entre os parênteses encontra-se o número de isolados de cada categoria.

Tabela 3. Análise da produção de lipase dos microrganismos isolados no curtume.

<i>Microrganismos isolados</i>	<i>Lipase (U.mL-1)* Meio de cultura com goma arábica</i>	<i>Lipase (U.mL-1)* Meio de cultura sem goma arábica</i>	<i>Características morfológicas dos isolados</i>
<i>Metarhizium</i>			
<i>anisopliae</i>	0	1,003 ± 0.0509	Fungo filamentoso
Isolado 1	0.548 ± 0.0078	0	Bacilo gram +
Isolado 2	0.013 ± 0.0389	0	Bacilo gram -
Isolado 3	2.079 ± 0.0474	1,034 ± 0.0113	Bacilo gram +
Isolado 4	0	0	Bacilo gram -
Isolado 5	0	0	Bacilo gram -
Isolado 6	0	0	Cocos gram +
Isolado 7	0	0,262 ± 0.0170	Cocos gram +
Isolado 8	0	0	Cocobacilo gram+
Isolado 9	0	0	Bacilo gram +
Isolado 10	0	0	Bacilo gram -
Isolado 11	0	0	Bacilo gram -
Isolado 12	0	0,171 ± 0.0289	Bacilo gram +
Isolado 13	0	0,382 ± 0.3390	Bacilo gram +
Isolado 14	0.135 ± 0.0361	0,011 ± 0.0007	Cocos gram +
Isolado 15	0.445 ± 0.0841	0	Cocobacilo gram+
Isolado 16	0.133 ± 0.1407	0,005 ± 0.0049	Bacilo gram +
Isolado 17	0.310 ± 0.0233	0	Bacilo gram -
Isolado 18	0.353 ± 0.0622	0	Levedura
Isolado 19	0.298 ± 0.0014	0,067 ± 0.0438	Bacilo gram -

Isolado 20	0.347 ± 0.0297	0	Levedura
Isolado 21	0.782 ± 0.0622	0,918 ± 0.1245	Bacilo gram +
Isolado 22	0.410 ± 0.0573	0,491 ± 0.0064	Bacilo gram +
Isolado 23	0	0,253 ± 0.0113	Bacilo gram -
Isolado 24	0	0,336 ± 0.0205	Bacilo gram +
Isolado 25	2.280	0,405 ± 0.0042	Coco gram -
Isolado 26	0	0	Bacilo gram +
Isolado 27	0	0,135 ± 0.0035	Bacilo gram +
Isolado 28	0	0	Levedura
Isolado 29	1.688 ± 0.2284	0	Bacilo gram +
Isolado 30	10.585 ± 0.0283	29,470 ± 0.0127	Levedura
Isolado 31	0	0,019	Cocos gram -
Isolado 32	2.418 ± 0.0424	0,223 ± 0.0042	Bacilo gram +
Isolado 33	1.668 ± 0.0707	2,230 ± 0.0262	Bacilo gram +
Isolado 34	0	2,593 ± 0.0014	Levedura
Isolado 35	0	0,197	Fungo filamentososo

*A atividade de lipase do sobrenadante da cultura foi determinada utilizando p-nitrofenilpalmitato (pNPP) como substrato.

Dos 35 microrganismos analisados, oito apresentaram uma produção enzimática satisfatória (Tabela 3). Estes isolados foram previamente identificados como 3, 21, 25, 29, 30, 32, 33 e 34 de acordo com o isolamento.

5.3. Identificação dos microrganismos selecionados

Os microrganismos selecionados foram previamente analisados por microscopia óptica quanto à forma e afinidade tintorial através da técnica de coloração de Gram. Os isolados 30 (Figura 9A e 9C) e 34 foram identificados como leveduras; os isolados 3 (Figura 9B e 9D), 21, 29, 32 e 33 foram identificados como bacilos Gram positivos e o isolado 25 foi identificado como coco Gram negativo.

Depois de identificados morfologicamente os microrganismos foram submetidos aos testes bioquímicos para determinação dos gêneros e espécies. Os resultados dos testes encontram-se na Tabela 4. Os isolados 3, 25 foram identificados como *Bacillus cereus* e *Proteus* sp., respectivamente. Os resultados encontrados para os isolados 29, 32 e 33 foram inconclusivos, já que apenas referiam para o gênero *Bacillus*. Para identificação destes microrganismos, o gene 23S rDNA foi amplificado e seqüenciado. Através da comparação dessas seqüências com as seqüências encontradas no GenBank os microrganismos 32 e 33 foram identificados como *B. subtilis* (Figura 10A e 10B) e o microrganismo 29 foi identificado como *B. licheniformis* (Figura 10C).

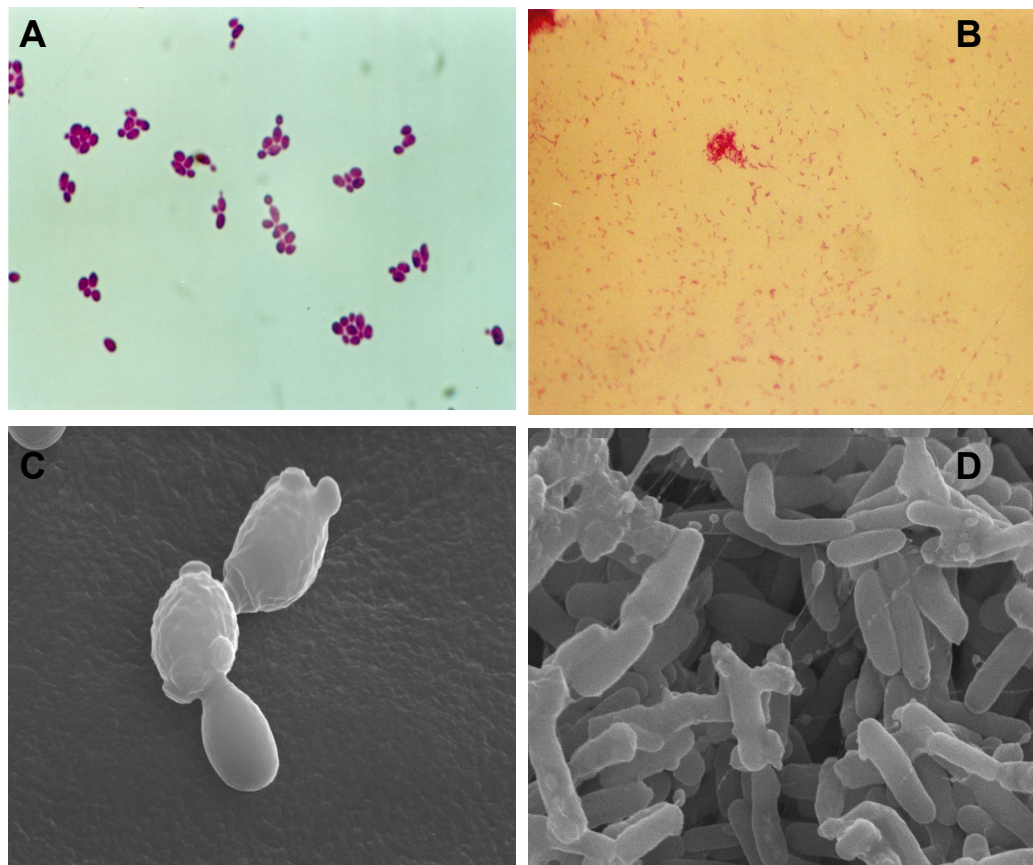


Figura 9. Microscopia óptica (A e B) e microscopia eletrônica de varredura (C e D) de dois dos microrganismos isolados. A e C – Isolado 39 (*Pichia pastoris*) em aumento de 400X e 10.000X, respectivamente. B e D – Isolado 3 (*B. cereus*) em aumento de 400X e 10.000X, respectivamente. Para as micrografias ópticas os microrganismos foram submetidos à coloração de Gram. As micrografias eletrônicas foram realizadas no Centro de Microscopia da UFRGS.

Tabela 4. Provas bioquímicas dos microrganismos isolados no curtume.

<i>Prova bioquímica</i>	<i>Isolado 3</i>	<i>Isolado 25</i>	<i>Isolado 29</i>	<i>Isolado 32</i>	<i>Isolado 33</i>
Gram	+	-	+	+	+
Endosporo	+	nd	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+
Indol	-	+	-	-	-
Gás sulfídrico	-	+	-	-	-
Desaminação da fenilalanina	-	+	-	-	-
V o g e s Proskauer	+	-	+	-	-
Gelatina	+	nd	+	+	+
Amido	+	nd	+	+	+
Uréia	-	+	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+
Arabinose	-	nd	-	-	-
Manitol	-	nd	+	+	+
Xilose	-	nd	-	-	-
Sacarose	nd	nd	+	nd	+
Citrato	-	-	-	-	-
Crescimento anaeróbio	+	nd	+	+	+
Crescimento a 55°C	+	nd	-	+	+
Maltose	nd	nd	nd	nd	-
2% NaCl	+	nd	+	+	+
5% NaCl	+	nd	+	+	+

Identificação	<i>Bacillus</i>	<i>Proteus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
	<i>cereus</i>				

nd: não determinado

A

```

*           20           *           40           *
isolado_29: TATCACCGAAGCTGCGGACTGT-CTTCGAACAGTGGTAGGACCAGCGGGA : 49
B.subtilis: TATCACCGAAGCTGCGGACTGTCTTCGAACAGTGGTAGGAG-AGCGTTC : 49
23S_B.lich: TATCACCGAAGCTGCGGACTGTCTTCGAACAGTGGTAGGAG-AGCGTTC : 49
TATCACCGAAGCTGCGGACTGTtCTTCGAACAGTGGTAGGAg aGCGttc

           60           *           80           *           100
isolado_29: TATTGGCTGTGAAGCAAGACCGGAAGGACTTGTGGAGCGCTTAGAAGTGA : 99
B.subtilis: TAAGGGCTGTGAAGCCAGACCGGAAGGACTGGTGGAGCGCTTAGAAGTGA : 99
23S_B.lich: TAAGGGCTGTGAAGCCAGACCGGAAGGACTGGTGGAGCGCTTAGAAGTGA : 99
TAagGGCTGTGAAGCcAGACCGGAAGGACTgGTGGAGCGCTTAGAAGTGA

           *           120           *           140           *
isolado_29: GAATGCCGGTATGAGTAGCGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAAT : 149
B.subtilis: GAATGCCGGTATGAGTAGCGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAAT : 149
23S_B.lich: GAATGCCGGTATGAGTAGCGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAAT : 149
GAATGCCGGTATGAGTAGCGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAAT

           160           *           180           *           200
isolado_29: GCCTAAGGTTTCCTGAGGAAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCT : 199
B.subtilis: GCCTAAGGTTTCCTGAGGAAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCT : 199
23S_B.lich: GCCTAAGGTTTCCTGAGGAAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCT : 199
GCCTAAGGTTTCCTGAGGAAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCT

           *           220           *           240           *
isolado_29: AAGCCGAGGCCGAAAGGCGTAGGCGATGGATTAACAGGTTGATATTCCTGT : 249
B.subtilis: AAGCCGAGGCCGAAAGGCGTAGGCGATGGACAACAGGTTGATATTCCTGT : 249
23S_B.lich: AAGCCGAGGCCGAAAGGCGTAGGCGATGGACAACAGGTTGATATTCCTGT : 249
AAGCCGAGGCCGAAAGGCGTAGGCGATGGAcAACAGGTTGATATTCCTGT

           260           *           280           *           300
isolado_29: ACCACCTCCTCACCATTTGAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAA : 299
B.subtilis: ACCACCTCCTCACCATTTGAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAA : 299
23S_B.lich: ACCACCTCCTCACCATTTGAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAA : 299
ACCACCTCCTCACCATTTGAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAA

           *           320           *           340           *
isolado_29: GCGCGGTATTGGATATCCGCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAA : 349
B.subtilis: GCGCGGTATTGGATATCCGCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAA : 349
23S_B.lich: GCGCGGTATTGGATATCCGCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAA : 349
GCGCGGTATTGGATATCCGCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAA

           360           *           380           *           400
isolado_29: ATCCGTTTCCCGTGAAGGCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAATATATAGTAGC : 399
B.subtilis: ATCCGTTTCCCAT-AAGGCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAATATATAGTAGC : 398

```

23S_B.lich: ATCCGTTTCCCAT-AAGGCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAATATAGTAGC : 398
ATCCGTTTCCCaT AAGGCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAaTATAGTAGC

* 420 * 440 *
isolado_29: GAAGTTCTGATTCCACACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGG : 449
B.subtilis: GAAGTTCTGATTCCACACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGG : 448
23S_B.lich: GAAGTTCTGATTCCACACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGG : 448
GAAGTTCTGATTCCACACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGG

460 * 480 * 500
isolado_29: TGCCCGTACCGCAAACCGACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTG : 499
B.subtilis: TGCCCGTACCGCAAACCGACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTG : 498
23S_B.lich: TGCCCGTACCGCAAACCGACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTG : 498
TGCCCGTACCGCAAACCGACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTG

* 520 * 540 *
isolado_29: ATCGAGAGAACTCTCGTTAAGGAACTCGGCAAAATGACCCCGTAACTTCG : 549
B.subtilis: ATCGAGAGAACTCTCGTTAAGGAACTCGGCAAAATGACCCCGTAACTTCG : 548
23S_B.lich: ATCGAGAGAACTCTCGTTAAGGAACTCGGCAAAATGACCCCGTAACTTCG : 548
ATCGAGAGAACTCTCGTTAAGGAACTCGGCAAAATGACCCCGTAACTTCG

560 * 580 * 600
isolado_29: GGAGAAGGGGTGCTCTGTTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCGAGTGAAT : 599
B.subtilis: GGAGAAGGGGTGCTCTGTTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCGAGTGAAT : 598
23S_B.lich: GGAGAAGGGGTGCTCTGTTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCGAGTGAAT : 598
GGAGAAGGGGTGCTCTGTTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCGAGTGAAT

* 620 * 640 *
isolado_29: AGGCCAGGGCGACTGTTTAGCAAAACACN-AGGTCTCTGCGAAACATAACA : 648
B.subtilis: AGGCCAGGGCGACTGTTTAGCAAAAACACAGGTCTCTGCGAAGCCGTA-A : 647
23S_B.lich: AGGCCAGGGCGACTGTTTAGCAAAAACACAGGTCTCTGCGAAGCCGTA-A : 647
AGGCCAGGGCGACTGTTTAGCAAAAaACacAGGTCTCTGCGAAgcCgTA A

660 * 680 *
isolado_29: GGCGAGGTATAGGGGCTGACGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTAAAGAGG : 696
B.subtilis: GGCGAAGTATAGGGGCTGACGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTAAAGAGG : 695
23S_B.lich: GGCGAAGTATAGGGGCTGACGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTAAAGAGG : 695
GGCGAaGTATAGGGGCTGACGCCTGCCCGGTGCTGGAAGGTAAAGAGG

B * 20 * 40 *
B.subtilis: ACGCTAAGCGCTCCTCT-TAACCTTCCAGCACCGGGCAGGCGTCAGCCCC : 49
23S_B.lich: ACGCTAAGCGCTCCTCT-TAACCTTCCAGCACCGGGCAGGCGTCAGCCCC : 49
isolado_32: ACGCTAAGTTCTCCTCT-TAACCTTCCAGCACCGGGCAGGCGTCAGCCCC : 49
ACGCTAAGcgCTCCTCT TAACCTTCCAGCACCGGGCAGGCGTCAGCCCC

60 * 80 * 100
B.subtilis: TATACTTCGCCTTAC--GGCTTCGCAGAGACCTGTGTTTTTGCTAAACAG : 97
23S_B.lich: TATACTTCGCCTTAC--GGCTTCGCAGAGACCTGTGTTTTTGCTAAACAG : 97
isolado_32: TATACTTCGCCTTACCTGGCTTCGCAGAGACCTGTGTTTTTGCTAAACAG : 98
TATACTTCGCCTTAC GGCTTCGCAGAGACCTGTGTTTTtGCTAAACAG

* 120 * 140 *
 B.subtilis: TC-GCCTGGGCCTATTCACTGCGGCTCTCTCGGGCTTGACACCCTAACAGA : 146
 23S_B.lich: TC-GCCTGGGCCTATTCACTGCGGCTCTCTCGGGCTTGACACCCTAACAGA : 146
 isolado_32: TC-GCCTGGGCCTATTCACTGCGGCTCTCTCGGGCTTGACACCCTAACAGA : 147
 TC GCCTGGGCCTATTCACTGCGGCTCTCTCGGGCTTGACACCCTAACAGA

160 * 180 * 200
 B.subtilis: GCACCCCTTCTCCCGAAGTTACGGGGTCATTTT-GCCGAGTTCCTTAAC : 194
 23S_B.lich: GCACCCCTTCTCCCGAAGTTACGGGGTCATTTT-GCCGAGTTCCTTAAC : 194
 isolado_32: GCACCCCTTCTCCCGAAGTTACGGGGTCATTTT-GCCGAGTTCCTTAAC : 195
 GCACCCCTTCTCCCGAAGTTACGGGGTCATTTT GCCGAGTTCCTTAAC

* 220 * 240 *
 B.subtilis: GAGAGTTCTCTCGATCACCTTAGGATTCTCTCCTCGCCTACCTGTGTGCGG : 244
 23S_B.lich: GAGAGTTCTCTCGATCACCTTAGGATTCTCTCCTCGCCTACCTGTGTGCGG : 244
 isolado_32: GAGAGTTCTCTCGATCACCTTAGGATTCTCTCCTCGCCTACCTGTGTGCGG : 245
 GAGAGTTCTCTCGATCACCTTAGGATTCTCTCCTCGCCTACCTGTGTGCGG

260 *
 B.subtilis: TTTGCGGTACGGGCACCTCTCACCT : 269
 23S_B.lich: TTTGCGGTACGGGCACCTCTCACCT : 269
 isolado_32: TTTGCGGTACGGGCACCTCTCACCT : 270
 TTTGCGGTACGGGCACCTCTCACCT

C

* 20 * 40 *
 isolado_33: GACTCTGCGCCGAAAATGTCCCGGGG-GTACGTATCACCGAAGCTGCGG : 49
 23S_B.lich: GACTCTGCGCCGAAAATGTACCGGGGTAAACGTATCACCGAAGCTGCGG : 50
 B.subtilis: GACTCTGCGCCGAAAATGTACCGGGGTAAACGTATCACCGAAGCTGCGG : 50
 GACTCTGCGCCGAAAATGTaCCGGGGctaaACGTATCACCGAAGCTGCGG

60 * 80 * 100
 isolado_33: ACTGTTCTTCGAACAGTGGTAGGCGAGCGGGAATTGGGCTGTGAAGCAAG : 99
 23S_B.lich: ACTGTTCTTCGAACAGTGGTAGGAGAGCGTTCTAAGGGCTGTGAAGCCAG : 100
 B.subtilis: ACTGTTCTTCGAACAGTGGTAGGAGAGCGTTCTAAGGGCTGTGAAGCCAG : 100
 ACTGTTCTTCGAACAGTGGTAGGaGAGCGttctaaGGGCTGTGAAGCcAG

* 120 * 140 *
 isolado_33: ACCGGAAGGACTTGTGGAGCGCTTAGAAGTGAGAATGCCGGTATGAGTAG : 149
 23S_B.lich: ACCGGAAGGACTGGTGGAGCGCTTAGAAGTGAGAATGCCGGTATGAGTAG : 150
 B.subtilis: ACCGGAAGGACTGGTGGAGCGCTTAGAAGTGAGAATGCCGGTATGAGTAG : 150
 ACCGGAAGGACTgGTGGAGCGCTTAGAAGTGAGAATGCCGGTATGAGTAG

160 * 180 * 200
 isolado_33: CGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAATGCCTAAGGTTTCCTGAGG : 199
 23S_B.lich: CGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAATGCCTAAGGTTTCCTGAGG : 200
 B.subtilis: CGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAATGCCTAAGGTTTCCTGAGG : 200
 CGAAAGAGGGGTGAGAATCCCCTCCACCGAATGCCTAAGGTTTCCTGAGG

* 220 * 240 *
 isolado_33: AAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGCCGAGGCCGAAAGGC : 249
 23S_B.lich: AAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGCCGAGGCCGAAAGGC : 250
 B.subtilis: AAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGCCGAGGCCGAAAGGC : 250
 AAGGCTCGTCCGCTCAGGGTTAGTCGGGACCTAAGCCGAGGCCGAAAGGC

```

                260          *          280          *          300
isolado_33: GTAGGCGATGGATTAACAGGTTGATATTCCTGTACCACCTCCTCACCATTT : 299
23S_B.lich: GTAGGCGATGGACAACAGGTTGATATTCCTGTACCACCTCCTCACCATTT : 300
B.subtilis: GTAGGCGATGGACAACAGGTTGATATTCCTGTACCACCTCCTCACCATTT : 300
                GTAGGCGATGGAcAACAGGTTGATATTCCTGTACCACCTCCTCACCATTT

                *          320          *          340          *
isolado_33: GAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAAGCGCGGTATTGGATATCC : 349
23S_B.lich: GAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAAGCGCGGTATTGGATATCC : 350
B.subtilis: GAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAAGCGCGGTATTGGATATCC : 350
                GAGCAATGGGGGGACGCAGGAGGATAGGGTAAGCGCGGTATTGGATATCC

                360          *          380          *          400
isolado_33: GCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAAAATCCGTTTCCCGTTGAAG : 399
23S_B.lich: GCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAAAATCCGTTTCCCATAAAG : 398
B.subtilis: GCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAAAATCCGTTTCCCATAAAG : 398
                GCGTCCAAGCAGTTAGGCTGGGAAATAGGCAAA TCCGTTTCCCaT AAG

                *          420          *          440          *
isolado_33: GCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAATATATAGTAGCGAAGTTCCTGATTCCAC : 449
23S_B.lich: GCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAATATATAGTAGCGAAGTTCCTGATTCCAC : 448
B.subtilis: GCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAATATATAGTAGCGAAGTTCCTGATTCCAC : 448
                GCTGAGCTGTGATGGCGAGCGAAaTATAGTAGCGAAGTTCCTGATTCCAC

                460          *          480          *          500
isolado_33: ACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGGTGCCCGTACCGCAAACC : 499
23S_B.lich: ACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGGTGCCCGTACCGCAAACC : 498
B.subtilis: ACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGGTGCCCGTACCGCAAACC : 498
                ACTGCCAAGAAAAGCCTCTAGCGAGGTGAGAGGTGCCCGTACCGCAAACC

                *          520          *          540          *
isolado_33: GACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTGATCGAGAGAACTCTCGT : 549
23S_B.lich: GACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTGATCGAGAGAACTCTCGT : 548
B.subtilis: GACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTGATCGAGAGAACTCTCGT : 548
                GACACAGGTAGGCGAGGAGAGAATCCTAAGGTGATCGAGAGAACTCTCGT

                560          *          580          *          600
isolado_33: TAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGTA ACTTCGGGAGAAGGGGTGCTCTG : 599
23S_B.lich: TAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGTA ACTTCGGGAGAAGGGGTGCTCTG : 598
B.subtilis: TAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGTA ACTTCGGGAGAAGGGGTGCTCTG : 598
                TAAGGAACTCGGC AAAATGACCCCGTA ACTTCGGGAGAAGGGGTGCTCTG

                *          620          *          640          *
isolado_33: TTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTT : 649
23S_B.lich: TTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTT : 648
B.subtilis: TTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTT : 648
                TTAGGGTGCAAGCCCGAGAGAGCCGCAGTGAATAGGCCAGGCGACTGTT

                660          *          680          *          700
isolado_33: TAGCAAAAACACAGGTCTCTGCGAAGCCATTACGCGCAAGTATAGGGGCT : 698
23S_B.lich: TAGCAAAAACACAGGTCTCTGCGAAGCCGTAAGGCGAAGTATAGGGGCT : 697
B.subtilis: TAGCAAAAACACAGGTCTCTGCGAAGCCGTAAGGCGAAGTATAGGGGCT : 697
                TAGCAAAAaCACAGGTCTCTGCGAAGCCgTaAgGCG AAGTATAGGGGCT

```

```

                *           720           *           740           *
isolado_33: GACGCCTGCCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGAGGAGCGA CTTAGCGTAGAGCG : 748
23S_B.lich: GACGCCTGCCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGAGGAGCG-CTTAGCGTA-AGCG : 745
B.subtilis: GACGCCTGCCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGAGGAGCG-CTTAGCGTA-AGCG : 745
            GACGCCTGCCCCGGTGCTGGAAGGTTAAGAGGAGCG CTTAGCGTA AGCG

                760
isolado_33: AAGGTGCGAA : 758
23S_B.lich: AAGGTGCGAA : 755
B.subtilis: AAGGTGCGAA : 755
            AAGGTGCGAA

```

Figura 10. Alinhamento das seqüências do gene rDNA 23S. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências de *B. licheniformes* (23S_B.lich) e *B. subtilis* (gene 23S e genoma). A. Isolado 29, *B. licheniformis*; B. Isolado 32, *B. subtilis* e C. isolado 33, *B. subtilis*.

5.4. Otimização dos processos de cultivo dos microrganismos

Inicialmente foi realizada uma avaliação para determinar o tempo de cultivo onde há uma maior produção de lipase. Amostras dos sobrenadantes das culturas foram coletadas a cada 24 h até completarem um total de 72 h de cultivo.

Neste período foram determinadas a atividade enzimática de lipase e a concentração de proteína total encontrada nas amostras. Os resultados deste experimento estão mostrados nas Figuras 11 e 12. Os isolados 3, *B. cereus* e 33, *B. subtilis* apresentaram o pico de produção de lipase em 24 h de cultivo, o isolado 32, *B. subtilis*, em 48 h e o isolado 30, *Pichia pastoris*, em 72 h.

Para testar a solubilização da lipase no sobrenadante da cultura foram adicionados surfactantes ao meio de cultura. Os surfactantes foram adicionados em diferentes estágios do cultivo para verificar em qual deles o efeito era mais significativo. Os resultados destes experimentos para os isolados 3, *B. cereus*, 30, *P. pastoris*, 32 e 33, *B. subtilis* estão apresentados nas Figuras 13, 14, 15 e 16, respectivamente.

Para determinar a agitação onde há maior produção de lipase por *P. pastoris* (isolado 30), duas culturas foram incubadas a 28°C, pH 8,0 por 72 h utilizando as rotações de 130 rpm e 200 rpm. Amostras foram retiradas a cada 24 h e a atividade de lipase foi mensurada. A melhor atividade de lipase foi encontrada na cultura cultivada a 200 rpm (Figura 17).

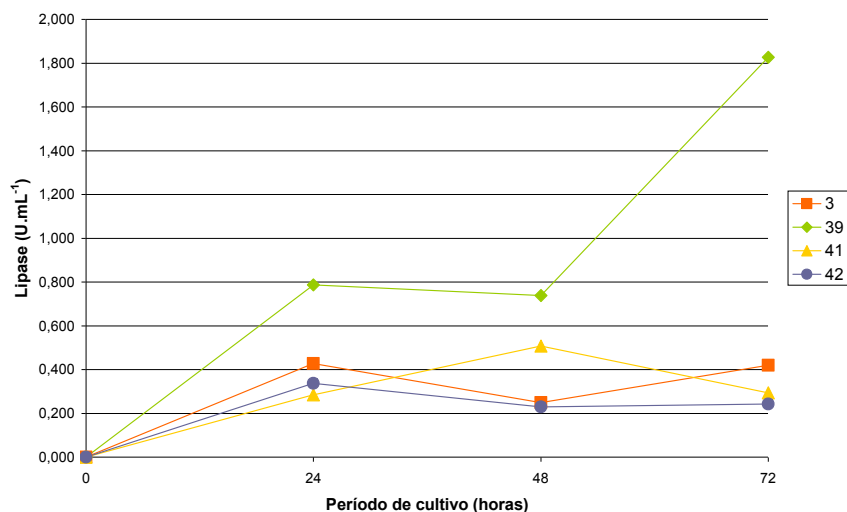


Figura 11. Análise da produção de lipase durante o cultivo dos microrganismos selecionados. (3) *B. cereus*; (30) *P. pastoris*; (32) e (33) *B. subtilis*. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal. Os ensaios foram realizados em triplicata.

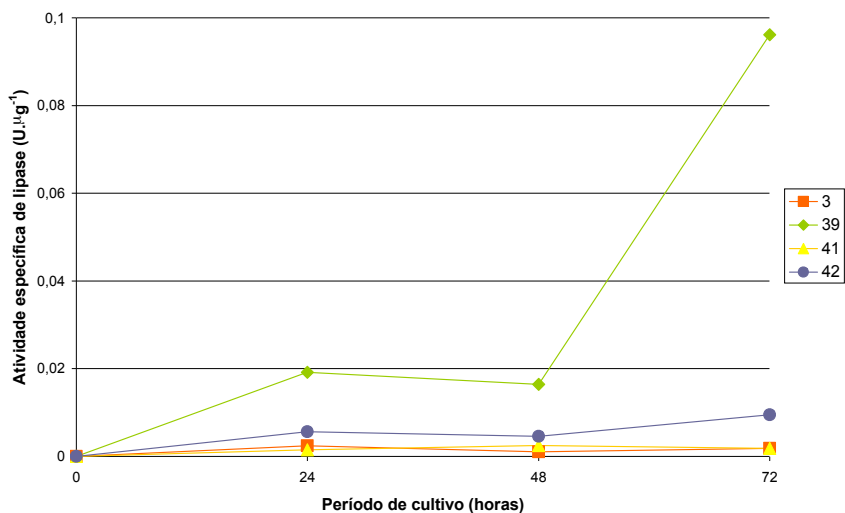


Figura 12. Atividade específica de lipase durante o cultivo dos microrganismos selecionados. (3) *B. cereus*; (30) *P. pastoris*; (32) e (33) *B. subtilis*. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal. Os ensaios foram realizados em triplicata.

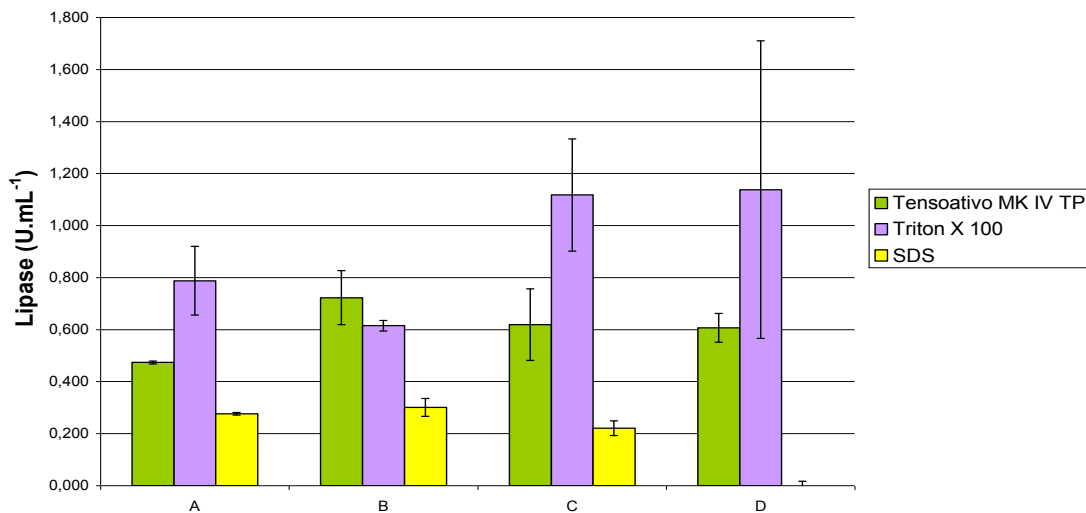


Figura 13. Efeito da adição de surfactantes na produção de lipase de *B. cereus*. (A) Cultivo de 24 h sem adição de surfactante. (B) Surfactante adicionado no início do cultivo. (C) Surfactante 30 min*. (D) Surfactante 16 h*. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal e surfactante (0,25%). Os ensaios foram realizados em triplicata.

*Ao final do cultivo (48 h) os surfactantes foram adicionados ao reator e mantidos sob agitação durante o referido tempo.

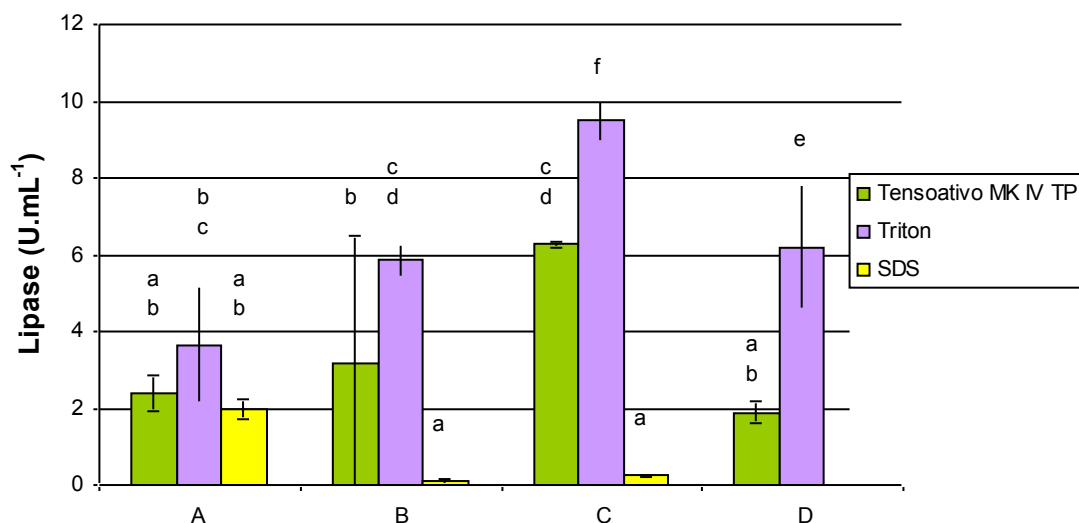


Figura 14. Efeito da adição de surfactantes na produção de lipase de *P. pastoris*. (A) Cultivo de 72 h horas sem adição de surfactante. (B) Surfactante adicionado ao inio do cultivo. (C) Surfactante 30 min*. (D) Surfactante 16 h*. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal e surfactante (0,25%). Os ensaios foram realizados em triplicata. As colunas que possuem as mesmas letras (a, b, c, d ou e) não apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$).
*Ao final do cultivo (72 h) os surfactantes foram adicionados ao reator e mantidos sob agitação durante o referido tempo.

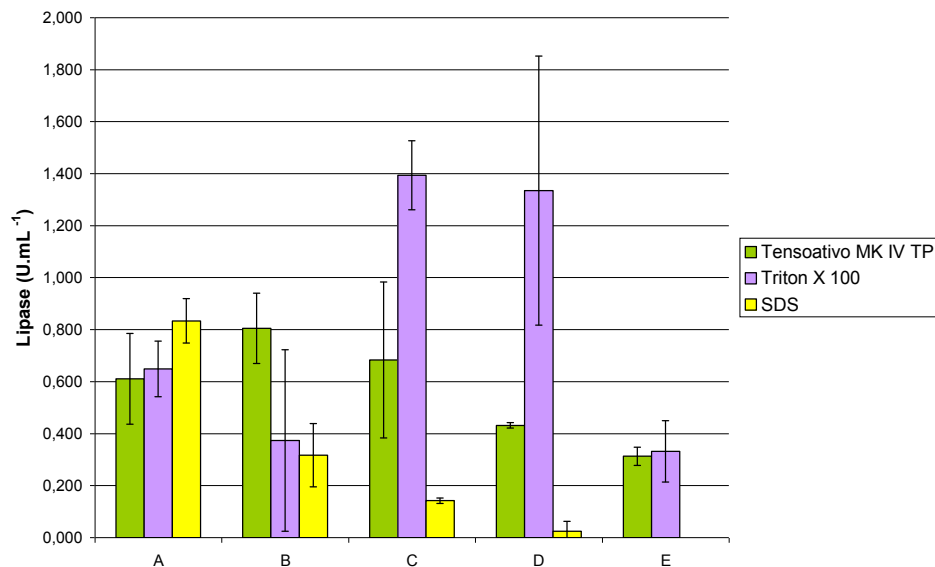


Figura 15. Efeito da adição de surfactantes na produção de lipase *B. subtilis* (isolado 32). (A) Cultivo de 24 h sem adição de surfactante. (B) Surfactante adicionado ao início do cultivo. (C) Surfactante 30 min*. (D) Surfactante 16 horas*. (E) Cultivo de 48 horas sem adição de surfactante. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal e surfactante (0,25%). Os ensaios foram realizados em triplicata.

*Ao final do cultivo (72 h) os surfactantes foram adicionados ao reator e mantidos sob agitação durante o referido tempo.

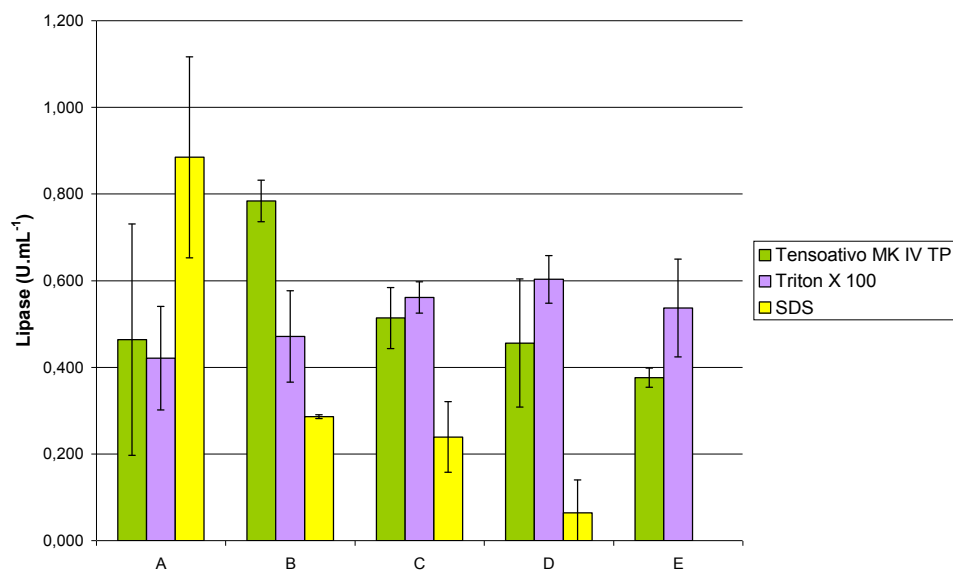


Figura 16. Efeito da adição de surfactantes na produção de lípase de *B. subtilis* (isolado 33). (A) Cultivo de 24 h sem adição de surfactante. (B) Surfactante adicionado ao início do cultivo. (C) Surfactante 30 min*. (D) Surfactante 16 h*. (E) Cultivo de 48 horas sem adição de surfactante. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm e temperatura de 36°C em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal e surfactante (0,25%). Os ensaios foram realizados em triplicata.

*Ao final do cultivo (72 h) os surfactantes foram adicionados ao reator e mantidos sob agitação durante o referido tempo.

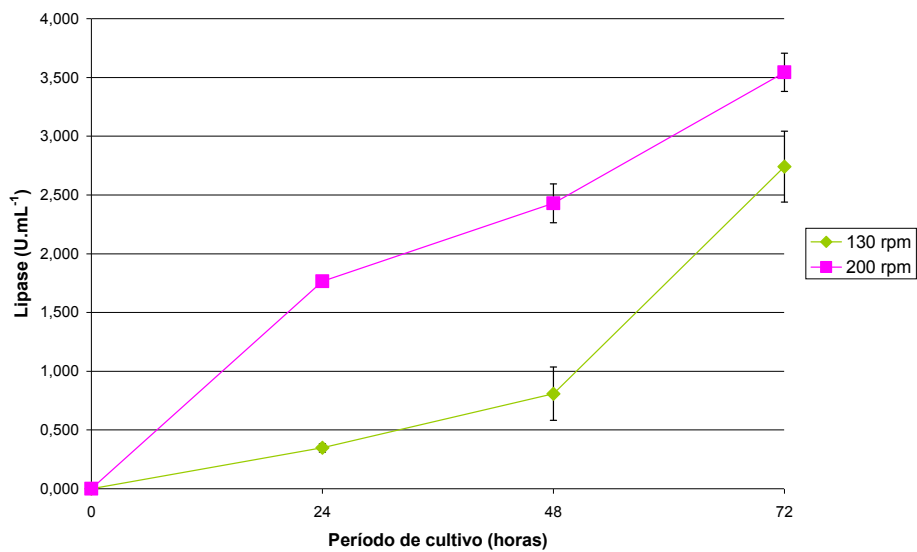


Figura 17. Determinação da produção de lipase do isolado 30, *P. pastoris*, cultivado em diferentes agitações. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma a 28°C, pH 8,0 e agitação variável em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Com o objetivo de encontrar a temperatura e o pH de crescimento onde há uma maior produção de lipase por *P. pastoris* (isolado 30), diversas culturas foram incubadas em diferentes temperaturas e pHs. O espectro de temperatura variou de 28°C a 42°C e os pHs variaram de pH 6,0 até pH 10,0 dentro de cada temperatura. Ao final destes cultivos os sobrenadantes das culturas foram submetidos a ensaios enzimáticos e os resultados estão apresentados na Figura 18. A temperatura e o pH de crescimento onde foi observada a maior atividade enzimática é 28°C, pH 8,0.

Depois de determinadas as condições de cultivo onde ocorreu a melhor produção de lipase por *P. pastoris* (isolado 30) em 20 mL de cultivo, foi iniciada a otimização da produção em 10 L. As condições de cultivo utilizadas em 20 mL foram mantidas. Amostras foram coletadas a cada 12 h até 72 h de cultivo e submetidas a ensaio enzimático para determinação da atividade de lipase (Figura 19) e análise das proteínas totais para a determinação da atividade específica de lipase (Figura 20). Também foram determinados o consumo de glicose (Figura 21) e a atividade de protease (Figura 22). Além disso, para um controle do crescimento populacional do microrganismo, a densidade óptica a 600 nm também foi determinada (Figura 23).

De acordo com os ensaios enzimáticos, a melhor produção de lipase foi encontrada em 72 h, porém não houve nenhuma queda de produção durante este período. Portanto, para confirmar que a melhor produção de lipase ocorria de fato em 72 h de cultivo, este teste foi repetido coletando-se amostras com intervalos de 24 h até completar 96 h de cultivo (Figura 24). Com este experimento foi observado que em 96 h de cultivo ocorre um decréscimo na produção de lipase,

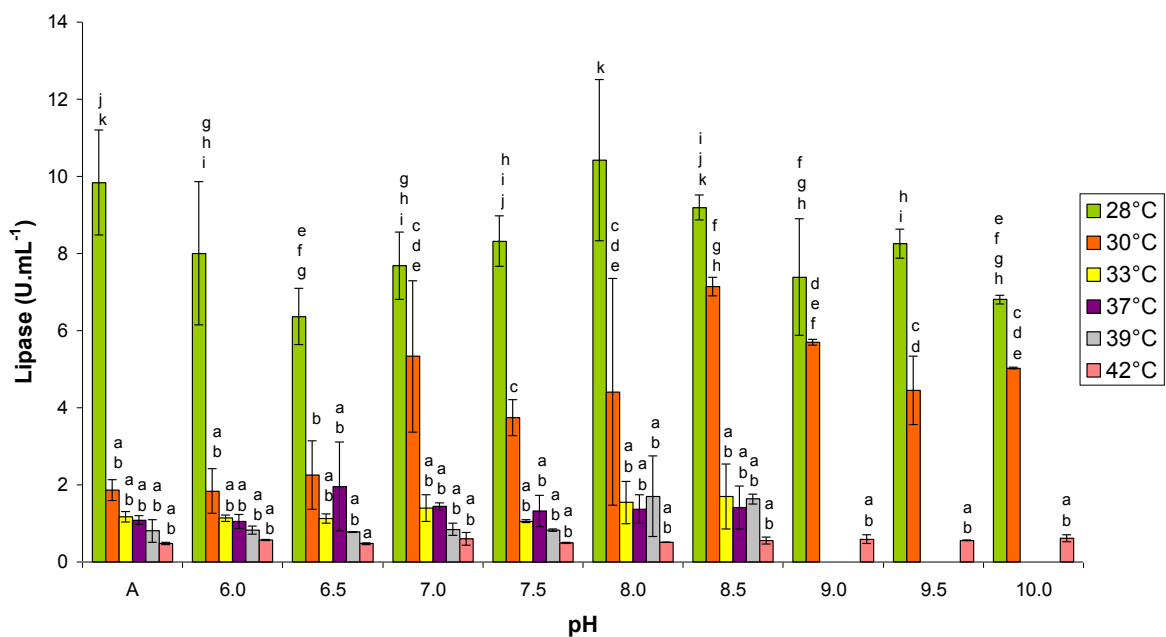


Figura 18. Determinação da produção de lipase do isolado 30, *P. pastoris*, cultivado em diferentes temperaturas e pHs. (A) Sem ajuste de pH. Os cultivos foram realizados em agitador orbital de plataforma com agitação de 200 rpm em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio pobre enriquecido com gordura animal e tensoativo. Os ensaios foram realizados em triplicata. As colunas que possuem as mesmas letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j ou k) não apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$).

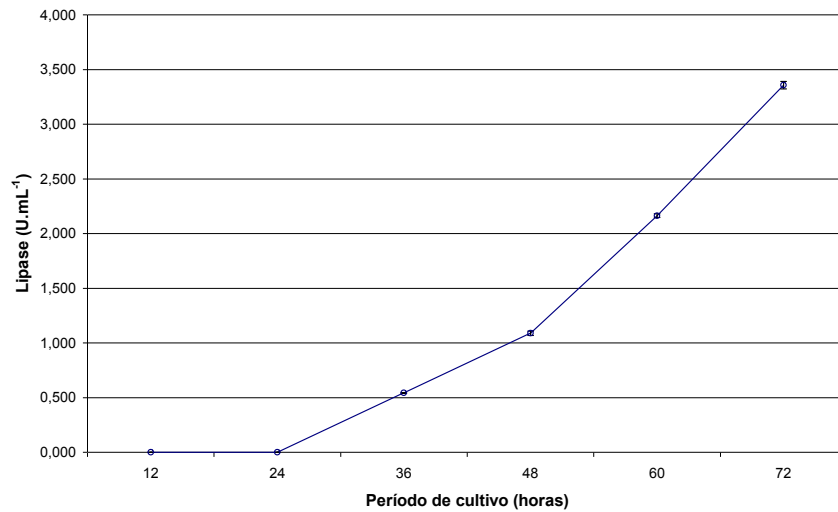


Figura 19. Análise da produção de lipase por *P. pastoris* em 10 L de cultura. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

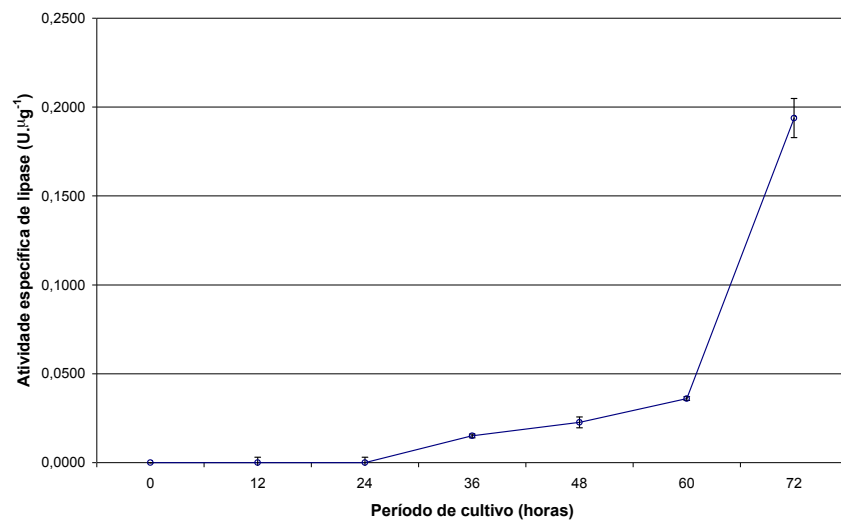


Figura 20. Atividade específica de lipase produzida por *P. pastoris* em 10 L de cultura. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata

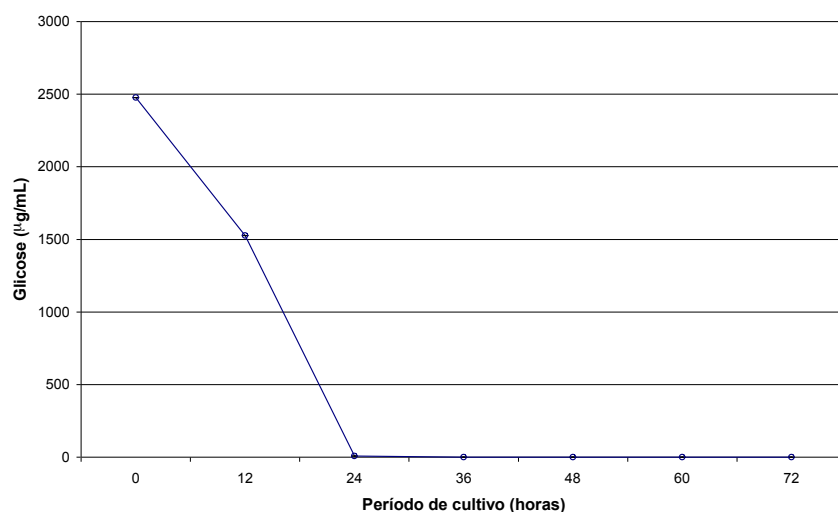


Figura 21. Consumo de glicose por *P. pastoris* em cultura de 10 L para produção de lipase. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

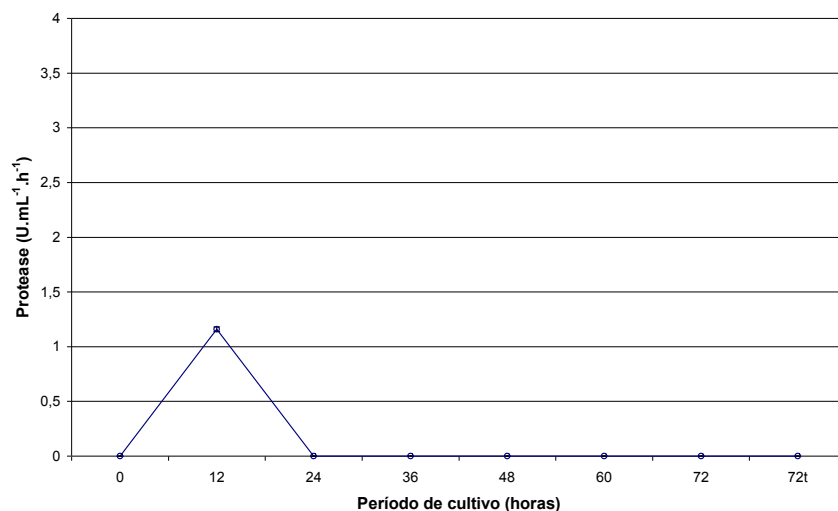


Figura 22. Análise da produção de protease por *P. pastoris* em 10 L de cultura. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

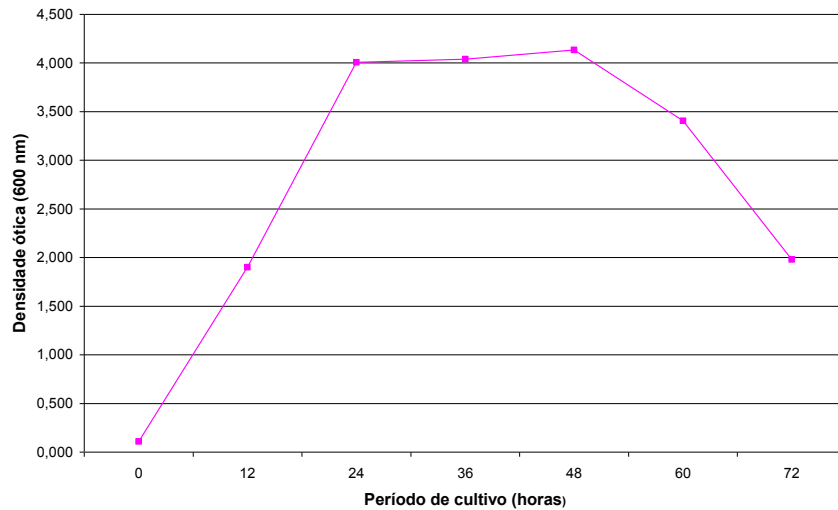


Figura 23. Crescimento populacional de *P. pastoris* em 10 L de cultura, através da densidade óptica a 600 nm. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

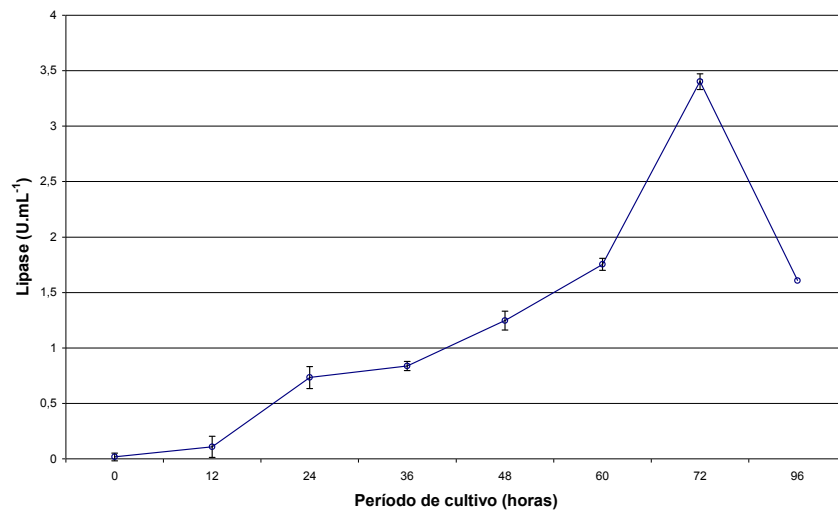


Figura 24. Análise da produção de lipase por *P. pastoris* em 10 L de cultura e 96 h de cultivo. Os cultivos foram realizados em biorreator New Brunswick MF-14, com 10 L de meio pobre enriquecido com gordura animal. Agitação de 200 rpm, temperatura de 28°C, pH 8,0 e taxa de aeração de 1,0 vvm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

confirmando que a melhor produção de lipase em reator de 10 L é encontrada em 72 h de cultivo.

A concentração de glicose decresceu rapidamente desde o início do cultivo, sendo que em 24 h o açúcar já havia sido completamente consumido.

De acordo com os ensaios enzimáticos para protease, foi encontrada uma pequena produção da enzima em 12 h de cultivo, porém a partir de 24 h de cultivo esta atividade não foi mais observada.

Através da densidade ótica, foi observado que o microrganismo encontra-se em fase de multiplicação celular até 24 h de cultivo. A partir de 24 h até 48 h de cultivo a densidade ótica mantém-se, porém foi observado o seu decréscimo a partir de 48 h até o final do cultivo.

5.5. Estabilidade da lipase aos processos de curtimento

Com o objetivo de testar a estabilidade da lipase durante os processos de curtimento onde a enzima será aplicada, o cultivo foi submetido à ação dos agentes que são aplicados nas etapas do processo nas quais a enzima será utilizada. A enzima foi submetida à simulação das operações de molho de peles salgadas (Figura 25), depilação e caleiro (Figura 26). Em ambos experimentos houve uma brusca perda da atividade enzimática quando adicionamos à enzima as formulações utilizadas no curtume. A água utilizada no curtume não apresentou influência significativa na atividade enzimática.

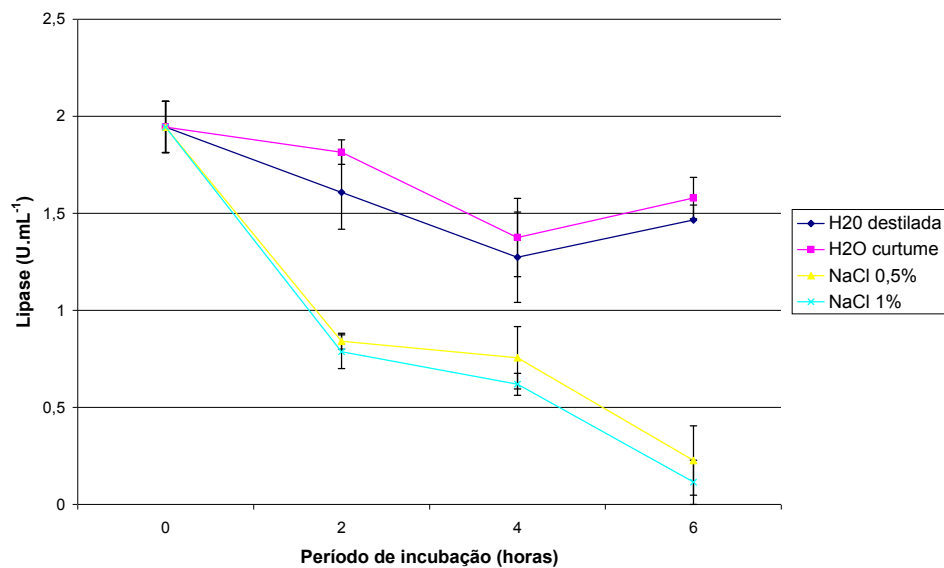


Figura 25. Estabilidade da lipase de *P. pastoris* ao NaCl. As referidas concentrações de NaCl foram adicionadas a 10 mL do cultivo e 10 mL de água utilizada no curtume. A mistura foi incubada em agitador orbital de plataforma com agitação de 100 rpm e 28°C. Como controle foi utilizado 10 mL de água destilada adicionada a 10 mL do cultivo.

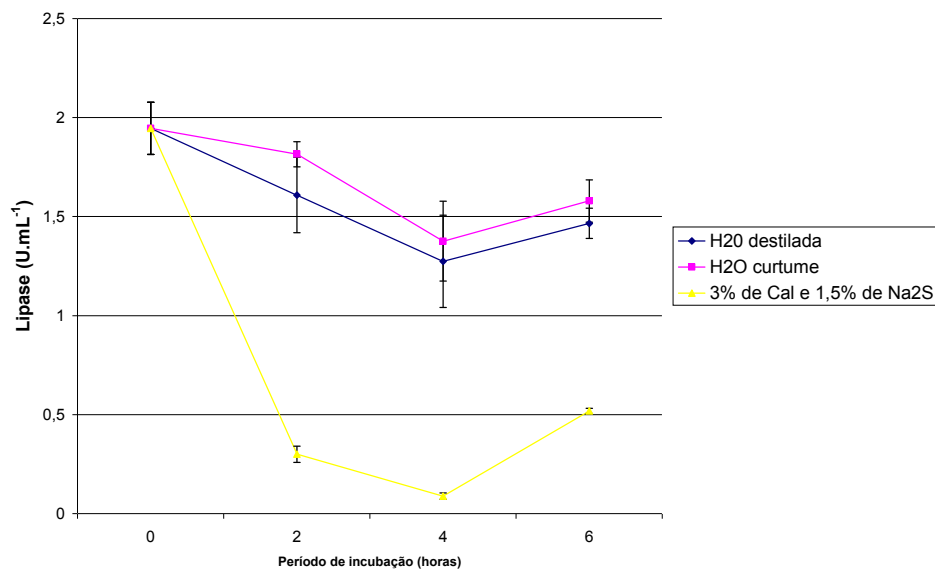


Figura 26. Estabilidade da lipase de *P. pastoris* à Cal e Na₂S. As referidas concentrações de Cal e Na₂S foram adicionadas a 10 mL do cultivo e 10 mL de água utilizada no curtume. A mistura foi incubada em agitador orbital de plataforma com agitação de 100 rpm e 28°C. Como controle foi utilizado 10 mL de água destilada adicionada a 10 mL do cultivo.

5.6. Atuação da enzima no processo de curtimento

Depois de otimizadas as condições de cultivo de *P. pastoris* para uma maior produção de lipase, foi testada a atividade do cultivo na redução de gorduras encontradas nas peles. O extrato bruto do cultivo foi empregado na operação de remolho. Para determinar a eficiência do processo, as gorduras das peles foram extraídas antes e depois do processo de curtimento completo. Os resultados deste teste estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 27. Foi observado que a enzima lipolítica de *P. pastoris* possui uma eficiente atividade na remoção das gorduras das peles em comparação tanto com o método químico de remolho quanto com o método enzimático encontrado comercialmente.

Tabela 5. Ação da enzima lipolítica sobre as peles verdes na operação de remolho.

PELE	%DCM* após remolho	pH do banho	Óleos e graxas do banho (g/L)
Formulação do curtume	2,2	7,6	4,7
Cultivo de <i>P. pastoris</i>	1,7	6,9	13,6
Enzima comercial	1,9	7,4	6,8
Pele verde antes do remolho	3,73		

*%DCM: Este método consiste em expor as peles ao diclorometano com o objetivo de solubilizar no solvente toda a gordura presente na pele para uma destilação. Pela diferença das massas obtemos a quantidade de gordura fixada e sabendo-se a quantidade encontrada anteriormente nas peles obtemos a eficiência do processo. O resultado é expresso em percentagem de substâncias extraíveis em diclorometano. (ABNT, NBR 11.030 julho/1997).

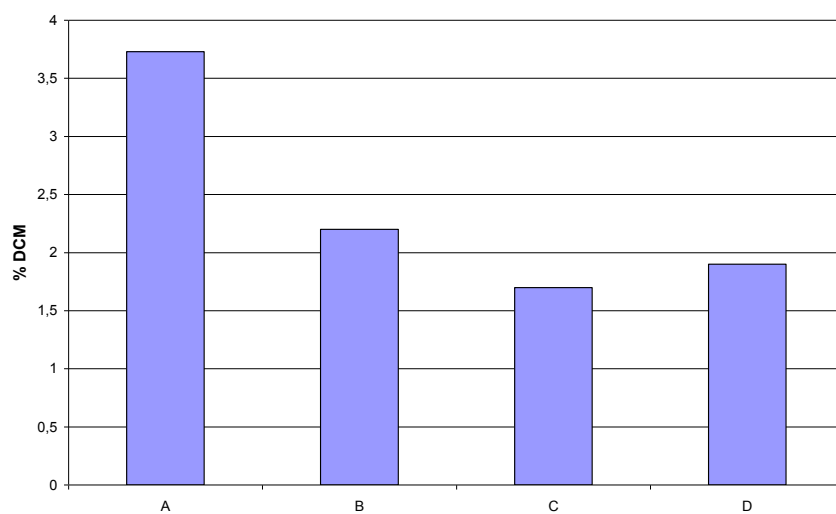


Figura 27. Percentagem de gorduras extraídas das peles pelo método de diclorometano. (A) Pele verde antes do processo (B) Formulação do curtume (C) Cultivo de *P. pastoris* (D) Enzima comercial (GreaseX™ 200MG).

6.

Discussão

O couro constitui-se da pele de animais processada pelo curtimento preservando-a da putrefação e que a tornam flexível e macia. A natureza fibrosa da pele é mantida pelo curtimento, porém as fibras são previamente separadas pela remoção do tecido interfibrilar e pela ação de produtos químicos. Após a separação as fibras e a remoção do material interfibrilar as peles são tratadas com os curtentes, transformando-as em couros (Hoinacki, 1989).

Os processos de curtimento do couro são realizados utilizando-se produtos químicos que apesar de serem controlados e tratados ainda causam preocupações quanto ao seu impacto ao meio ambiente, levando as indústrias a reavaliar os processos existentes. Atualmente, as limitações ambientais têm de prevalecer sobre os interesses econômicos e a biodegradabilidade das diversas classes de compostos, incluindo os tensoativos, utilizados no processo do curtimento de couros, terá que ser um dos primeiros interesses a defender. Apesar de um composto não ter que ser necessariamente produzido por catálise biológica para ser biodegradável, existe a tendência para aproximar a produção do natural, sempre que possível, atendendo o princípio de que a natureza tem capacidade de desfazer o que faz

(Rocha, 1999). Assim, recentemente foram desenvolvidos processos que substituem os ingredientes impróprios por enzimas totalmente biodegradáveis, mantendo ou até melhorando o desempenho dos novos produtos.

Com o objetivo de solucionar o problema da utilização de tensoativos, procuramos a fabricação de novos produtos de fontes naturais contendo enzimas lipolíticas para a aplicação no processamento de couros. Estes produtos substituiriam os tensoativos atualmente em uso nos curtumes, melhorando a qualidade do produto final e minimizando as cargas poluentes ao meio ambiente.

Para a produção de enzimas que sejam catalisadoras de uma reação de interesse são necessários o isolamento e seleção de microrganismos capazes de produzir a enzima de interesse. Um dos métodos mais eficientes para encontrar uma enzima é investigar um grande número de microrganismos, devido a sua diversidade e versatilidade (Ogawa & Shimizu, 2002). Assim, para encontrar um microrganismo que tivesse uma boa produção de lipase realizamos o isolamento de 51 microrganismos em curtume. Neste isolamento, procuramos selecionar os microrganismos que estivessem em contato com as fontes naturais de substrato para lipases, ou seja, no local onde são estocadas as peles antes do curtimento, onde vagorosamente estas começam a se decompor, e nos banhos onde as peles são lavadas pela primeira vez depois de retiradas dos estoques.

Para investigar quais dos microrganismos isolados possuíam a melhor produção de lipase, todos foram cultivados em Erlenmeyers sob agitação contínua. O método de cultura submersa em frascos Erlenmeyer sob agitação é usado freqüentemente para o estudo da produção de enzimas por microrganismos

(Dharmsthiti & Luchai, 1999; Kamini *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2001). A maioria das lipases são enzimas induzíveis, assim fontes lipídicas de carbono são essenciais para obter uma alta produção da enzima. Para a produção de lipase por microrganismos, uma fonte lipídica efetiva e de baixo custo é muito importante (Rapp & Backhaus, 1992; Maia *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001). Por isto, os cultivos foram realizados em meio enriquecido com gordura animal, que além de ser de fácil disponibilidade, tem baixo custo e é o substrato natural das lipases dos microrganismos isolados. Essamri e colaboradores (1998) observaram que a concentração de óleos para um ótimo crescimento de biomassa é 3%, mas uma ótima produção de lipase ocorre numa concentração de 2%.

Numa segunda etapa todos os cultivos foram realizados enriquecendo-se o meio de cultura com gordura animal e goma arábica. A goma arábica foi referida como um bom surfactante, emulsionando a gordura no meio de cultura conduzindo a valores elevados da atividade lipolítica (Rocha, 1999). Pode-se observar que a atividade de lipase diferiu quando a goma arábica foi adicionada ao meio e que esta mudança foi diferente dentre os microrganismos testados. Nos microrganismos baciliformes observou-se que dos 22 isolados testados, oito apresentaram uma maior atividade de lipase em presença de goma arábica nos cultivos (isolados 1, 2, 3, 16, 17, 19, 29 e 32), oito apresentaram uma menor atividade de lipase em presença de goma arábica (isolados 12, 13, 21, 22, 23, 24, 27 e 33) e os demais não apresentaram atividade de lipase em nenhum dos meios de cultivo. Já os isolados com morfologia de cocobacilo, um apresentou uma maior atividade em presença de goma arábica e o outro não apresentou atividade de lipase com ou sem adição de

goma arábica (isolados 15 e 12, respectivamente). Das cinco leveduras analisadas, duas apresentaram diminuição da atividade enzimática na presença de goma arábica (isolados 30 e 34), duas apresentaram aumento da atividade enzimática na presença de goma arábica (isolados 18 e 20) e a outra levedura não apresentou atividade de lipase. Entre os cinco cocos analisados, em dois (isolados 14 e 25) observou-se uma melhor atividade com o uso da goma arábica, em um (isolado 7) observou-se uma diminuição da atividade de lipase com a presença de goma arábica e nos demais não observou-se atividade de lipase. A goma arábica possui a propriedade de emulsionar a gordura no meio de cultura, diminuindo a tensão entre esta e a água. Esta propriedade pode modificar a produção da enzima, já que pode aumentar a interação desta com a gordura, melhorando ou prejudicando a atuação de uma determinada enzima sobre a gordura.

Dos 35 microrganismos analisados, oito foram selecionados por apresentarem uma atividade enzimática satisfatória.

Para a identificação dos microrganismos, as bactérias com morfologia baciliforme e cocóide foram submetidas a testes bioquímicos. Os isolados 3 e 25 foram facilmente identificados por este método, porém os outros isolados apresentaram resultados inconclusivos, pois a combinação dos testes bioquímicos não referiam para nenhuma espécie, apenas para o gênero *Bacillus*. Uma alternativa para este problema, que tem sido freqüentemente empregada para a identificação de microrganismos é a amplificação dos genes ribossomais. Este método é baseado na observação de produtos de PCR correspondentes aos genes para os RNAs ribossomais 16S e 23S (Chen & Tsen, 2002; Scheldeman *et al.*, 2002; Gonzáles *et*

al., 2003). Então, para identificação destes microrganismos, um fragmento correspondente ao gene 23S rDNA foi amplificado e seqüenciado. Estes amplicons foram comparados com as seqüências encontradas no GenBank e os microrganismos foram identificados. Assim, os isolados 3, 25, 29 foram identificados como *B. cereus*, *Proteus* sp. e *B.licheniformis*, respectivamente. Ambos os isolados 32 e 33 foram identificados como *B. subtilis*.

Uma vez que a possibilidade de produção de enzima através de um microrganismo selecionado tenha sido demonstrada, a otimização do processo de cultivo é iniciada. A otimização é incluída na análise estratégica da viabilidade de um projeto (Thiry & Cingolani, 2002). Assim, depois de identificados os microrganismos capazes de produzir lipase satisfatoriamente, partimos para a otimização do processo de cultivo. A otimização de um processo de cultivo pode ser conduzida modificando um fator por vez ou variando diversos fatores simultaneamente (Thiry & Cingolani, 2002). Muitos estudos têm sido feitos para definir as condições ótimas de cultura para produção de lipases em cultura submersa. A produção de lipase é influenciada pelo tipo e pela concentração da fonte de carbono, pelo pH da cultura, pela temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio dissolvido (Sharma, 2001). Iniciamos avaliando o tempo de cultivo necessário para obtenção de maior produção de lipase pelos microrganismos. Os isolados 3, *B. cereus* e 33, *B. subtilis* apresentaram o pico de produção de lipase em 24 h de cultivo, o isolado 32, *B. subtilis*, em 48 h e o isolado 30, *P. pastoris*, em 72 h. Provavelmente, o maior tempo de cultivo necessário para produção de lipase por *P. pastoris* se explica por ser esta uma levedura e conseqüentemente, seu tempo de geração é maior

comparado as bactérias isoladas. Em *Rhodotorula rubra* foi observada uma máxima atividade de lipase em 72 h de cultivo (Rapp & Backhaus, 1992), em *Cryptococcus* sp. a máxima atividade de lipase foi encontrada em 96 h de cultivo (Kamini *et al.*, 2000), já em *Saccaromyopsis capsularis* a maior atividade de lipase foi apenas encontrada em 168 h de cultivo. Nas bactérias testadas, *B. cereus*, *B. subtilis* (32 e 33) o tempo necessário para atingir o máximo de atividade de lipase foi menor, provavelmente porque o seu tempo de geração é menor, de forma que em 72 h, já houve um decréscimo da atividade, pois as células se encontram na fase de morte celular. Em *Bacillus* sp. THL027 a atividade máxima de lipase foi encontrada em 48 h (Dharmstithi & Luchai, 1999), assim como em *Rhodococcus cropophilus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* e *B. pumilus*, este último perdendo em mais de 50% da atividade de lipase em 96 h (Rapp & Backhaus, 1992).

As reações catalisadas por lipases ocorrem na interface óleo-água e, portanto a área interfacial e a qualidade da interface são influências importantes na taxa de reação. Essa área de interface pode ser aumentada substancialmente através do uso de surfactantes assim como de agitação (Balashev *et al.*, 2001). Os surfactantes têm a capacidade de emulsionar os lipídios no meio através da diminuição da tensão superficial da água. Essa propriedade se deve ao fato das moléculas dos surfactantes possuírem uma porção apolar e outra porção polar ou iônica. Os surfactantes podem ser não-iônicos ou iônicos, estes últimos podendo ser aniônicos, catiônicos ou anfóteros, quando ambas as cargas estão presentes na molécula do surfactante. A escolha do surfactante mais adequado para cada processo precisa ser focada no objetivo final para o qual o mesmo está sendo utilizado. Na indústria de

detergentes, onde as lipases são usadas para facilitar a remoção de gorduras, o efeito dos surfactantes sobre a atividade hidrolítica da enzima é particularmente importante, já que neste caso, onde há a recuperação de proteínas com atividade enzimática, a preservação desta atividade é um critério prioritário (Rocha, 1999). Desta forma, escolhemos três surfactantes com diferentes características para testar a sua ação sobre a atividade da enzima: SDS, Triton X-100, Tensoativo MK IV TP. O SDS é um surfactante amplamente utilizado, é aniônico e liga-se às regiões hidrofóbicas de moléculas de lipídios, formando agregados e assim solubilizando-os. O Triton X-100 é um surfactante não-iônico, bom emulsionante para os lipídios e adequado para a determinação da atividade hidrolítica das lipases, já que não apresenta qualquer atividade lipolítica. (Rocha, 1999). O Tensoativo MK IV TP é uma combinação de tensoativos não-iônicos, especialmente selecionados para atuar sobre a gordura animal (Grupo MK, 1999).

Observamos que não houve maior solubilização da enzima quando o SDS foi adicionado e que as atividades enzimáticas de todos microrganismos foram prejudicadas com a adição de SDS. Quando foi adicionado Triton X-100 ou Tensoativo MK IV TP observamos uma maior solubilização da enzima, conduzindo a maiores valores de atividade lipolítica. É possível afirmar que os surfactantes não-iônicos são, em geral, menos desnaturantes para proteínas solubilizadas do que os iônicos. Os surfactantes não-iônicos não afetam significativamente a maior parte das propriedades físicas ou químicas das proteínas, embora não sejam tão eficientes na quebra das interações entre proteínas, nem tão facilmente removíveis. Os surfactantes iônicos quebram essas interações mais facilmente, mas são fortemente

desnaturantes por ligarem-se às porções apolares das proteínas tornando-as inativas (Rocha, 1999; Alberts *et al.*, 1997). Provavelmente os surfactantes não iônicos utilizados, Triton X-100 e Tensoativo MK IV TP, não induziram alterações conformacionais nas lipases que causassem perdas das suas propriedades biológicas, ao contrário do tensoativo aniônico utilizado, o SDS, com características desnaturantes, que não permitiu a detecção da lipase através de atividade enzimática.

Para verificar em qual estágio do cultivo os surfactantes tinham um efeito mais significativo, estes foram adicionados em diversos momentos. Em *B. cereus*, e nos dois isolados de *B. subtilis* a adição de Triton X-100 ao final do crescimento aumentou a atividade enzimática, já para *P. pastoris* esta aumenta com a adição de Triton X-100 junto com o inóculo. A adição do Tensoativo MK IV TP aumentou a atividade enzimática de todos os microrganismos principalmente quando adicionado junto com o inóculo. A melhor atividade para *B. cereus* e *B. licheniformes* foi obtida com a adição de Triton X-100 ao final do crescimento. Para *B. subtilis* foi obtida com a adição do Tensoativo MK IV TP no inóculo e para *P. pastoris* foi à adição de Triton X-100 junto com o inóculo. A suplementação do meio de cultura com agentes surfactantes pode alterar as propriedades fisiológicas dos microrganismos (Laouar *et al.*, 1996). O Triton X-100 é um disruptor de membrana e um agente de solubilização muito conhecido usado para permeabilizar células. Os surfactantes não-iônicos, como o Triton X-100, podem substituir moléculas de lipídios em contato com o domínio hidrofóbico de proteínas transmembrana, permitindo a formação de uma micela de proteínas solúveis e surfactante (Laouar *et al.*, 1996). Laouar e

colaboradores (1996) observaram que o crescimento de leveduras na presença de surfactantes não-iônicos aumenta a permeabilidade inerente da célula. Entretanto, em células pré-crescidas somente em meio de cultura, o efeito permeabilizante imediato de surfactantes foi maior do que o induzido através do pré-crescimento com surfactantes. Isso demonstra que um processo de interação entre o surfactante e a levedura ocorre, de maneira que um efeito rápido inicial pode ser modificado por uma adaptação em um tempo maior. Helenius e Simons (1975) demonstraram que Triton X-100 se liga a membranas biológicas em um processo de três estágios, no qual a interação entre a membrana e o surfactante inicia com a incorporação do surfactante na bicamada lipídica, seguida pela ruptura da mesma e a separação dos componentes protéicos. Desta forma, além de emulsionar os lipídios no meio, os surfactantes aumentaram a permeabilidade das células, permitindo valores mais elevados de atividade de lipase.

Um das preocupações quanto ao aumento da permeabilidade das células, seria a presença de proteínas indesejáveis no sobrenadante, mas já foi observado que proteínas não são detectadas em sobrenadantes de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* que foram crescidas apenas em meio de cultura e ao final do cultivo tratadas com surfactantes por 30 min. Assim, os perfis de produção dos polipeptídeos mais abundantemente produzidos por *S. cerevisiae* não são alterados com a adição de surfactantes não-iônicos. Isso demonstra que grandes alterações na biossíntese de proteínas não são induzidas por estes compostos, nem mesmo há alguma significativa ou seletiva perda de proteínas associadas a células induzidas por surfactantes (Laouar *et al.*, 1996).

O uso de agitação mecânica ajuda a prover uma maior área interfacial entre o óleo e a água, auxiliando as reações catalisadas por lipases (Saxena *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2001). Foram testadas duas diferentes agitações para o cultivo de *P. pastoris*. Na agitação de 200 rpm encontramos uma maior atividade enzimática em comparação com 130 rpm de agitação. No crescimento em 200 rpm provavelmente a área de interface óleo-água é maior, tornando os lipídios mais disponíveis para as lipases, mostrando um aumento na atividade. Além disso, nesta agitação há uma maior concentração de oxigênio dissolvido e uma maior disponibilidade de nutrientes para as células o que também permite uma maior atividade enzimática.

Uma das operações mais importantes para a otimização do processo de cultivo é definir as variáveis que podem afetar a produtividade e a qualidade do produto. Uma alternativa interessante é conduzir a otimização variando diversos fatores simultaneamente (Thiry & Cingolani, 2002). O pH e a temperatura de crescimento são fatores ambientais que fortemente influenciam a produção de lipase. Deste modo, optamos por avaliar simultaneamente a temperatura e o pH de crescimento ideal para uma maior produção de lipase por *P. pastoris*. Assim, diversas culturas foram incubadas em diferentes temperaturas com um espectro de 28°C a 42°C e em diferentes pHs em cada temperatura variando desde pH 6,0 até pH 10,0. Observamos que melhores condições de temperatura e pH para produção de lipase por *P. pastoris* são 28°C, pH 8,0. Temperaturas na faixa de 22-35°C foram observadas como sendo ótimas para uma máxima produção de lipase em *A. wentii*, *Mucor hiemalis*, *Rizhopus nigricans*, *Mucor racemosus*, *R. oligosporus*, e *P. aeruginosa*. Em *Cyptococcus* sp. observou-se a capacidade de produção de lipase

na faixa de 20 – 37°C, mas a produção máxima de lipase foi alcançada à 25°C (Saxena *et al.*, 1999; Kamini *et al.*, 2000). O pH inicial do meio de cultura é importante para a produção de lipase. Máxima atividade foi observada com crescimento em pH maior que 7,0 para *P. fragi* e em pH 9,0 para *P. aeruginosa* nos quais o desenvolvimento de acidez no meio reduziu a atividade de lipase. Em *Bacillus* sp. THL027 máxima produção de lipase foi encontrada em pH 7,0 e em *Penicillium expansum* em pH 8,3. Ao contrário, máximas atividades enzimáticas no crescimento em pH ácido (pH 4,0 – 7,0) foram observadas em *S. lipolytica*, *M. caseolyticus*, *B. licheniformis*, *A. wentii*, *M. hiemalis*, *R. nigricans*, *M. racemosus*, *R. oligosporus* e *P. aeruginosa* (Saxena *et al.*, 1999; Dharmsthiti & Luchai, 1999; Sztajer *et al.*, 1993). Este resultado mostrou-se satisfatório já que o processo de curtimento é geralmente realizado em ambiente alcalino, por isso microrganismos alcalófilos seriam preferidos.

Dado que o objetivo da otimização de um processo de cultivo é maximizar a produção, o volume de teste pode ser aumentado uma vez que as condições ótimas de produção tenham sido estabelecidas em pequena escala laboratorial. Portanto, depois de determinadas as condições ótimas de cultivo em 20 mL de cultura partimos para a produção da enzima em reator de 10 L, utilizando o microrganismo com melhor produção de lipase.

Lipases microbianas são principalmente produzidas por cultura submersa. No entanto, métodos de fermentação sólida ou culturas com células imobilizadas também têm sido usadas em alguns casos (Balcão *et al.*, 1996; Maia *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Germano *et al.*, 2003; Betigeri & Neau, 2002). Assim, foi

realizado o cultivo do microrganismo em cultura submersa mantendo os padrões de otimização já estabelecidos (pH inicial 8,0, 28°C, 200 rpm). Inicialmente observamos que a atividade de lipase aparece a partir de 24 h de cultivo, e aumenta gradualmente até 72 h, onde se encontra a melhor atividade de lipase, concordante com os testes anteriores em 20 mL. Em 72 h de cultivo também é observada a melhor atividade específica de lipase. Apesar disto, a atividade de lipase foi crescente até o final das 72 h de cultivo e durante este período nenhum decréscimo na atividade foi observado. É importante observar um decréscimo na atividade enzimática durante um cultivo para confirmar onde é encontrado o pico de produção da atividade, obtendo o maior rendimento de enzima possível no cultivo. Desta forma, realizamos um cultivo de 96 h, onde observamos um decréscimo da atividade ao final do período, confirmando que o melhor tempo de produção de lipase por *P. pastoris* em reator de 10 L é 72 h.

O consumo de glicose e a densidade óptica a 600 nm também foram determinados no cultivo em bioreator. Foi observado que a fase de multiplicação celular ocorre até 24 h de cultivo, a partir deste tempo até 48 h de cultivo a densidade celular se mantém quando então decresce até o final do cultivo. Quanto ao consumo de glicose, observou-se que a concentração de glicose decresce desde o início do cultivo até 24 h, quando a glicose não é mais encontrada no sobrenadante do cultivo. Portanto, até 24 h de cultivo a alta concentração de glicose presente no meio de cultura permite a multiplicação celular e inibe a produção de lipase pelo microrganismo. Quando a glicose foi totalmente consumida a produção de lipase foi iniciada, permitindo uma fase de manutenção da quantidade de células pela

mudança da fonte de carbono do meio de cultura de glicose para a gordura animal. A produção de lipase geralmente é coordenada e dependente da disponibilidade de fontes lipídicas de carbono, desta forma os lipídios são essenciais para se obter uma boa produção de lipase. A adição de óleos ao meio de cultura para o crescimento de *R. oryzae* aumenta a atividade de lipase em mais de três vezes quando comparada com os resultados em meio sem lipídios. A produção da lipase extracelular secretada por *C. rugosa* também é induzida pela adição de lipídios ao meio de cultura e o mesmo acontece com *P. pseudoalcaligenes* e *P. wortmanii* (Saxena *et al.*, 1999; Essamri *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2001). Contudo, podemos observar que a presença de pequena quantidade de glicose no meio de cultura é necessária para a multiplicação celular, já que esta cessa quando os lipídios foram utilizados como fonte de carbono.

A derme é a camada da pele mais importante no curtimento, já que é ela que vai ser transformada em couro. É constituída principalmente por colágeno, que é o constituinte que será convertido em couro. Portanto, é necessário manter o colágeno intacto durante todo o processo de curtimento. Para certificar de que o colágeno não será destruído pelas proteases presentes no sobrenadante do meio cultivado foi realizado um ensaio de proteases. A partir deste ensaio observamos uma pequena atividade de protease em 12 h de cultivo, que logo cessa em 24 h de cultivo. Provavelmente os constituintes do meio de cultura induzem uma pequena atividade de protease, mas assim que são consumidos a produção de enzima é interrompida. Ainda pode existir uma pequena produção de protease constitutiva que é

interrompida pela falta de substrato para a enzima ou pela necessidade de produção de outras enzimas para a sobrevivência do microrganismo.

Quaisquer substâncias químicas que interajam com o sítio ativo de uma enzima podem influenciar sua atividade. Uma variedade de químicos é conhecida por ter ação adversa sobre as enzimas e, portanto a compatibilidade dos produtos químicos utilizados e das enzimas se torna um fator importante na atividade das enzimas sobre as peles (Leather Technology Centre, 2003). O tipo, a concentração e a natureza iônica das soluções utilizadas irão influenciar na integridade estrutural do sítio ativo da enzima, influenciando sua atividade. Tanto os sais oriundos do processo de conservação das peles quanto a cal e o sulfeto de sódio utilizados nas etapas do processamento de couros onde se pretende utilizar a enzima podem afetar a atividade enzimática. Assim, para testar a estabilidade da lipase durante estes processos, o cultivo foi submetido à simulação das operações de remolho de peles salgadas, depilação e caleiro. Em ambos experimentos foi observada uma brusca perda de atividade enzimática. Este problema deverá ser solucionado através da adição de uma maior concentração de enzima no processo ou ainda, pela adaptação do processo às condições da enzima. A água utilizada no curtume provém de rios, lagoas ou poços artesianos, portanto também pode conter sais ou químicos que influenciem na atividade enzimática. Desta forma, também foi testada a ação da água utilizada no curtume sobre a atividade enzimática. Através deste experimento foi observado que a água utilizada no curtume não apresentou influência significativa sobre a atividade enzimática.

Determinadas as melhores condições de cultivo de *P. pastoris* para produção de lipase, foi testada a atividade do extrato bruto produzido na redução das gorduras encontradas nas peles. Foram comparadas a ação do extrato total do cultivo, com a formulação padrão utilizada no curtume e com uma lipase comercial utilizada para remolho. Neste teste o extrato bruto do cultivo foi adicionado à formulação recomendada para remolho, onde diminuimos em dez vezes o volume de tensoativo utilizado. O tensoativo não pôde ser retirado integralmente do processo, pois as gorduras formam micelas no banho, o que não é aceito comercialmente; neste caso a pequena quantidade de tensoativo solubiliza estas micelas. Ao final do processo a quantidade de gordura encontrada nas peles foi mensurada e observamos que as peles tratadas com o extrato bruto do cultivo apresentaram uma significativa redução das gorduras. O extrato bruto testado se mostrou ainda mais efetivo do que a formulação padrão e do que a enzima comercialmente utilizada. O mesmo resultado foi observado na quantidade de óleos e graxas encontrados no banho, demonstrando que as gorduras foram realmente extraídas das peles e encontravam-se dissolvidas no banho. Além disso, o pH do banho do extrato bruto total era menor, demonstrando que neste banho havia maior quantidade de ácidos graxos livres responsáveis pela diminuição do pH. Os ácidos graxos são os produtos de hidrólise das lipases, mais uma vez confirmando a efetividade da enzima produzida. Assim, observamos que extrato bruto do cultivo possui eficiente atividade na remoção das gorduras das peles em comparação tanto com o método químico de remolho quanto ao método enzimático encontrado comercialmente.

7. Perspectivas

Depois de determinadas as condições de produção da lipase em laboratório, ainda são necessárias diversas etapas subseqüentes até a comercialização do produto sugerido, são estas:

- Otimização da produção de lipase em escala industrial;
- Concentração do extrato bruto do cultivo;
- Determinação de uma formulação que mantenha a atividade enzimática para estocagem e transporte;
- Teste da viabilidade da síntese, considerando custos, equipamentos, segurança operacional e gerenciamento de resíduos;
- Aplicação do produto final no processamento de couros, em escala industrial em curtumes em atividade, para avaliação final dos novos produtos gerados;
- Produção experimental de novas enzimas de interesse para o setor coureiro.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, H.; HIOL, A. DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 31:968-975, 2002.

AICSUL – ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUME DO RIO GRANDE DO SUL, 2005. (www.aicsul.com.br)

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª Edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1294 p., 1997.

ALTSCHUL, S .F.; MADDEN, T. L.; SCHAEFFER, A. A; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped Blast and psi-Blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25:3389-3492, 1997.

BALASHEV, K.; JENSEN, T .R.; KJAER, K.; BJORNHOLM, T. Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie*, 83(5):387-97, 2001.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:392-416, 1996.

BARNETT J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts, Characteristics and Identification*. 3ª Edição. Cambridge: Cambridge University Press, 811 p.,2000.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. *Biomaterials*, 23:3627-3636, 2002.

BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 16ª Edição. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1056 p., 1975.

BORNSCHEURER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10):433-435, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

CAMPOS, F. H. O trabalho e a relação sociedade-natureza: uma reflexão sobre a indústria de curtimento de couro em Presidente Prudente. Revista pegada eletrônica 3(1), 2002. (Acessado através do site www2.prudente.unesp.br/ceget/pegada/peg13n3.htm em fevereiro de 2005).

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J.C. AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27(1):146-156, 2004.

CHEN, M. L.; TSEN, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5):912-919, 2002.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E.M. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 397 p., 1982.

DHARMSTHITI, S. & LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters*, 179:241-246, 1999.

ESSAMRI , M.; VALERIE, D.; LOUIS C. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 60:97-103, 1998.

EWING, B.; HILLIER, M. C.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base calling of automated sequencer traces using PHRED. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8:175-185, 1998.

FALCH, E.A. Industrial enzymes – developments in production and application. *Biotechnology Advances*, 9:643-658, 1991.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation, 32:246-251, 2003.

GONZÁLEZ, N.; ROMERO, J.; ESPEJO, R. T. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region. *Journal of Microbiological Methods*, 55:91-97, 2003.

GREEN, G. H. Unhairing by means of enzymes. *Journal of Society of Leather Technologists and Chemists*, 36:127-134, 1952.

GRUPO MK. *Manual de aplicação para produção de couro*. 1ª Edição. Portão: MK Química do Brasil, 74p., 1999.

HELENIUS, A. & SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 415:29-79, 1975.

HOINACKI, E. *Peles e couros*. 2ª Edição. Porto Alegre, Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - Departamento Regional do Rio Grande do Sul, 319 p., 1989.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9ª Edição. Baltimore, Williams and Wilkins, 787 p., 1994.

JAEGER, K. & EGEERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:390-397, 2002.

JAQUESS, P. A.; ELMORE, M. E.; MIGUEL, N.B. Advances in stabilized enzymes for leather processing. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 94:355–361, 1999.

KAMINI, N. R. ;FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, 36:317-324, 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:345-351, 2002.

KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; MEURMAN, O.; LEHTONEN, O.; RINTALA, E.; SEPPÄLA, O.; EEROLA, E. & NIKKARI, S. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(8):2205-2209, 1998.

LAOUAR, L.; LOWE, K. C.; MULLIGAN, B. J. Yeast responses to nonionic surfactants. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:433-438, 1996.

LEATHER TECHNOLOGY CENTRE. *The production of bovine wet-blue using enzymes*. Venue, 71 p., 2003.

MACEDO, A.J. *Queratinase de Bacillus subtilis com atividade depilatória: purificação e caracterização*. [Dissertação de mestrado] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 65 p., 2002.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY A.; CAMARGO DE MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS Jr, M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of the culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, 76:23-27, 2001.

MACFADDIN, J. F. *Biochemical test for the identification of medical bacteria*. 3ª Edição. Lippincott, Williams and Wilkins, 1999.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31:426-428, 1959.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:367-375, 2002.

PAL, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C.; CHAKRABORTY, R. Application of a proteolytic enzyme in tanneries as a depilating agent. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 91:59-63, 1996.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology applied Biochemistry*, 29:119-131, 1999.

PECZYN´SKA-CZOCH, W.; MORDASKI, M. *Actinomycete enzymes*. In: Goodfellow, M.; Williams, S.T.; Mordaski, M. *Actinomycetes in Biotechnology*. San Diego: Academic Press, 219-283, 1988.

- PILNIK, W. & RONBOUTS, F.M. Polysaccharides and food processing. *Carbohydrate Research*, 142(1):93-105, 1985.
- RAPP, P. & BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microbial Technology*, 14:938-943, 1992.
- ROCHA, J. M. S. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. *Boletim de biotecnologia*, 64:5-11, 1999.
- RUPPENTHAL, R.D. *Aplicação das técnicas de PCR/Seqüenciamento, Nested-PCR e PCR Gram-específica no diagnóstico da sepse neonatal*. [Dissertação de mestrado] Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 77 p., 2003.
- SAGORRÍN, M. P.; FOLCO, E. J.; MARTONE, C. M. Purification and characterization of proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle *Micropogon opercularis*. *International Journal Biochemistry Cell Biology*, 33:692-699, 2001.
- SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Natural leathers from natural materials: progressing toward a new arena in leather processing. *Environmental science & Technology*, 38(3):871-879, 2004.
- SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77(1), 1999.
- SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; GORIS, J.; DE VOS, P. HEYNDRIKX, M. Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *Journal of Applied Microbiology*, 92:983-991, 2002.

SCHMIDT-DANNERT, C.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. *Annals New York Academy of Sciences*, 864:14-22, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627-662, 2001.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543:223-238, 2000.

SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1168:181-189, 1993.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Biointervention makes leather processing greener: an integrated cleansing and tanning system. *Environmental science & Technology*, 37(11):2609-2617, 2003.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *TRENDS in Biotechnology*, 22(4):181-188, 2004.

THIRY, M. & CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation processes. *TRENDS in Biotechnology*, 20(3):103-105, 2002.

VAN BEILEN, J. B. & LI, Z. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:338-344, 2002.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, ed. Kurtzman, C P. and Fell, J. W. Amsterdam: Elsevier, 1998.

ZECHENDORF, B. Sustainable development: how can biotechnology contribute?
TRENDS in Biotechnology, 17:219-225, 1999.