

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Seleção, isolamento e otimização dos meios de
cultivo de microrganismos produtores de
enzimas para aplicação ao processamento de
peles na etapa de depilação/caleiro**

TESE DE DOUTORADO

Aline Dettmer

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro

Aline Dettmer

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia

Área de concentração: Cinética Aplicada, Catálise e Reatores Químicos e Biorreatores

Orientadores:

Prof^ª. Dr^ª. Mariliz Gutterres

Prof. Dr. Marco A.Z. Ayub

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado *Seleção, isolamento e otimização dos meios de cultivo de microrganismos produtores de enzimas para aplicação ao processamento de peles na etapa de depilação/caleiro*, elaborada por Aline Dettmer, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Patrice Monteiro de Aquim

Prof. Dr. Nilson Romeu Marcílio

Dra. Priscila Brasil de Souza Cruz

Dr. Markus Wilimzig

Agradecimentos

Ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, pela estrutura oferecida.

Aos meus orientadores, professora Mariliz Gutterres e professor Marco Ayub, pela orientação e amizade.

Aos meus pais, David e Rosa, pelas oportunidades, apoio e incentivo em todos os momentos, ao meu irmão, Marcos.

Ao meu esposo Abel, pelo incentivo, apoio, compreensão e paciência nos momentos difíceis.

As queridas amigas engenheiras químicas, Caroline B. Eickhoff, Joice V. Oliveira e Leciane C. Marcuzzo, pela sua amizade. Obrigada por estarem sempre presentes, apesar da distância.

Aos amigos do Laboratório do Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) e LPR, pela amizade e companheirismo. Aos amigos do BiotecLab pela acolhida, amizade e auxílio nas tarefas rotineiras de laboratório. Aos bolsistas de iniciação científica Jhonnattas Cavalheiro e Érita Cavalli pelo auxílio na realização da parte experimental deste trabalho. A bolsista DTI Patrícia dos Anjos, por sua contribuição.

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

Resumo

A indústria coureira tem se deparado com novos desafios e a necessidade de melhorar e otimizar processos, a fim de atingir a qualidade exigida em seus artigos finais bem como atender a legislação ambiental. A utilização de enzimas na produção de couros é uma alternativa para a redução do impacto ambiental desta atividade. As enzimas comerciais existentes, ainda não possuem especificidade suficiente, tampouco suas características são conhecidas em detalhes. Além disso, sua atividade é determinada utilizando caseína como substrato, sendo que as peles bovinas não possuem esta proteína. Desta forma, é importante que características tais como atividade sobre colágeno e queratina sejam conhecidas, bem como que sejam buscadas novas enzimas para aplicação na indústria do couro e avaliada detalhadamente sua ação nos processos de ribeira. Neste trabalho, foram caracterizadas cinco enzimas comerciais, normalmente, aplicadas às etapas de remolho, caleiro e purga. Para tanto, foram testadas diferentes temperaturas, valores de pH, a estabilidade térmica das mesmas, bem como a ação de inibidores e produtos químicos comumente utilizados em conjunto com as enzimas. A temperatura ótima de ação das enzimas ficou em torno de 55°C, em valores de pH que variaram de 9 a 12, as enzimas se mostraram estáveis a 37°C e perderam totalmente sua atividade quando expostas durante 120 min. a 55°C. Com base nestes dados, foram isoladas e selecionadas, a partir de lodo da estação de tratamento de efluentes de um curtume, 10 bactérias produtoras de enzimas com possibilidade de aplicação na produção mais limpa de couros, isto é, como substituintes de produtos químicos no processo. Dentre estas 10, duas bactérias com morfologias distintas foram escolhidas para estudos mais detalhados, porém, as duas colônias foram identificadas como *Bacillus subtilis* e serão chamadas neste trabalho de BLBc 11 e BLBc 17. O meio de cultivo, o pH e a temperatura foram otimizados através do planejamento experimental. Para a seleção das variáveis significativas para a produção de proteases, uma variedade de fontes de carbono (glicose, maltose, glicerol), fontes de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, farelo de soja), sais inorgânicos (sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, sulfato de ferro heptahidratado) foram testados e identificados através do planejamento experimental Plackett-Burmann. Para a bactéria BLBc 11, os fatores que apresentaram efeito significativo para o meio de cultivo foram extrato de levedura, peptona e farelo de soja, os quais foram otimizados através de um planejamento composto central rotacional (CCR). O pH e a temperatura foram otimizados através da utilização de um planejamento fatorial, ambos apresentaram efeito significativo sobre a produção de proteases. Para a bactéria BLBc 17 o pH e a temperatura foram otimizados através de um planejamento CCR. Após estas etapas, as enzimas produzidas pelas bactérias BLBc 11 e 17 foram caracterizadas e aplicadas na etapa de depilação de peles bovinas. A ação enzimática foi avaliada com base na quantificação de proteínas interfibrilares e hidroxiprolina liberados para o banho residual, além da avaliação das amostras obtidas em microscópio óptico e de varredura. Análises comparativas (DQO, BDO e nitrogênio total) entre o processo convencional e o processo usando enzimas foram realizadas e demonstraram que o processo proposto neste trabalho tem grandes perspectivas de sucesso.

Abstract

Leather industry has been facing with new challenges and the need to improve and optimize processes in order to achieve required quality in their final articles as well as meet the environmental legislation. The enzymatic treatment of leather is a promising technology. However, the reaction kinetics of commercial enzymes available to the leather industry are not fully understood and their activities have been mainly determined over model proteins such as casein as substrate, which is absent in cattle hides. Therefore, it is important to determine their activities on collagen and keratin, the main proteins of skin; and also the screening and isolation of new enzymes in order to use these enzymes in leather processing. In this work, were tested five commercial proteases, normally applied during soaking, liming and bating operations. Thus, were tested different temperatures, pH values, the thermal stability of the enzymes and the action of inhibitors and chemicals commonly used together with them. Kinetics of temperature and pH of enzymes were very similar for all five enzymes, with maximal activities around 55°C and 9 to 12, respectively. The enzymes were stable at 37 °C and lost completely its activity when exposed for 120 min. at 55 °C. Based on these data, were isolated and selected from a tannery treatment effluent, 10 bacteria producing enzymes with potential application in cleaner leather production. Among these 10, two bacteria with different morphologies were chosen for detailed study; however, the two colonies were identified as *Bacillus subtilis* and will be called in this work BLBc 11 and BLBc 17. The culture medium, pH and temperature of cultivation were optimized through experimental design. For the selection of significant variables for protease production, a variety of carbon sources (glucose, maltose, glycerol), nitrogen sources (yeast extract, peptone, soybean meal), inorganic salts (magnesium sulfate, calcium chloride, heptahydrate ferrous sulfate) were tested and identified via Plackett-Burmann design experiments. For bacterium BLBc 11, the factors that presented significant effect for protease culture medium were yeast extract, peptone and soybean meal, these were optimized using a central composite design (CCD). The pH and the temperature were optimized using factorial design, both presented significant effect. For bacterium BLBc 17 pH and temperature were optimized using a CCD. After these steps, the enzymes produced by bacteria BLBc 11 and 17 were characterized and applied in cattle hide unhairing. This step was evaluated measuring inter-fibrillary proteins and hydroxyproline released into the bath, and also using optical and scanning electronic microscopy. Comparative analysis (COD, BOD and total nitrogen) between conventional and enzymatic process were made and show that the proposed process have excellent prospects of success.

Sumário

Introdução	1
1.1 Objetivos do trabalho	6
1.2 Limitações do trabalho	6
1.3 Estrutura do trabalho	7
Revisão Bibliográfica	9
2.1 Pele	9
2.1.1 Processamento das peles em couros	13
2.1.2 Resíduos gerados durante o processamento de peles	16
2.2 Biotecnologia	17
2.3 Enzimas	19
2.3.1 Aplicação	21
2.3.2 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas	23
2.3.3 Produção de enzimas e Nutrição microbiana	24
2.3.4 Extração das enzimas	26
2.3.5 Otimização de meios de cultivo	28
2.3.6 Cinética enzimática	30
2.4 Enzimas aplicadas à produção mais limpa de couros	31
2.4.1 Obtenção de enzimas para aplicação em couros	33
2.4.2 Aplicações diversas de enzimas na indústria curtidora	34
2.4.3 Avaliação da ação enzimática em peles	40
Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather process	43
3.1 Introduction	44
3.2 Materials and methods	45
3.2.1 Chemicals	45
3.2.2 Proteolytic assay	45
3.2.3 Keratinolytic and Collagenolytic assay	46
3.2.4 Effects of pH and temperature on enzymatic activities	46
3.2.5 Effect of inhibitors and some chemical products on the enzymatic activity	46
3.2.6 Unhairing activity	47
3.3 Results and discussion	47
3.3.1 Effects of pH and temperature on the proteolytic activities	47
3.3.2 Thermal stability of enzymes	48
3.3.3 Enzymatic activities over different proteic substrates: Azocoll, keratin azure, and azocasein	49
3.3.4 Inhibitors of enzymes activities	50
3.3.5 Enzyme application on leather unhairing	51
3.4 Conclusions	52
3.5 References	53

Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides	57
4.1 Introduction	58
4.2 Experimental	59
4.2.1 Bacteria isolation.....	59
4.2.2 Bacterial strain identification	60
4.2.3 Inocula preparation.....	60
4.2.4 Proteolytic assays	60
4.2.5 Identification of significant factors for enzyme activity using the Plackett-Burman design	61
4.2.6 Optimization of cultivation medium and conditions using the Central Composite Design	61
4.2.7 Enzymatic characterization of extracts	61
4.2.8 Measuring the unhairing activity	62
4.3 Results and Discussion.....	62
4.3.1 Isolation and identification of enzyme producing microorganisms.....	62
4.3.2 Selection of significant variables using the Plackett-Burmann design	62
4.3.3 Optimization of medium composition and culture conditions of B. subtilis BLBc 11 cultivation	64
4.3.4 Enzymatic extract characterization	67
4.3.5 Hide unhairing.....	68
4.4 Conclusions	70
4.5 References	70
Environmentally friendly leather unhairing: enzymatic leather processing for the replacement of sodium sulfide and deliming	73
5.1 Introduction	74
5.2 Materials and methods	75
5.2.1 Enzyme production	75
5.2.2 Determination of enzymatic unhairing time	76
5.2.3 Scale up and environmental comparison between conventional and enzymatic unhairing processes.....	76
5.2.4 Tanning obtained leather quality characteristics.....	78
5.3 Results and discussion	78
5.3.1 Process time determination	78
5.3.2 Scaling up the process and the environmental comparison between conventional and enzymatic unhairing processes	80
5.3.3 Tanning and leather quality characteristics.....	81
5.4 References	84
Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative	87
6.1 Introduction	88
6.2 Experimental	89
6.2.1 Screening for proteolytic activities in bacteria.....	89
6.2.2 Optimization of cultivation conditions using the Central Composite Design	90

6.2.3 Enzymatic characterization of extracts	91
6.2.4 Assessment of unhairing activity	91
6.3 Results and Discussion.....	93
6.3.1 Isolation of enzyme producing microorganisms	93
6.3.2 Optimization of culture conditions of B. subtilis Blbc 17 cultivation	93
6.3.3 Enzymatic Characterization	94
6.3.4 Hide unhairing.....	96
6.4 References	98
Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	101
7.1 Conclusões	101
7.2 Sugestões para trabalhos futuros	102
Apêndice A	115
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xi

Lista de figuras

Figura 2.1: Desenho esquemático da pele. Fonte: Reed, 1996.....	10
Figura 2.2: Desenho esquemático da camada epiderme..	11
Figura 2.3: Desenho esquemático do pelo.....	12
Figure 3.1: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica..	48
Figure 3.2: Estabilidade térmica do preparado enzimático.....	49
Figure 3.3: Testes de depilação de amostras de peles.....	52
Figure 4.1: Superfície de resposta para atividade proteolítica.....	65
Figure 4.2: Validação do modelo estatístico e equação de regressão	66
Figure 4.3: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática e estabilidade térmica do extrato enzimático	68
Figure 4.4: MEV de amostras de pele com e sem aplicação de extrato enzimático	69
Figure 5.1: Divisão da pele bovina para testes de <i>scale-up</i>	76
Figure 5.2: Resultados de microscopia óptica para diferentes tempos de depilação enzimática	79
Figure 5.3: Resultados das análises de DSC	83
Figure 6.1: Validação do modelo estatístico e equação de regressão	94
Figure 6.2: Superfície de resposta para atividade proteolítica.....	94
Figure 6.3: Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática e estabilidade térmica do extrato enzimático	95
Figure 6.4: MEV de amostras de pele com e sem aplicação de extrato enzimático da Bactéria BLBc 17. Microscopia óptica de amostras de peles cutirdas após depilação enzimática e convencional.....	97

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Algumas pesquisas já realizadas para o isolamento e seleção de novas proteases (queratinases)	5
Tabela 2.1: Produtos de origem biotecnológica e seus setores	19
Tabela 2.2: Etapas do processamento de couro nas quais há potencial para aplicação das enzimas	34
Tabela 2.3: Insumos aplicados nos processos convencional e enzimático.	35
Tabela 2.4: Conteúdo de hidroxiprolina em diferentes tipos de pele.....	42
Table 3.1: Atividade proteolítica sobre diferentes substratos	50
Table 3.2: Razões entre atividades proteolíticas sobre diferentes substratos.....	50
Table 3.3: Efeito de alguns inibidores e produtos químicos sobre a atividade enzimática	51
Table 4.1: Matriz do planejamento experimental Plackett-Burmann utilizado e as repostas experimentais correspondentes	63
Table 4.2: Efeitos estimados para a atividade enzimática a partir dos resultados do planejamento PB para <i>B. subtilis</i> BLBc 11	64
Table 4.3: Planejamento composto central para o meio de cultivo e as respostas para a atividade proteolítica	65
Table 4.4: Planejamento fatorial 2^2 para o pH e a T e as respostas para a atividade proteolítica	66
Table 4.5: Efeito de alguns inibidores e produtos químicos sobre a atividade enzimática	67
Table 4.6: Proteínas interfibrilares e hidroxiprolina liberadas no banho após processo de depilação enzimática e convencional (química).....	69
Table 5.1: Produtos químicos e tempos para o processo convencional e o enzimático...	77
Table 5.2: Produtos químicos e tempos de processo para curtimento com cromo e sem cromo	78
Table 5.3: Resultados para proteínas interfibrilares, hidroxiprolina e atividade enzimática residual para diferentes tempos de aplicação do extrato enzimático..	80
Table 5.4: Análises do efluente para o processo convencional e o enzimático	81
Table 5.5: Comparação entre as propriedades físicas e mecânicas, conteúdo de cromo no couro, temperatura de retração do couro curtido com cromo e sem cromo	82
Table 6.1: Planejamento composto central para o pH e a T e as respostas para a atividade proteolítica.....	91
Table 6.2: Produtos químicos e tempos para o processamento do couro.....	92
Table 6.3: Atividade da bactéria isolada sobre diferentes substratos e sua identificação através de 16S rRNA.	93
Table 6.4: Efeito de alguns inibidores e produtos químicos sobre a atividade enzimática	96
Table 6.5: Proteínas interfibrilares e hidroxiprolina liberadas no banho após processo de depilação enzimática e convencional (química).....	98

Capítulo 1

Introdução

A preocupação com os impactos negativos causados pelo desenvolvimento industrial ganhou maior força, principalmente, a partir dos anos 70. Nesta época, no Brasil, foi criada a Secretaria Especial de Meio Ambiente (SEMA), em resposta à Conferência de Estocolmo de 1972. Ao longo deste período muitas mudanças ocorreram resultantes de uma nova percepção da sociedade quanto à importância da proteção do meio ambiente e vêm influenciando as ações das instituições públicas e privadas. Conforme Andrade *et al.* (2010), foi a partir dos anos 90 que os setores produtivos passaram a ter uma nova percepção entre negócios e meio ambiente, expressa através da redução de custos de produção, otimização do uso dos recursos naturais, minimização da geração de resíduos e marketing de produtos e processos mais limpos.

Todavia, de acordo com Kemp e Volpi (2008), a adoção de uma nova tecnologia não é instantânea e, quanto mais economicamente atrativa, mais rapidamente ela será adotada por um número maior de companhias. Além disso, tecnologias caras e complexas tendem a se difundir de maneira mais lenta.

A indústria que transforma a pele em couro tem grande impacto ambiental, uma vez que, atualmente, utiliza grandes quantidades de água e produtos tóxicos, como sulfato básico de cromo e sulfeto de sódio. Além de gerar um grande volume de efluente a ser tratado e considerável volume de resíduos sólidos que poderiam ser reaproveitados ou tratados de forma mais adequada.

Os processos de ribeira e curtimento produzem de 80 a 90% da poluição gerada pelos curtumes (ZHI-HUA *et al.*, 2009), destacando-se a geração de gases nocivos como sulfeto de hidrogênio, lodos contendo cal, enxofre e cromo, além da elevada quantidade de água utilizada.

Por outro lado, apesar do impacto ambiental, a indústria do couro tem papel importante na economia nacional. O Brasil apresenta o maior rebanho comercializável do mundo, dados do Ministério do Trabalho indicam que o setor coureiro dispunha em 2009 de

773 estabelecimentos e 37 mil trabalhadores. Em 2010, as exportações brasileiras de couro somaram US\$ 1,74 bilhões e os principais mercados consumidores são: China, Itália, Hong Kong e Estados Unidos (GUIA DO COURO, 2011).

Entre as alternativas para redução da carga poluidora dos efluentes de curtume e a diminuição do impacto ambiental está o uso da biotecnologia, através do emprego de enzimas, por exemplo. As principais vantagens da utilização de enzimas residem na diminuição do tempo de algumas etapas do processo produtivo e a criação de sítios ativos na pele, que podem vir a melhorar o aproveitamento de alguns produtos químicos, como corantes e curtentes (KANTH *et al.* 2008 e 2009).

As enzimas são substâncias orgânicas, geralmente proteínas, conhecidas como biocatalisadores para múltiplas reações químicas e são exploradas comercialmente nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêuticas, diagnósticos, química fina, entre outras. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. A grande especificidade de uma enzima é determinada pelo tamanho e forma tridimensional, formando regiões de afinidade com os reagentes (substratos). Conforme Van Beilen e Li (2002), enzimas estão sendo usadas em diversas aplicações, entre elas: alimentos, agricultura, papel, **couro**, indústria têxtil, resultando em significativa redução de custos. Segundo os autores, o uso de enzimas é uma alternativa importante no desenvolvimento industrial sustentável.

Apesar de já estar consolidada em outras atividades industriais a utilização de enzimas na indústria curtidora ainda tem um grande caminho a seguir. Aquim *et al.* (2010) realizaram um levantamento sobre as práticas adotadas pelos curtumes no Rio Grande do Sul, entre elas a utilização de processos ambientalmente mais corretos. Os autores constataram que, atualmente, nenhum dos dez curtumes pesquisados utiliza enzimas na etapa de depilação e que 78% usam sulfetos nesta etapa, enquanto que apenas 22% fazem uso conjunto de sulfetos e auxiliares, que contribuem para a redução do uso de sulfetos.

De acordo com Reddy (2007), proteases atuam na quebra da ligação peptídica da proteína através da hidrólise catalítica. São usadas para a remoção de proteínas não fibrilares como albuminas e globulinas. Conforme Tatineni *et al.* (2008) e Macedo *et al.* (2008), queratinases tem vários usos importantes em processos biotecnológicos, podem ser utilizadas como uma alternativa para depilação de peles, em composição de detergentes, na produção de fertilizantes e rações animais, em cosméticos, na degradação de resíduos industriais e na produção de filmes biodegradáveis. Animais e plantas são incapazes de hidrolisar queratina eficientemente. Queratina é uma proteína muito estável, mas pode ser hidrolisada por queratinases intra e extracelulares produzidas por alguns fungos, bactérias e actinomicetos.

Nos processos de depilação enzimática, a etapa de caleiro pode ser omitida, uma vez que o objetivo desta etapa é prover o inchamento da pele, para que o sulfeto (convencionalmente utilizado na depilação) possa agir no interior dos folículos pilosos, eliminando vestígios de queratina dos pelos e epiderme (THANIKAIVELAN *et al.*, 2004;

THANIKAIVELAN *et al.*, 2006). Com isto, a etapa de desengalgação também se torna desnecessária.

A utilização de enzimas tem como outra grande vantagem a redução nos níveis de demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e nitrogênio.

As enzimas comerciais existentes, apesar de colaborarem para um processo ambientalmente mais correto, ainda não possuem especificidade suficiente. Tampouco suas características são conhecidas em detalhes, e por terem ação proteolítica podem provocar sérios danos a estrutura fibrosa e a flor do couro. Além disso, sua atividade é determinada utilizando caseína como substrato (BASF, 1995), sendo que as peles bovinas não possuem esta proteína. A pele bovina é constituída principalmente por colágeno e queratina (epiderme). Desta forma, é interessante que as características, tais como atividade sobre colágeno e queratina sejam conhecidas para que enzimas possam ser aplicadas no processamento de couros. A respeito de muitas destas enzimas sabe-se apenas a origem (pancreática ou microbiana) e a indicação da quantidade a ser utilizada. Os fornecedores não costumam fornecer as unidades enzimáticas contidas em certa quantidade de massa (U/mg ou U/ml).

Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo de microrganismos produtores de proteases para as mais diversas aplicações, entre elas, a aplicação na produção de couros. Entre estas proteases estão as queratinases, que podem ser aplicadas na depilação de peles, porém, na maioria dos casos são estudadas com o objetivo de solucionar outro grande problema, o tratamento e decomposição de penas de aves (DE TONI *et al.*, 2002; IONATA *et al.* 2008, RIFFEL *et al.*, 2003; YA-PENG *et al.*, 2007). Desta forma, cabe ao Laboratório de Estudos em Couro e Meio-Ambiente (LACOURO), um dos principais laboratórios de pesquisas específicas em couro e meio ambiente em âmbito mundial, dedicar suas pesquisas para identificação de novos microrganismos produtores de enzimas, estudar e detalhar suas características, possibilitando que os mesmos sejam aplicados na produção sustentável de couros. Alguns trabalhos anteriores do grupo já foram direcionados no sentido da redução de produtos químicos e água e do reuso da mesma nos processos produtivos de couro. Também foram desenvolvidas pesquisas com a aplicação de enzimas comerciais no processamento de couro e no tratamento de resíduos cromados, bem como tem sido estudada a utilização de resíduos na obtenção de produtos para o curtimento de peles (sulfato básico de cromo) (GUTTERRES *et al.*, 2010, PASSOS *et al.*, 2006, SOUZA *et al.*, 2010, DETTMER *et al.*, 2010 a, b).

Entre os principais desafios deste trabalho estão conhecer as características das enzimas comerciais já utilizadas no processamento de couros, sua resistência térmica, melhor temperatura e pH de atuação, além da influência dos produtos químicos normalmente utilizados nos processos conjuntamente com as enzimas. Apesar dos diversos trabalhos publicados na literatura, poucos abordam o impacto ambiental da utilização das enzimas no processo como um todo, ou seja, os autores cumprem as seguintes etapas de pesquisa: isolamento, seleção dos microrganismos de interesse, caracterização da enzima, purificação, conforme levantamento apresentado na Tabela 1.1, e não há avanços para a aplicação em escalas maiores na produção de couros. A maior parte dos pesquisadores dá-se por satisfeita, quando ocorre a depilação de algumas áreas, em alguns casos, ainda com utilização de

utensílios (espátulas e pinças) para realizar a raspagem (depilação) mecânica. Além disso, não há investigação do efeito da utilização destas enzimas sobre a resistência à tração e alongamento dos couros, bem como estudos de redução do impacto ambiental causado e da viabilidade de utilização em escala piloto. Além disso, há a possibilidade de eliminar a etapa de caleiro, na qual grande quantidade de cal (e logo, altos valores de pH) é utilizada. Conforme Madhan *et al.* (2010), embora o caleiro e a desencalagem sejam processos anteriores ao curtimento, é nestas etapas que são gerados entre 60-70% do total da carga poluidora de todo o processamento de peles.

Tabela 1.1: Algumas pesquisas já realizadas para o isolamento e seleção de novas proteases (queratinases)

Isolamento	Caracterização	Purificação	Substratos testados	Estudo do impacto ambiental	Aplicação em amostras de pele	Pesquisa desenvolvida	Autor/Periódico
	X	X	<i>Keratin azure</i> , azoqueratina, azocaseína, <i>azocoll</i> e substratos fluorogênicos.	Não	Não	Isolamento e caracterização de uma enzima com atividade sobre queratina.	Macedo <i>et al.</i> (2008) - J. Microbiology
	X	X	<i>Keratin azure</i> , azoqueratina, azocaseína e substratos fluorogênicos.	Não	Não	Purificação e caracterização de uma queratinase com propriedade de degradação de penas de aves.	De Toni <i>et al.</i> (2002) - Can. J. Microbiol.
-	-	-	-	Sim	Sim	Utilização de enzimas comerciais em um processo de depilação e caleiro misto (enzima + produtos químicos).	Sivasubramanian <i>et al.</i> (2008) a - Chemosphere
	X		Caseína, congo red (determinação de atividade sobre elastina), Falgpa.	Não	Sim	Depilação enzimática de peles bovinas e estudo histoquímico da peles obtidas.	Sivasubramanian <i>et al.</i> (2008) b - Chemosphere
X	X		Caseína	Sim	Sim	Utilização de enzimas isoladas do <i>Aspergillus tamaritii</i> na depilação de peles de cabras.	Dayanandan <i>et al.</i> (2003) - J. Clean. Prod
X	X	X	<i>Keratin azure</i>	Não	Não	Caracterização e purificação de enzima isolada do <i>Streptomyces</i> sp.	Tatineni <i>et al.</i> (2008) - Bioresource Technology
X	X	X	Queratina, penas de aves, colágeno, BSA, caseína, lã de ovelha.	Não	Não	Purificação, caracterização e imobilização de queratinases de <i>Aspergillus oryzae</i>	Farag <i>et al.</i> (2004) - Enzyme and Microbial Technology
X	X	X	Caseína, BSA, Colágeno, <i>Keratin azure</i> , <i>azocoll</i> , Elastin-congo red,	Não	Não	Isolamento de uma queratinase capaz de crescer em penas de aves e com capacidade para degradar as mesmas.	Ionata <i>et al.</i> (2008) - Microbiological Research
X	X	X	Caseína.	Não	Não	Caracterização, purificação de uma protease capaz de crescer em penas de aves	Gessesse <i>et al.</i> (2003) - Enzymes and Microbial Techn.
	X		Caseína, gelatina, BSA, queratina solúvel e elastina, cabelos humanos, penas de aves.	Não	Não	Produção, caracterização de uma queratinase de um <i>Streptomyces gulbargensis</i> ,	Syed <i>et al.</i> (2009) - Bioresource Technology
X	X		Azocaseína, azoqueratina	Não	Sim	Caracterização de uma queratinase da bactéria Bacillus, isolada do ambiente Amazônico	Giongo <i>et al.</i> (2007) - World J Microbiol. Biotechnol.
X	X		Caseína, <i>keratin azure</i> , queratina humana, azocaseína.	Não	Não	Isolamento e caracterização de uma queratinase do gênero <i>Streptomyces</i>	Ya-Peng <i>et al.</i> (2007) - J. Environmental Sciences
	X	X	Caseína, <i>keratin azure</i>	Não	Não	Caracterização e purificação de uma enzima isolada da espécie <i>Cryseobactrium</i>	Riffel <i>et al.</i> (2007) - J. Biotechnol.

1.1 Objetivos do trabalho

Os objetivos principais deste trabalho são: caracterizar as enzimas comerciais; realizar a seleção e o isolamento de bactérias produtoras de novas enzimas com possibilidade de utilização no processamento de couros, na etapa de depilação/caleiro; dentre as bactérias selecionadas eleger aquelas com as características mais adequadas (tais como ação sobre a queratina e ação proteolítica) aos objetivos deste trabalho para estudos mais aprofundados; realizar a otimização do meio e das condições de cultivo; realizar estudos de aplicação das enzimas em peles; efetuar estudos comparativos entre o processo convencional de depilação de peles e o processo proposto neste trabalho (substituição total de produtos químicos por enzimas), por meio de análise de parâmetros como DQO e DBO, nitrogênio total e sulfetos, além da quantificação de proteínas interfibrilares removidas durante os processos, bem como a análise de hidroxiprolina nos banhos residuais.

1.2 Limitações do trabalho

Este trabalho científico apresenta algumas limitações, as quais podem ter influenciado alguns resultados obtidos, são elas:

Amostras de pele/pele utilizada: para realização dos testes utilizaram-se amostras retiradas da zona chamada grupão, região central da pele e de características mais uniformes. Para os experimentos comparativos entre o processo convencional e o enzimático, uma pele bovina inteira foi utilizada, foram removidas (desprezadas) apenas as aparas mais salientes. Por se tratar de um material natural, variações naturais nas propriedades físico-químicas (resistência ao rasgamento, proteínas interfibrilares, etc.) são esperadas, pois estas variam de acordo com a raça, sexo e idade do animal. Logo, o valor absoluto pode variar para outras peles, mas para efeitos de comparação entre os processos os resultados tem validade.

Escala de trabalho: Os testes iniciais para determinação da ação de depilação das enzimas utilizadas neste trabalho foram realizados em fulões de bancada, com capacidade para no máximo 300 g de pele. Os testes posteriores (resultados apresentados no artigo 3) foram realizados em fulões com maior capacidade (até 3 kg), estes fulões não foram utilizados anteriormente porque são aquisição recente do LACOURO, pois foram entregues para uso em maio de 2011. Os experimentos utilizando uma pele inteira foram realizados em fulão piloto. Em virtude do efeito mecânico, que conforme a literatura é importante na remoção de proteínas interfibrilares, podem ser obtidos resultados diferentes para estas análises quando os experimentos forem realizados em escalas diferentes.

Formulação escolhida para o processo: na etapa de comparação entre o processo convencional (artigo 3) foi utilizada uma formulação fornecida por um curtume parceiro do LACOURO. Assim, alguns resultados podem ser influenciados por esta formulação (tais como DQO, DBO e nitrogênio), em função da quantidade e dos produtos químicos usados. Todavia, isto não impede que se estabeleça um comparativo entre o processo convencional e o processo proposto neste trabalho.

1.3 Estrutura do trabalho

O presente trabalho está estruturado em 7 capítulos, conforme segue:

No capítulo 2 será apresentada uma revisão bibliográfica. Será abordada a composição da pele bovina, bem como as principais etapas que envolvem o processamento das peles e os resíduos gerados, sobretudo, pelas etapas de depilação e caleiro. Em seguida, serão apresentados possíveis empregos da biotecnologia no processamento de peles, em especial por meio de enzimas. A cinética enzimática, a obtenção de enzimas e a sua aplicação na produção mais limpas de couros também serão apresentados. A remoção de proteínas interfibrilares e suas consequências para a qualidade final da pele serão abordadas.

Os materiais e métodos, bem como os resultados e discussão serão apresentados nos artigos escritos como resultado deste trabalho de doutorado.

No capítulo 3 é apresentado o primeiro artigo gerado por este trabalho: “*Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather process*”. Neste artigo foi realizada a caracterização de enzimas comerciais fornecidas pelas empresas Buckman Laboratórios e Tanquímica (representante da Novozymes). As enzimas foram caracterizadas quanto ao seu melhor pH e temperatura de ação. Além disso, foi investigada a sua estabilidade térmica, bem como a possibilidade das mesmas serem inibidas por alguns produtos químicos comumente utilizados no processamento de peles. Também foram realizados ensaios de aplicação das enzimas comerciais em amostras de peles.

No capítulo 4 é apresentado o segundo artigo, com o título: “*Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides*”, o qual trata do isolamento e seleção de uma bactéria (BLBc 11) a partir do lodo de uma estação de tratamento de efluentes de um curtume. Bactéria esta que produz uma nova protease, capaz de substituir o sulfeto de sódio na depilação de peles bovinas. Neste artigo também é apresentada a otimização do cultivo deste microrganismo, através do planejamento experimental Plackett-Burman e posteriormente, com utilização de um planejamento composto central. A caracterização das enzimas também é apresentada, além disso, foi realizada a aplicação das enzimas em amostras de pele, com posterior análise de proteínas interfibrilares e hidroxiprolina.

No capítulo 5 é apresentado o terceiro artigo, com o título: “*Environmentally friendly leather unhairing: enzymatic leather processing for the replacement of sodium sulfide and delimidig*”, o qual apresenta um comparativo entre o processo de depilação enzimático, usando a bactéria BLBc 11, frente ao convencional, utilizando sulfetos. Foram realizadas análises de hidroxiprolina e proteínas interfibrilares nos banhos residuais, além de comparação entre os valores de DQO, DBO, nitrogênio e sulfetos entre os dois processos. A resistência mecânica das peles obtidas nos dois processos também foi avaliada, bem como a sua estabilidade hidrotérmica.

No capítulo 6 é apresentado o quarto artigo, com o título: “*Optimization of unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of the inter-fibrillary proteins removal: and environment-friendly alternative*”, o qual apresenta os resultados obtidos para a

otimização do meio e das condições de cultivo da bactéria BLBC 17. Amostras de pele submetidas ao processo convencional de depilação e o processo enzimático proposto neste trabalho foram curtidas e avaliadas em microscópio óptico. Os banhos residuais foram analisados quanto ao teor de proteínas interfibrilares e hidroxiprolina.

No capítulo 7 são apresentadas as conclusões e as sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é feita a revisão bibliográfica sobre a constituição da pele, matéria prima da indústria coureira, com breve apresentação das etapas que envolvem sua transformação em couro. A etapa de depilação e caleiro será abordada com maior atenção.

A aplicação da biotecnologia, principalmente o uso de enzimas, no processamento de couros também será apresentada, bem como a caracterização e a cinética enzimática.

O isolamento e a otimização do cultivo de bactérias produtoras de enzimas com possível aplicação na produção mais limpas de couros também serão apresentados.

2.1 Pele

A pele é a camada que reveste o corpo dos animais superiores, geralmente coberta por pelos ou lã, a fim de conferir-lhes proteção a agentes externos. É composta essencialmente de água, sais minerais, gordura natural e material protéico, ao lado de baixas quantidades de pigmentos e carboidratos.

De acordo com Gutterres (2003), os materiais protéicos são de grande importância para as funções da pele no animal vivo, e também, como matéria prima para a fabricação de couros.

A estrutura da pele é verificada com um corte transversal como está representado na Figura 2.1, que mostra as três camadas formadoras da pele: epiderme, derme e hipoderme.

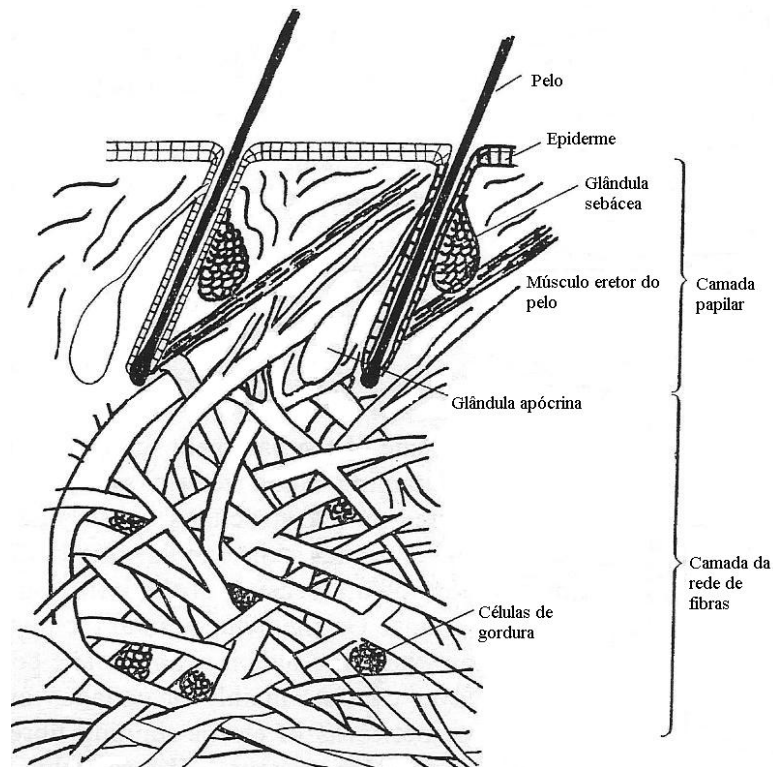


Figura 2.1: Desenho esquemático da pele. Fonte: Reed, 1996

A epiderme é a camada mais fina e externa da pele, possui como função principal a proteção do organismo contra agentes externos nocivos, representa 1% da espessura total e é removida nas operações de depilação e caleiro (HOINACKI, 1994; HERFELD, 1990). Apesar de sua pouca espessura, entre 25 e 40 micrômetros, a epiderme possui 3 subcamadas: a qual é formada por uma camada córnea exterior, uma camada granular intermediária e uma camada mucosa interna (camada de Malpighi), dividida em duas partes: *stratum spinosum* e *stratum basale*. São nessas subcamadas que as células da epiderme se renovam. O *stratum basale* (subcamada mais interna) é a porção da epiderme que se conecta a derme. Essa conexão é feita através da membrana Basal. A camada de Malpighi contém células de aparência gelatinosa e baixa resistência, que são facilmente atacadas por bactérias e álcalis. Os pelos e a melanina, responsável pela sua coloração, tem origem na camada de Malpighi. Um desenho esquemático da epiderme está apresentado na Figura 2.2.

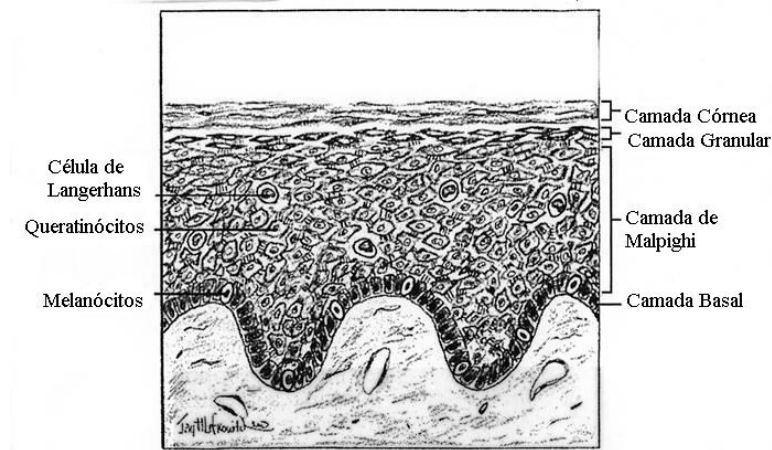


Figura 2.2: Desenho esquemático da camada epiderme. Fonte: <<http://cueflash.com/Decks/UmmsDermatology>>, acesso em 10 de novembro, 2011.

O principal componente da epiderme é um grupo de proteínas conhecido como queratinas, a concentração destas nas células varia ao longo das camadas citadas anteriormente. Partindo da camada de Malpighi (mais interna), o grau de queratinização das células aumenta até atingir o nível mais elevado, encontrado na camada córnea (mais externa).

A epiderme e as subcamadas do pelo possuem diferentes graus de queratinização e distintos tipos de queratinas. A parte externa do pelo possui de 3 a 4 vezes mais cistina que a camada córnea da epiderme. Os tipos de queratina que formam as diferentes porções do pelo não possuem a mesma resistência química. Isso é explicado pelo número de pontes dissulfídicas: as queratinas macias presentes na raiz do pelo e na epiderme possuem menor número de pontes dissulfídicas por molécula que as queratinas duras presentes na haste do pelo. Isso ajuda a explicar a maior resistência química do pelo em relação à epiderme (SOUSA, 2006; GALARZA *et al.*, 2009).

Além das queratinas, outras substâncias desempenham papel muito importante na impermeabilização e consistência física da epiderme. O espaço intercelular das subcamadas da epiderme é preenchido por uma secreção rica em glicolipídeos e esteróis, que criam uma barreira à prova d'água na epiderme. Além dessa secreção, as células da epiderme estão interconectadas por desmossomos: glicoproteínas especializadas na função de conectar células.

O principal constituinte do pelo é a queratina. A região central do pelo é formada por células alinhadas em colunas e é denominada medula. Envolvendo a medula existe um agregado de pequenas células chamado córtex, o qual é envolvido por uma camada de células planas denominadas cutícula. Envolvendo essa porção central existem 3 camadas: bainha interna, camada adjacente e bainha externa, estas camadas são presentes apenas na região do pelo denominada raiz. A parte visível do pelo (haste) é formada apenas pela cutícula, córtex e medula, sendo que as três camadas presentes na raiz do pelo se fundem à epiderme. O folículo piloso, onde o pelo é produzido, encontra-se fixo à derme por meio da papila dérmica (SOUSA, 2006). Todas estas camadas estão apresentadas na Figura 2.3.

Considerando o pelo ao longo do seu comprimento, ele é composto de uma série de segmentos. A diferenciação entre estes segmentos está na organização das proteínas de queratina, iniciando das células do bulbo com a síntese de pré-queratinas, passando por uma área de fibrilação e alcançando a estabilidade através da queratinização (GALARZA *et al.*, 2009).

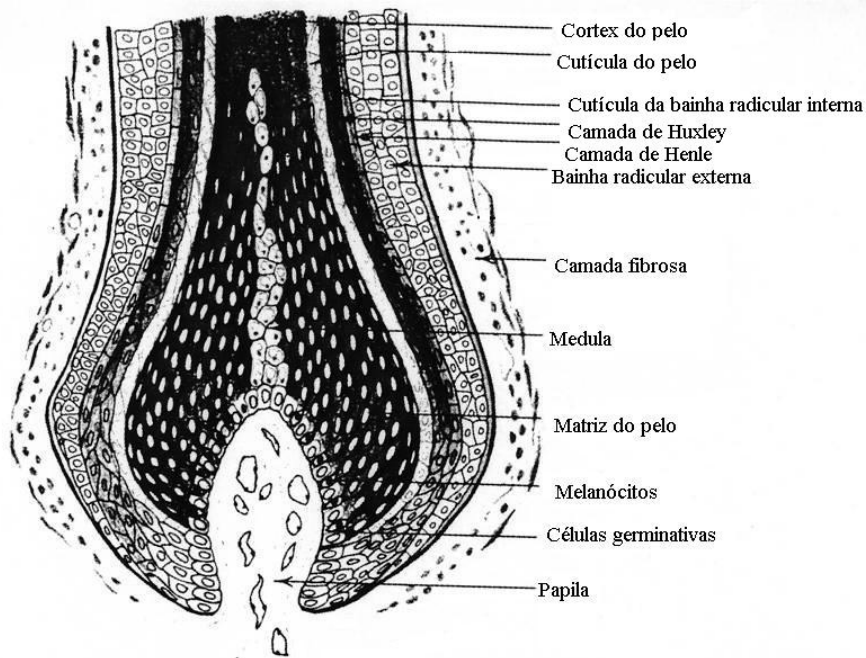


Figura 2.3: Desenho esquemático do pelo. . Fonte: <<http://cueflash.com/Decks/UmmmsDermatology>>, acesso em 10 de novembro, 2011.

O processo pelo qual a queratina é formada no pelo e na camada córnea da epiderme é chamado de queratinização. Basicamente, o processo consiste na formação de pontes de dissulfeto a partir dos grupos tiol (-SH). Durante a queratinização, o córtex é enriquecido com cistina e metionina, formando um pelo com grande estabilidade, força e propriedades fibrosas em relação à epiderme e a raiz do pelo. A queratina do córtex é chamada queratina dura e a da epiderme e raiz do pelo é chamada queratina macia.

A derme constitui a camada intermediária, mais espessa da pele, compreende 85% da espessura e é mantida nos processos de fabricação para ser transformada em couro. A derme é constituída por um tecido resistente, flexível, elástico e extraordinariamente firme de finas fibras de proteína. A derme está constituída pelas camadas papilar e reticular. O couro é formado pela proteína de colagênio modificada quimicamente. Já a hipoderme ocupa 14% da espessura e é removida nos curtumes, na operação de descarte (GUTTERRES, 2009).

O colagênio não é uma substância única, mas sim uma família de substâncias. São conhecidos em torno de 30 tipos diferentes de colagênio, estes diferem em suas características químicas e estruturais, de acordo com a sua função no organismo. As principais características são a sua conformação na hélice tríplice, o conteúdo elevado de hidroxiprolina, aminoácido específico do colagênio, e sua ocorrência na matriz extracelular. O colagênio do tipo I é o mais abundante nas peles animais (REICH, 2007). Em mamíferos, aproximadamente 30% do total de proteínas consiste em colagênio. O termo “colagênio” vem do grego e significa cola,

foi descrito inicialmente como o constituinte conectivo de tecidos/pele, que se torna gelatina quando aquecido.

Sabe-se que o colagênio é a principal proteína do corpo dos animais (GUTTERRES, 2004), e que as proteínas são compostos formados pela reação de polimerização (por condensação) de um número muito grande de α -aminoácidos, dando origem a mais de 100 ligações peptídicas.

Duas características diferenciam o colagênio das outras proteínas, como a composição dos aminoácidos, sendo que 33% do conteúdo total, neste caso, são de resíduos de glicina, e outra característica é o padrão de largos ângulos de difração de raios-X.

2.1.1 Processamento das peles em couros

O processo que visa transformar a pele verde ou salgada em couro é composto por três fases principais de processamento (ribeira, curtimento e acabamento), subdivididas em várias operações. A seguir será apresentada uma breve explicação do processamento, os textos a seguir são baseados em Hoinacki *et al.*, 1994; Gutterres, 2009 e Sousa, 2006.

Ribeira – consiste em operações em meio aquoso e operações mecânicas que visam limpar e preparar a pele para o curtimento. As principais operações desta etapa são: pré-descarne, remolho, depilação e caleiro, descarne e divisão, desencalagem, purga e píquel.

Pré-descarne

O pré-descarne é realizado em máquina descarnadeira que tem por objetivo a prévia eliminação dos materiais aderidos ao carnal, como o tecido adiposo. Algumas das vantagens de realizar o pré-descarne são a facilidade de manuseio da pele, a penetração mais rápida e uniforme dos produtos químicos e a possibilidade de padronizar a ribeira, obtendo-se uma maior valorização dos subprodutos sebo e proteína da hipoderme.

Remolho

O remolho é uma etapa de limpeza e reidratação das peles. Os principais objetivos do remolho são: interromper a conservação da pele e retorná-la, o máximo possível, ao estado de pele fresca; reidratar a pele uniformemente em toda a sua superfície e espessura; extrair as proteínas globulares; retirar os produtos químicos eventualmente adicionados durante a conservação; extrair materiais (como sangue, sujeiras e esterco) e preparar as peles adequadamente para as operações e processos seguintes.

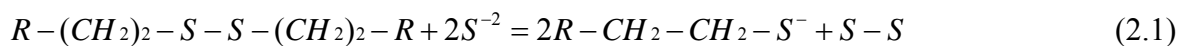
O remolho é uma etapa de suma importância para o couro. Um remolho mal feito ou insuficiente pode ocasionar sérios inconvenientes para os processos seguintes, resultando em problemas de qualidade para o couro. Alguns dos problemas são: manchas, flor solta (descolamento entre as camadas termostática e reticular) e couro armado (sem maciez). Isto é explicado pelo fato de todos os produtos químicos, utilizados na depilação, curtimento e tingimento, penetrarem na pele por meio da água. Assim, nas zonas da pele mal remolhada a água não penetra tão facilmente como nas zonas bem remolhadas, onde haverá maiores quantidades e ação de produtos químicos.

Depilação/ caleiro

A operação de depilação/caleiro é feita para atender os seguintes objetivos: retirar o pelo ou a lâ da pele, remover a epiderme, intumescer e separar as fibras e fibrilas do colagênio. O sistema mais usado e conhecido é o sistema cal-sulfeto.

Macroscopicamente, a depilação consiste na remoção de pelo e epiderme. Isso significa enfraquecer e até destruir a queratina formadora do pelo e da epiderme. Para que isso ocorra, as pontes dissulfídicas e de hidrogênio que estabilizam a proteína queratina devem ser eliminadas. As pontes de hidrogênio, mais fracas que as dissulfídicas, podem ser destruídas por ação de bases de Lewis, substâncias doadoras de elétrons, como OH^- , H_2NR , HSR ou outros.

Já as pontes dissulfídicas necessitam, além da alcalinidade fornecida por grupos OH^- , também de compostos capazes de substituir o enxofre presente no aminoácido cistina, evitando assim a reestruturação das pontes. A equação 2.1 apresenta a reação de substituição nucleofílica que ocorre no processo de depilação.



Os compostos empregados atualmente e que apresentam maior poder depilatório são os sais do íon sulfeto. Apesar de serem excelentes agentes depilantes, os íons sulfeto também requerem certo grau de alcalinidade para reagir de maneira completa com a cistina. No caso do sulfeto de sódio, essa alcalinidade é parcialmente suprida pela dissociação alcalina desse sal em água. A alcalinidade restante é provida pelo hidróxido de cálcio.

A destruição e a dissolução do pelo baseiam-se na ruptura das pontes dissulfídicas. Na depilação sem destruição do pelo, há parcial ou total destruição dos tecidos que sustentam o pelo, ou seja, os componentes da epiderme circundante ao folículo e a raiz do pelo. A queratina destes tecidos contém poucas pontes dissulfídicas se comparada com as queratinas duras. O pelo é muito resistente à degradação porque durante o processo de queratinização, a queratina do córtex é reforçada por pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteínas adjacentes levando aos aminoácidos de cistina como produto final e gerando *crosslinking* muito forte. Este processo confere grande estabilidade ao pelo elevando suas propriedades fibrosas e, conseqüentemente, sua resistência à hidrólise.

Estudos histológicos demonstram que enzimas proteolíticas digerem as células da camada de Malpighi e as células basais do bulbo do pelo e que também afetam a medula, mas não o córtex. Queratinas podem ser rapidamente digeridas por enzimas proteolíticas, uma vez que as ligações de dissulfeto sejam rompidas (GALARZA *et al.*, 2009).

Grande parte dos resíduos/efluentes gerados pelos curtumes são provenientes das operações de depilação e caleiro. Conforme Galarza *et al.* (2009), a quantidade de matéria orgânica e a presença de sólidos suspensos nos efluentes gerados depende, principalmente, do processo de depilação utilizado. O processo convencional com destruição do pelo baseado no uso de sulfeto de sódio contribui para valores máximos de poluição nesta etapa. O

desenvolvimento de processos de depilação sem destruição do pelo está causando uma mudança nas tecnologias tradicionais da indústria do couro. De acordo com Galarza *et al.* (2009), os pelos recuperáveis podem representar até 10% do peso de uma pele bovina salgada.

Descarne

O descarne é realizado em máquina de descarnar que tem por objetivo eliminar os materiais aderidos ao carnal (tecido subcutâneo e adiposo). Sua finalidade é facilitar a penetração dos produtos químicos aplicados em etapas posteriores. Antes do descarne, a pele geralmente sofre recortes visando aparar e remover apêndices que não foram removidos no matadouro ou frigorífico.

Divisão

Em seguida ao descarne, a pele é submetida à divisão em duas camadas: a camada superior (flor) e a inferior (raspa).

Desencalagem

A desencalagem visa eliminar a cal da pele. A cal está na pele sob diferentes formas. Uma fração está ligada a grupos reativos da pele, outra está em suspensão ou em solução e a terceira está na forma de sabões de cálcio. Antes de iniciar o processo de desencalagem propriamente dito, efetua-se uma lavagem, a qual visa remover a cal que está em suspensão ou em solução. A remoção da cal quimicamente combinada ocorre através da reação com substâncias que formam compostos solúveis com o cálcio.

Purga

As purgas são preparações constituídas por uma mistura de substâncias, que apresentam enzimas, sais amoniacais e um suporte inerte. Na purga, enzimas proteolíticas limpam a pele dos restos de epiderme, pelo e gordura, originando uma flor mais fina e sedosa.

Píquel

O píquel tem por objetivo preparar as fibras de colagênio para uma fácil penetração do agente curtente. A finalidade desta etapa é acidificar a pele, além de completar a desencalagem, pois a cal quimicamente ligada só pode ser totalmente eliminada com baixos valores de pH.

Curtimento – nesta etapa o agente curtente, sendo mais empregado o sal de cromo, reage com a proteína da pele, garantindo resistência à putrefação e estabilização química e hidrotérmica da estrutura.

Acabamento – consiste em operações de acabamento molhado (inclui desacidulação, recurtimento, tingimento e engraxe), pré-acabamento e acabamento que conferem ao couro as suas características finais, tais como firmeza do couro, cor e maciez.

2.1.2 Resíduos gerados durante o processamento de peles

A indústria que transforma a pele (material bruto, putrescível) em couro (material transformado, resistente a hidrólise, imputrescível) tem grande impacto ambiental, uma vez que, atualmente, utiliza grandes quantidades de água e produtos tóxicos, como sulfato básico de cromo e sulfeto de sódio. Gera um volume considerável de efluente com elevada carga orgânica a ser tratada e considerável volume de resíduos sólidos que poderiam ser reaproveitados ou tratados de forma mais adequada.

Apesar do alto impacto ambiental, a indústria curtidora tem grande importância econômica nas regiões onde está inserida. O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de couros. Em 2010, foram produzidos 40 milhões de couros no país tendo sido produzidos 308 milhões em todo o mundo, ou seja, o Brasil foi responsável por 13 % da produção mundial. O Rio Grande do Sul é o estado com mais estabelecimentos de curtimento e outras preparações (221 em 2009) gerando 13.000 empregos nesse Estado (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2011).

Os resíduos gerados pela indústria durante o processamento de peles podem ser classificados em: resíduos de colagênio não curtido, resíduos de colagênio curtidos e resíduos não proteicos.

O processamento de peles envolve uma série de operações unitárias, nas quais, a depilação é uma das primeiras entre as etapas de transformação de peles em couros. Conforme Zhi-Hua *et al.* (2009), o processo de depilação convencional é responsável pela maior parte dos poluentes lançados pela indústria, tais como sulfetos e cálcio, esta operação contribui para 80-90% do total da poluição gerada pela manufatura de peles.

Conforme Galarza *et al.* (2009), o desenvolvimento de tecnologias de depilação sem destruição do pelo, seguido por filtração do banho residual, pode contribuir para uma redução significativa na carga poluidora dos efluentes. Segundo os autores, neste caso, a carga orgânica, expressa em termos de demanda química de oxigênio (DQO) do efluente de caleiro pode ser reduzida entre 40-60%, a concentração de sulfetos em torno de 50% e os sólidos suspensos em torno de 75%. Além disso, os banhos de caleiro podem ser reciclados, de acordo com Winter (2010) e Cooper *et al.* (2011), ciclos de banho de caleiro são largamente praticados nos curtumes do Brasil e no Rio Grande do Sul, sendo que, quando há necessidade de descarte deste lodo, ele tem destinação em solo agrícola.

Cálcio e sulfetos são comumente utilizados na depilação devido ao seu baixo custo, porém, o alto grau poluidor e a necessidade de substitutos para os mesmos têm sido enfatizados pelos pesquisadores (PRIYA *et al.*, 2008).

Processos de depilação usando sulfetos podem gerar gases tóxicos e anions, como H_2S , HS^- e S^{2-} (Zhi-Hua *et al.*, 2009). O sulfeto de hidrogênio ou gás sulfídrico (H_2S) que emana dos processos de depilação pode ser fatal, mesmo em concentrações menores que 200 ppm (PRIYA *et al.* 2008). Irritação nos olhos tem sido descrita como a primeira manifestação causada pelo sulfeto de hidrogênio em pequenas concentrações (LAMBERT *et al.*, 2006).

Exposição a altos níveis de H₂S em humanos tem sido associada a problemas respiratórios e neurológicos (SKRAJNY *et al.*, 1996).

O uso intenso do sulfeto não tem apenas consequências desfavoráveis para o meio-ambiente, ele também pode afetar a eficácia das estações de tratamento de efluente. (DAVIES, 1997).

Assim, a aplicação da biotecnologia, principalmente a utilização de enzimas na produção de couros, é uma alternativa para a redução do impacto ambiental desta atividade. Através da mesma, podem ser desenvolvidos processos com a diminuição do emprego de produtos químicos nocivos à saúde humana e ao meio-ambiente. Apesar de já estar consolidada em outras aplicações industriais, a utilização da biotecnologia neste caso, necessita de mais pesquisas para possibilitar seu uso em larga escala.

2.2 Biotecnologia

A biotecnologia é a mais promissora estratégia para elevar a produção mundial de alimentos e melhorar a qualidade de vida do homem (SBBIOTEC, 2010).

Existem várias definições para o termo biotecnologia, conforme a convenção sobre diversidade biológica da ONU:

“Biotecnologia define-se pelo uso de conhecimentos sobre processos biológicos e sobre propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade.”

Além disso, pode-se chamar de biotecnologia o conjunto de conhecimentos que permite a utilização de agentes biológicos (organismos, células, organelas, moléculas) para obter bens ou assegurar serviços. A biotecnologia abrange diferentes áreas do conhecimento que incluem a ciência básica (biologia molecular, microbiologia, biologia celular, genética, genômica, embriologia), a ciência aplicada (técnicas imunológicas, químicas e bioquímicas) e outras tecnologias (informática, robótica e controle de processos). A biotecnologia tem impacto em vários setores produtivos, oferecendo novas oportunidades de emprego, proporcionando plantas resistentes a doenças, plásticos biodegradáveis, biocombustíveis, processos industriais e agrícolas menos poluentes e, métodos de biorremediação do meio ambiente.

Conforme Kreysa *et al.* (2005), nos últimos anos, têm se observado na indústria química, um crescimento no uso dos processos biotecnológicos em biocatálise e biotransformação.

De acordo com Kreysa *et al.* (2005), a biocatálise é efetiva quando o processo envolve uma reação com completa reorganização da cadeia de carbono. Além disso, pode ser conduzida a baixas temperaturas e pressão atmosférica, esses fatores aliados a rendimentos altos em curto espaço de tempo, custo relativamente baixo, matérias primas renováveis e, em muitos casos, a redução do impacto ambiental têm contribuído para o aumento do uso deste

processo, estima-se que existam mais de 130 processos biocatalisados. A biocatálise é utilizada, principalmente, na obtenção de produtos de alto valor e químicos especiais. Porém, está sendo aplicada também em largas escalas de produção, tais como em suplementos alimentares (L-lisina), aromatizantes (L-glutamina), antibióticos, vitaminas, ácidos cítrico e láctico.

Conforme Kreysa *et al.* (2005), a principal dificuldade para o desenvolvimento eficiente do processo de biocatálise, em nível industrial, é a dependência da ocorrência natural das enzimas. Segundo Van Beilen e Li (2002), estudos realizados pela Organização para o Desenvolvimento e a Cooperação Econômica (OECD) indicaram o crescimento do uso da biotecnologia na indústria. Quinze entre 21 casos estudados tinham processos enzimáticos como base, em todos estes casos os custos de operação foram reduzidos de 9 a 90%, energia e fontes naturais foram economizados.

Levantamento feito pela Fundação Biominas, entidade privada de fomento à biotecnologia, aponta que o Brasil encerrou o ano de 2008 com 253 empresas na área de biociências. Os números mostram que o setor caminha, mesmo que de maneira lenta, para a expansão: em 2007, eram apenas 181 companhias. Em 2008, quase um terço (30,8%) das empresas nacionais de biociência estavam voltadas para atividades na área de Saúde Humana. Em seguida, figuravam os investimentos em estudos em Agricultura (18%), Insumos e Saúde Animal (ambos com 16% do total) (CARVALHO, 2010).

A pesquisa mostra, ainda, que a região Sudeste abrigava 71,9% do total das empresas. Belo Horizonte era a líder individual, com 34 companhias. As cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre também estavam entre os pólos mais importantes do País na área de biociência. O retrato do setor de biotecnologia brasileiro revela que as empresas do setor são jovens, já que 67,7% foram criadas na última década. O retorno financeiro se mostrou tarefa difícil de ser atingida: 44,4% afirmaram que tiveram, em 2008, faturamento de até R\$ 1 milhão. Outra fatia significativa, de 17,3%, disseram nunca terem alcançado nenhum faturamento (CARVALHO, 2010). A Tabela 2.1 apresenta os principais produtos de origem biotecnológica em diversos setores.

Tabela 2.1: Produtos de origem biotecnológica e seus setores

Setores	Bens e serviços
Agricultura	Adubo composto, silagem, plantas transgênicas
Alimentação	Pães, queijos, cerveja, proteína unicelular, aditivos (uso de enzimas na preparação de alimentos)
Química	Butanol, acetona, glicerol, ácidos, enzimas, polímeros, biocatálise
Eletrônica	Biossensores
Energia	Etanol a partir de biomassa, biogás
Meio ambiente	Recuperação de petróleo, tratamento do lixo, purificação da água, biorremediação
Saúde	Antibióticos, hormônios e outros produtos farmacêuticos, vacinas, reagentes e testes para diagnóstico, engenharia de glicoproteínas
Materiais	Papel, têxteis, tratamento do couro

Na indústria do couro algumas alternativas biotecnológicas, especialmente para o tratamento de resíduos, têm sido pesquisadas:

Mandal *et al.* (2010) estudaram um processo conjunto para tratamento de efluentes líquidos de curtume. Os autores utilizaram um tratamento com sulfato de ferro (FeSO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 30 minutos e após, 72 h de tratamento biológico com a bactéria *T. ferrooxidans*, com operação em batelada. Neste processo, foi possível obter 93%, 98%, 72%, 62% e 100% eficiência de remoção de DQO, DBO, sulfetos, cromo e cor, respectivamente, com valor de pH 2,5 e 30°C.

Zahoor e Rehman (2009) pesquisaram a utilização das bactérias *Bacillus* e *Staphylococcus* para a redução de cromo VI e biorremediação de águas residuais contendo cromo e outros metais pesados. Ao utilizar a espécie *Bacillus* os autores obtiveram uma redução de 85% da quantidade inicial de cromo VI contido no efluente industrial, quando a espécie *Staphylococcus* foi usada e alcançaram 81% de redução do metal.

Bajza e Vrcek (2001) compararam a recuperação de proteínas de resíduos de peles não curtidas através de duas metodologias diferentes: o tratamento térmico e tratamento enzimático. De acordo com os autores, o tratamento enzimático apresentou melhores resultados, embora com ambos os tratamentos tenha sido possível obter produtos em pó contendo proteína hidrolisada de couro e produtos semelhantes com gelatina.

2.3 Enzimas

As enzimas são substâncias orgânicas, geralmente proteínas, conhecidas como biocatalisadores para múltiplas reações químicas e são exploradas comercialmente nas indústrias de detergentes, alimentos, farmacêuticas, diagnósticos, química fina, entre outras. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. A grande especificidade de uma enzima é determinada pelo tamanho e forma tridimensional, formando regiões de afinidade com os reagentes (substratos).

De acordo com Voet *et al.* (2000), desde a era de Pasteur, a pesquisa tem mostrado que, embora estejam sujeitas às mesmas leis da natureza que governam o comportamento de outras substâncias, as enzimas diferem-se dos catalisadores químicos comuns em vários aspectos importantes, entre os quais pode-se citar:

- Velocidade de reação mais rápida – as velocidades de reações catalisadas por enzimas são tipicamente 10^6 a 10^{12} vezes maiores que as reações correspondentes não catalisadas e são, no mínimo, várias ordens de magnitude maiores do que as mesmas reações catalisadas quimicamente;
- Condições reacionais mais brandas – as reações catalisadas enzimaticamente ocorrem em condições brandas: temperaturas inferiores a 100°C , pressão atmosférica e pH quase neutro. Em contraste, geralmente uma catálise química eficiente requer temperaturas e pressão elevadas, assim como pH extremo;
- Maior especificidade da reação – as enzimas apresentam um grau de especificidade imensamente maior do que os catalisadores químicos em relação à identidade dos seus substratos (reagente) e dos seus produtos, isto é, as reações poucas vezes produzem subprodutos;
- Capacidade de regulação – as atividades catalíticas de muitas enzimas variam em resposta às concentrações de outras substâncias que não os seus substratos. Os mecanismos desses processos regulatórios incluem o controle alostérico, a modificação covalente de enzimas e a variação nas quantidades de enzimas sintetizadas.

Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas. De acordo com Van Beilen e Li (2002), essas reações são à base do metabolismo de todos os organismos vivos e promovem importantes oportunidades para a indústria obter conversões biocatalíticas eficientes e econômicas.

O número total de enzimas existentes está estimado entre 6.000 a 7.000, das quais 3.000 já tiveram as suas funções descritas, porém, apenas cerca de 130 possuem uso industrial, seja na forma isolada ou como parte de células. A maioria destas é de origem microbiana, porque enzimas microbianas tendem a ser mais estáveis que suas homólogas em plantas e animais. Das mais de 3.000 diferentes enzimas, a maioria foi isolada de organismos mesófilos (KREYSA *et al.*, 2005).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica (IUB), e estabelece 6 classes:

- **Oxidoredutases:** São enzimas que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução.

- **Transferases:** Enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina e fosfato.
- **Hidrolases:** Catalisam reações de hidrólise onde a molécula é dividida em duas ou mais moléculas através da adição de água. Alguns exemplos são: proteases – dividem moléculas de proteínas. São classificadas conforme o seu pH de ação como ácidas, alcalinas ou neutras. Também podem ser classificadas com base em seus sítios ativos:

Serino proteases - possuem um resíduo em seu sítio ativo e são inibidas especificamente por diisopropil fosfofluoridato e outros derivados de organofosforados.

Tiol proteases – a atividade destas depende da presença de um grupo intacto de SH em seu sítio ativo. Elas são especificamente inibidas por reagentes tiol e íons de metais pesados e seus derivados, além de agentes alcalinos e oxidantes.

Metal proteases – dependem da presença de cátions divalentes para sua atividade.

Proteases ácidas – contém uma ou mais cadeias de grupos carboxilas em seu sítio ativo.

- **Liases:** Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.
- **Isomerases:** Catalisam reações de rearranjo intra-molecular.
- **Ligases:** Catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP).

2.3.1 Aplicação

As aplicações de enzimas estão obviamente vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais, estão dentro do que se convencionou chamar de biotecnologia, termo este que se transformou na última década numa panaceia de atividades ligadas a ciência e tecnologia, o que tornou difícil definir exatamente campos de atuações específicos, mas certamente envolve microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica no processamento de materiais por agentes biológicos. Dentre esses agentes, as enzimas são frequentemente utilizadas para melhoria de processos e para possibilitar o uso de novas matérias-primas, melhorando suas características físico-químicas e também as de vários produtos (NETO, 2001a).

Conforme Van Beilen e Li (2002), enzimas estão sendo usadas em diversas aplicações, entre elas: alimentos, agricultura, papel, couro, indústria têxtil, resultando em significativa

redução de custos. Segundo os autores, o uso de enzimas é um componente importante no desenvolvimento industrial sustentável.

Além das aplicações citadas acima, enzimas também têm sido utilizadas para tratamento de doenças. De acordo com Meletis e Barker (2005), terapias usando enzimas têm sido cada vez mais frequentes. Estudos preliminares da bactéria *Bacillus pyocyaneus* demonstraram que as secreções desta bactéria poderiam destruir bacilos de antrax. Cientistas deduziram que a secreção era capaz de destruir o antrax via degradação enzimática de ácidos nucléicos. Esta observação preliminar foi o início da utilização de enzimas na medicina. Atualmente, enzimas são usadas como anticoagulantes, antiinflamatórios, antimicrobianos e como auxiliares digestivos, além de outras aplicações. Segundo Meletis e Barker (2005), enzimas podem tratar e prevenir arteriosclerose. Bons resultados também têm sido obtidos no tratamento da esclerose múltipla, em testes realizados com animais.

Shimomura *et al.* (2009) utilizaram enzimas imobilizadas em um sensor para detecção de acetilcolina, um neurotransmissor. O sensor se mostrou muito estável quando comparado com as enzimas não imobilizadas e 80 % da resposta inicial foi mantida mesmo depois de 80 dias de estocagem.

Pareek *et al.* (2012) isolaram um fungo *Penicillium oxalicum* de resíduos de uma indústria de alimentos que processava frutos do mar. A enzima produzida por este fungo foi caracterizada e poderá ser uma alternativa para a desacetilação da quitina. O polímero quitina é um dos mais abundantes polissacarídeos depois da celulose, porém permanece inexplorado industrialmente devido a sua cristalinidade e insolubilidade na maioria dos solventes. A desacetilação da quitina origina a quitosana, um polímero com características como biodegradabilidade, biocompatível e atóxico, com aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, agricultura e cosméticos.

Radeva *et al.* (2012) estudaram a cinética da hidrólise enzimática de palha de trigo. Resíduos agrícolas, como a palha, são uma boa fonte para a obtenção de fontes alternativas de energia. A bioconversão da palha de trigo é favorecida pelo conteúdo relativamente baixo de lignina e alto de carboidratos.

Enzimas também têm sido utilizadas em diversas outras aplicações, por exemplo, na produção de hidrolisados proteicos a partir de carne mecanicamente separada (ROSSI, 2007), transesterificação e hidrólise de óleo de soja (RODRIGUES e AYUB, 2011), utilização de enzimas (transglutaminase) no melhoramento de propriedades de proteínas como caseína e proteína de soja (SOUZA, 2008).

Conforme Kanth *et al.* (2008), teoricamente, todas as enzimas que foram empregadas para catalisar uma reação podem ser utilizadas novamente diversas vezes para a mesma clivagem ou síntese. Na prática, porém, há algumas limitações. Enzimas são biomoléculas complicadas e sensíveis, a destruição da atividade enzimática pode ocorrer devido à presença de calor, alcalinidade, acidez, presença de traços de alguns metais e certos inibidores.

Alguns fatores influenciam na atividade catalítica das enzimas, tais como: concentração enzimática, concentração do substrato, pH e temperatura. Para otimização das reações biológicas, mediadas por catalisadores, é necessário uma temperatura adequada que varia de acordo com o tipo de enzima. Baixas temperaturas podem causar inativação e altas temperaturas podem causar desnaturação enzimática, pois, as enzimas são muito sensíveis.

2.3.2 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas

A procura por uma nova enzima começa entre os próprios microrganismos da natureza. Pesquisadores examinam amostras de solo coletadas em áreas com diversas condições de clima - das regiões glaciais às florestas tropicais. As enzimas podem ser obtidas de várias fontes, entre as principais estão: animais, vegetais e microrganismos.

A maioria das enzimas industriais é obtida de microrganismos. As vantagens de utilizar microrganismos, quando comparadas com a obtenção de enzimas a partir de plantas e animais, são inúmeras. Entre estas vantagens pode-se citar (OKAFOR, 2007):

- Plantas e animais crescem lentamente em comparação com microrganismos;
- Enzimas são apenas uma pequena porção do corpo de animais ou plantas, em consequência, grandes áreas de terra ou grande número de animais seriam necessários para produção em larga escala. Estas limitações tornam enzimas de animais e plantas caras. Por outro lado, enzimas microbianas não estão sujeitas a estas dificuldades e podem ser produzidas nas quantidades desejadas;
- A principal vantagem da produção de enzimas microbianas é a diversidade de enzimas, a qual reflete a diversidade de espécies de microrganismos na natureza;
- Finalmente, a descoberta e o entendimento das bases genéticas responsáveis pelo controle das funções fisiológicas dos microrganismos permitiram a manipulação de microrganismos para que os mesmos produzissem certos metabólitos, incluindo enzimas.

Microrganismos produtores de enzimas podem ser isolados do solo, da água ou de resíduos. O primeiro estágio no isolamento e na seleção de microrganismos é isolar cepas capazes de produzir o produto desejado. Para isto, é necessário um trabalho intenso de seleção e testes de várias cepas diferentes para identificar aquelas com as propriedades desejadas (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Atualmente diversas novas fontes de enzimas estão sendo estudadas. Microrganismos de fontes exóticas, como os extremófilos, têm sido considerados uma fonte importante de enzimas. Conforme Kumar e Takagi (1999), todos os microrganismos seguem um padrão de distribuição baseado nas condições de pH. A maioria dos microrganismos conhecidos se

prolifera bem em condições de pH neutro ou próximo disto. Quando o pH não é próximo ao neutro, o número de microrganismos diminui.

A prática convencional com muitos microrganismos é cultivar um grande número destes em placas contendo meio de cultivo e agar. Normalmente, os microrganismos são isolados a partir de plaqueamento e subsequente triagem das características desejadas. Em seguida, os microrganismos são cultivados em meios específicos para estimar suas atividades proteolíticas, aminolíticas ou lipolíticas usando substratos adequados tais como caseína ou leite desnatado, amido, tributirina, manteiga. Os isolados que exibem as melhores atividades são selecionados e mantidos de maneira adequada para uso posterior.

2.3.3 Produção de enzimas e Nutrição microbiana

A maioria das enzimas é obtida a partir de fermentação submersa, algumas são obtidas em meios semi-sólidos (OKAFOR, 2007).

Meio semi-sólido – comumente os microrganismos usados são fungos, os quais são mais favoráveis à alta produção de enzimas em condições de pouca umidade e alto grau de aeração. A temperatura é mantida em torno de 30°C através da circulação de ar. O período de produção é de 30 a 40 horas, mas pode atingir até sete dias. A produção ótima é determinada pela coleta de amostras e avaliação da produção de enzimas (OKAFOR, 2007).

Produção submersa – a maior parte da produção de enzimas é pelo cultivo submerso em biorreatores. O meio de cultivo deve conter todos os nutrientes necessários ao crescimento, incluindo fontes adequadas de carbono, nitrogênio, metais, elementos traço, etc. Porém, algumas vezes, o meio satisfatório para o crescimento não é satisfatório para a produção da enzima. O pH e a temperatura devem ser ajustados de acordo com cada microrganismo. A temperatura e o pH para o crescimento, produção da enzima e estabilidade da enzima não são necessariamente os mesmos para todas as enzimas. A temperatura adotada para o cultivo normalmente leva em consideração estes três fatores. A necessidade de oxigênio é maior quando o microrganismo utilizado na produção da enzima é aeróbio, assim, aeração e agitação são empregadas nas fermentações submersas.

É essencial que os microrganismos sejam cultivados em condições de crescimento ótimas para aumentar a produção de enzimas. As condições de cultivo que promovem a produção de proteases são significativamente diferentes das condições de cultura que promovem o crescimento da célula. Na produção industrial de proteases alcalinas, são utilizadas altas concentrações de complexos de carboidratos, proteínas e outros componentes do meio de cultura. Para desenvolver uma tecnologia viável economicamente, as pesquisas estão focadas: (a) incremento do rendimento das proteases alcalinas; (b) otimização da fermentação e das condições de produção; (c) meios de cultivo mais baratos.

Na maioria dos microrganismos, a forma orgânica e inorgânica do nitrogênio é metabolizada para produzir aminoácidos, ácidos nucléicos, proteínas e componentes celulares. Proteases alcalinas incluem até 15,6% nitrogênio e sua produção é dependente da disposição de carbono e nitrogênio no meio. Embora fontes complexas de nitrogênio sejam usualmente

utilizadas para a produção de proteases alcalinas, a necessidade de uma fonte de nitrogênio específica varia de organismo para organismo.

Aumento no rendimento das proteases alcalinas tem sido observado por vários pesquisadores quando foram utilizados açúcares como lactose, maltose, sacarose, frutose no cultivo dos microrganismos. Vários ácidos orgânicos, como ácido acético, metil acetato, ácido cítrico ou citrato de sódio têm produzido bons resultados na produção de proteases alcalinas (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Em alguns casos, para que ocorra o desenvolvimento da enzima é necessária a presença de íons metálicos divalentes (cálcio, cobalto, boro, ferro, magnésio, manganês). Fosfato de potássio tem sido a fonte de potássio na maioria dos estudos realizados. Fosfato tampona o meio, porém em excesso inibe o crescimento celular e a produção de enzimas.

Basicamente as necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos, a seguir estão os fatores mais importantes na nutrição microbiana, de acordo com Alterthumm (2001). Os fungos e a maioria das bactérias são quimiotróficos, obtendo energia à custa de reações químicas, onde substratos adequados são oxidados. Os microrganismos litotróficos oxidam compostos inorgânicos, enquanto os organotróficos oxidam compostos orgânicos. No primeiro grupo estão as bactérias capazes de oxidar enxofre produzindo ácido sulfúrico. No segundo grupo encontramos os fungos e um grande número de bactérias.

Fontes de carbono

Para os microrganismos autotróficos a única fonte de carbono é o CO₂ ou o íon bicarbonato, a partir dos quais conseguem sintetizar todos os compostos orgânicos de que necessitam. A maioria das bactérias é heterotrófica, exigindo fontes orgânicas de carbono, as mais comuns são carboidratos, aminoácidos, lipídeos, alcoóis e polímeros como amido e celulose. Na realidade, qualquer composto orgânico natural e muitos sintéticos podem ser utilizados por algum microrganismo. Esta versatilidade é de grande importância, permitindo o emprego de microrganismo numa extensa série de transformações úteis para o homem.

Fontes de nitrogênio

Quanto à necessidade de nitrogênio há três categorias de microrganismos. Algumas bactérias retiram o nitrogênio diretamente da atmosfera e o convertem a nitrogênio orgânico. Numerosos fungos e quase todas as bactérias utilizam compostos inorgânicos de nitrogênio, em especial sais de amônio e ocasionalmente nitratos. Fungos e algumas bactérias exigem fontes orgânicas de nitrogênio, representadas por um número variável de aminoácidos. De modo geral, a adição de aminoácidos ou hidrolisados de proteínas favorece o crescimento da maioria dos microrganismos heterotróficos.

Íons orgânicos essenciais

Além de carbono e nitrogênio, os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgânicos. Alguns são necessários em quantidades apreciáveis – macronutrientes – enquanto que, de outros, bastam traços – micronutrientes.

Dentre os primeiros temos o fósforo, sob a forma de fosfatos, importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos; o enxofre, necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e para a síntese de vitaminas como biotina e tiamina; o potássio, ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica; o magnésio, ativador de enzimas extracelulares e fator importante na esporulação; ferro, necessário para a síntese de citocromos e de certos pigmentos. O papel dos micronutrientes não é tão bem conhecido, dadas as dificuldades de seu estudo. Todavia, em alguns casos específicos, tem-se demonstrado a necessidade de elementos como cobre, cobalto, zinco, manganês, sódio, boro e outros.

Fatores de crescimento

Denominam-se fatores de crescimento os compostos orgânicos indispensáveis a um determinado microrganismo, mas que ele não consegue sintetizar. Tais fatores, portanto, devem estar presentes no meio para que o microrganismo possa crescer, muitos destes fatores são vitaminas, em especial do complexo B; outras vezes são aminoácidos ou ácidos graxos.

Água

A água não constitui um nutriente, mas é absolutamente indispensável para o crescimento dos microrganismos, pois a maioria se nutre pela passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática. A água exerce função primordial na regulação da pressão osmótica, e pelo seu elevado calor específico, na regulação térmica.

Oxigênio atmosférico

Como a água, o oxigênio atmosférico não é um nutriente. Os microrganismos têm comportamentos diferentes na presença de O₂ livre: os aeróbios exigem presença de oxigênio livre, alguns, todavia, o exigem em pequena quantidade, não tolerando as pressões normais de O₂ atmosférico, são os microaerófilos; microrganismos anaeróbios não toleram a presença de oxigênio livre, morrendo rapidamente nessas condições; microrganismos facultativos tanto podem crescer na presença como na ausência de oxigênio livre.

2.3.4 Extração das enzimas

Após a fermentação é necessário recuperar e separar a enzima do caldo de fermentação. O método de separação dependerá se a enzima é extra ou intracelular.

A primeira etapa de um processo de recuperação de proteases extracelulares é a separação da biomassa celular e das substâncias insolúveis do sobrenadante, que normalmente é efetuada através de processos de floculação, filtração ou centrifugação (CRUEGER e CRUEGER, 1993), deve-se tomar o cuidado para não haver lise celular, o que poderia causar

uma contaminação desnecessária. A maioria das enzimas é extracelular, fato muito importante pois torna o processo de extração das enzimas mais fácil, rápido e barato.

Para enzimas intracelulares há a necessidade do rompimento celular e para isto, algumas vezes, é necessário um pré-tratamento, como a remoção de gorduras ou picar o tecido para facilitar a homogeneização. Células obtidas por fermentação devem ser concentradas para um rompimento eficiente. Os principais métodos utilizados para o rompimento podem ser: mixers, agitação com abrasivos, extrusão sólida e líquida, ultrassom, congelamento, choque osmótico, enzimas hidrolíticas de parede, uso de detergentes e solventes.

O grau de purificação depende do propósito para o qual a enzima será usada. Há vários métodos para a purificação das enzimas (precipitação fracionada, cromatografia, etc.) (OKAFOR, 2007). Alguns exemplos de procedimentos que poderiam ser adotados no processo de purificação são: precipitação com sais, cromatografia de troca iônica ou precipitação isoelétrica (BEYNON e BOND, 1996). A purificação com sulfato de amônio é a mais utilizada, pois é um procedimento simples e barato que produz graus consideráveis de recuperação e purificação, além do fato de que altas concentrações deste sal podem aumentar consideravelmente a estabilidade de muitas enzimas (TREVAN *et al.*, 1990).

As etapas subsequentes de um processo de purificação, normalmente, são realizadas através de processos de cromatografia em coluna e consistem nas etapas mais caras deste processo (CRUEGER e CRUEGER, 1993). Estes processos podem ser realizados através de cromatografia de troca iônica, com a utilização de um gradiente linear de sal para eluição, cromatografia de gel filtração e ainda, cromatografia de interação hidrofóbica. Muitas proteases podem e são purificadas com uma combinação destas etapas convencionais (BEYNON e BOND, 1996). Abaixo se lê a abordagem dos principais métodos de purificação, baseado em Neto (2001b).

Purificação baseada na solubilidade

A solubilidade de uma enzima em um solvente aquoso é determinada pela distribuição de cargas presentes sob determinadas condições. Os grupos carregados interagem com íons na solução e a precipitação pode ser induzida por mudanças no pH, força iônica e adição de solventes orgânicos ou polímeros. Como a solubilidade também é dependente da temperatura, este fator deve ser levado em consideração. O precipitado formado pode ser recuperado por centrifugação, ressuspenso em tampão adequado e depois dessalinizado por diálise ou filtração em gel, para as etapas posteriores de purificação.

A adição de sais como o NaCl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aumenta a força iônica, de tal forma que as moléculas proteicas se agregam e precipitam. Na prática prefere-se usar sais baratos, com poucas impurezas e com alta solubilidade, sendo mais comum o uso do sulfato de amônio.

Purificação baseada na carga

Cromatografia pode ser definida como uma separação diferencial dos componentes de uma amostra entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Na maioria das vezes a fase

estacionária é formada por partículas esféricas de um material insolúvel que é colocado (empacotado) numa coluna. A mistura de enzimas a serem separadas é introduzida na coluna pela fase móvel, e forçada a migrar através da coluna. As enzimas que possuem maior atração pela fase estacionária irão migrar através de forma diferenciada (fixarem-se ou moverem-se mais lentamente) daquelas que tem maior afinidade pela fase móvel. A fase estacionária é chamada de matriz ou resina, que pode ser modificada pela ligação de grupos químicos para conferir-lhe determinadas características físico-químicas adequadas a cada processo. As matrizes mais comuns são polímeros do tipo: celulose, dextrana, agarose, poliacrilamida e poliestireno e de preferência devem ter estabilidade química, mecânica e biológica.

Mais comumente denominada cromatografia de troca iônica, esta técnica envolve adsorção a grupos carregados da resina, seguida de sua eluição com fracionamento. Enzimas carregam grupos ionizados em sua superfície, devido principalmente, aos resíduos de aminoácidos. Por isto, há matrizes carregadas com grupos positivos como a DEAE (dietilaminoetil) chamadas aniônicas ou trocadoras de ânions e com grupos negativos, como CM (carboximetil) chamadas de catiônicas ou trocadoras de cátions.

Purificação baseada no tamanho

O princípio básico é uma partição de moléculas entre solvente e uma fase estacionária de porosidade definida; sendo assim é uma forma de cromatografia de partição para a separação de moléculas de diferentes tamanhos e tem recebido várias denominações tais como: filtração em gel, cromatografia de exclusão em gel e também cromatografia em gel.

Gessesse *et al.* (2003) purificaram proteases usando a precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em DEAE-Sepharose, ao final as frações de proteases foram aplicadas em coluna de Sephadex G-75 para cromatografia de exclusão por tamanho. O peso molecular das proteases obtidas foi 23 e 24 kDa.

Tatineni *et al.* (2008) utilizaram além do fracionamento através da adição de sulfato de amônio, a cromatografia de permeação em gel, em coluna sephacryl S-100. A enzima purificada apresentou peso molecular de aproximadamente 44 kDa.

Wan *et al.* (2009) utilizaram sulfato de amônio e diversas colunas cromatográficas (Phenyl Sepharose, SP-Sephadex, Q-Sephadex) para a purificação de uma enzima obtida a partir do cultivo de *Bacillus pumilis*.

Resulta do processo de produção das enzimas uma biomassa, que é tratada para desativar os eventuais microrganismos ainda viáveis. Após tratada, como possui um alto teor de macro e micro nutrientes, pode ser utilizada como fertilizante de solo.

2.3.5 Otimização de meios de cultivo

Após a seleção do microrganismo que produz as enzimas mais adequadas aos objetivos de cada pesquisador é interessante realizar a otimização dos meios de cultivo. Conforme Kumar e Takagi (1999), a otimização é feita para manter o balanço entre os vários

componentes do meio de cultivo, para minimizar os componentes não utilizados ao final da fermentação. As pesquisas têm sido direcionadas principalmente para: a avaliação do efeito de várias fontes de carbono e nitrogênio sobre o rendimento da produção de enzimas; a necessidade de íons metálicos divalentes no meio de fermentação; e a otimização dos parâmetros de fermentação como pH, temperatura, aeração e agitação. Cada microrganismo tem uma condição própria para a produção máxima de enzimas.

De acordo com Reddy *et al.* (2008), a otimização do processo é um tópico importante em processos produtivos industriais, em especial para processos biotecnológicos, nos quais uma pequena melhoria pode ser decisiva para o sucesso comercial. Nas tecnologias de fermentação, aumentos na produção do metabólito microbiano são alcançados, geralmente, via manipulação de parâmetros nutricionais e físicos. Os autores utilizaram planejamento Plackett-Burmann para a seleção das variáveis que influenciaram significativamente a produção de uma protease alcalina. As quatro variáveis significativas foram selecionadas para estudos de otimização através da metodologia de superfície de resposta. Reddy *et al.* (2008) alcançaram um aumento na produção da protease de 2,3 vezes, usando o meio otimizado em comparação com o meio não otimizado.

O crescimento e a produção de enzimas por microrganismos são fortemente influenciados pela composição do meio, assim a otimização dos componentes do meio e parâmetros de cultivo são a tarefa primária em um processo biológico (FAKHFAKH-ZOUARI *et al.*, 2010).

Planejamento de experimentos tais como o Plackett–Burman (PB) e os planejamentos fatoriais são bons métodos para a seleção e a otimização da composição de meios de cultivo usando um número mínimo de experimentos (FAKHFAKH-ZOUARI *et al.*, 2010; OSKOUIE *et al.*, 2008; REDDY, 2008; CHAUHAN e GUPTA, 2004).

Fakhfakh-Zouari *et al.* (2010) utilizaram dois métodos estatísticos para a otimização da produção de queratinases: Plackett-Burmann para encontrar os ingredientes e condições para o melhor rendimento da produção da enzima e planejamento composto central para otimizar a concentração das cinco variáveis significativas. O meio otimizado resultou em um aumento de 3,4 vezes na produção da queratinases comparado com o não otimizado.

O planejamento Plackett-Burmann permite a seleção dos fatores principais dentre um grande número de variáveis de processo, assim, é uma ferramenta estatística bastante útil em estudos preliminares, onde o objetivo principal é selecionar as variáveis que podem ser fixadas ou eliminadas no processo de otimização. Além disso, a metodologia de superfície de resposta é uma estratégia experimental interessante através da qual as condições ótimas de um sistema de múltiplos fatores controláveis podem ser determinadas (REDDY *et al.*, 2008). Conforme Montgomery (2001), a metodologia de superfície de resposta é uma compilação de técnicas matemáticas e estatísticas, orientadas para a modelagem e a análise de problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis e o objetivo é otimizar esta resposta.

2.3.6 Cinética enzimática

É a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas e os fatores que influenciam nesta velocidade. A cinética de uma enzima é estudada avaliando-se a quantidade de produto formado ou a quantidade de substrato consumido por unidade de tempo de reação.

Uma reação enzimática pode ser expressa conforme a equação 2.2, composta por duas reações elementares, nas quais o substrato forma um complexo com a enzima que se decompõe subsequentemente, em produtos e enzima:



Onde E, S, ES e P simbolizam a enzima, o substrato, o complexo enzima/substrato e os produtos, respectivamente. De acordo com esse modelo, quando a concentração de substrato for alta o suficiente para converter completamente a enzima na sua forma ES, a segunda etapa da reação irá tornar-se limitante da velocidade e a velocidade da reação global não irá variar com um aumento adicional na concentração de substrato. A velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações de enzima e de substrato.

As reações enzimáticas são influenciadas por dois fatores externos:

- pH - existe um pH ótimo, onde a distribuição de cargas elétricas da molécula da enzima e, em especial do sítio catalítico, é ideal para a catálise.
- Temperatura – a maioria das enzimas possui uma temperatura ótima, esta depende do microorganismo a partir do qual a enzima foi isolada. Alguns organismos se desenvolvem melhor em temperaturas próximas da ambiente e assim, as suas enzimas serão mais ativas em temperaturas entre 30 e 40°C. Em temperaturas baixas, o movimento das moléculas fica mais brando e conseqüentemente, a velocidade de reação diminui. Enquanto que em temperaturas altas, o movimento das moléculas fica muito forte, dificultando a manutenção da conformação da enzima e assim, a mesma começa a sofrer desnaturação e perder atividade. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até se atingir a temperatura ótima; a partir dela, a atividade diminui.
- Desnaturação – a desnaturação proteica é entendida como a perda da estrutura que propicia a função proteína. Não só temperaturas elevada levam a desnaturação. Outras variáveis do meio que afetam as ligações químicas têm o mesmo efeito. Assim, valores extremos de pH, provocando protonação ou desprotonação de grupos, ocasionam perda da atividade da enzima. Os detergentes e solventes apolares também podem alterar ligações e interações provocando desnaturação. Na maior parte dos casos, a desnaturação é um processo irreversível.

Inibição enzimática

Muitas substâncias alteram a atividade de uma enzima associando-se reversivelmente a ela, de forma a influenciar a ligação do substrato. Substâncias que reduzem a atividade de uma enzima são conhecidos como inibidores.

Os inibidores atuam por meio de uma variedade de mecanismos. Alguns inibidores enzimáticos são substâncias que se assemelham estruturalmente aos substratos dessas enzimas, mas não reagem ou reagem muito lentamente. Eles podem ser classificados em dois grupos:

- Inibidores competitivos - competem diretamente com o substrato pelo sítio ativo da enzima e reduzem a concentração de enzima livre disponível para a ligação com o substrato. O aumento da concentração de substrato leva a uma diminuição da atividade inibitória, pois a chance do inibidor encontrar enzima livre foi reduzida. Esse inibidor normalmente é semelhante ao substrato, de modo que se liga especificamente ao sítio ativo, mas difere-se do substrato por não poder reagir como ele.
- Inibidores não competitivos - o inibidor distorce o sítio ativo da enzima, fazendo com que a enzima seja cataliticamente inativa. O aumento da concentração de substrato não causa diminuição da atividade inibitória. O inibidor não-competitivo não se assemelha ao substrato.

Desnaturação

Se um inibidor se ligar irreversivelmente a enzima, ele será classificado como um inativador/desnaturador.

2.4 Enzimas aplicadas à produção mais limpa de couros

De acordo com Thanikaivelan *et al.* (2004), a biotecnologia tem sido utilizada na indústria curtidora há alguns anos, porém a maior parte dos preparados enzimáticos utilizados neste setor não tem especificidade suficiente. Atualmente, métodos biológicos têm sido utilizados com relativo sucesso nos processos de remolho, depilação e purga, e em parte, na remoção de gorduras naturais. Há ainda opções biotecnológicas para o tratamento de efluentes e resíduos sólidos protéicos.

Entre as enzimas com aplicação na produção de couros pode-se citar:

- *Proteases*

Recentemente, proteases obtidas a partir de microrganismos têm sido utilizadas em vários campos, devido, principalmente, a possibilidade de produção de grandes quantidades de enzimas a baixo custo e com grande velocidade. Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas das proteínas (OGINO *et al.*, 2008).

Proteases alcalinas pertencem a um grupo de enzimas fisiologicamente e comercialmente importantes, usadas primeiramente, como aditivos em detergentes. Elas têm um papel específico na hidrólise de proteínas (KUMAR E TAKAGI, 1999).

Conforme Kumar e Takagi (1999), de todos os microrganismos rastreados em várias aplicações industriais, as bactérias do gênero *Bacillus* tem sido fonte predominante e produtiva de proteases alcalinas. Proteases alcalinas geralmente são produzidas através de fermentação submersa. Cada organismo tem a sua própria condição para a máxima produção de enzimas.

De acordo com Reddy (2007), proteases atuam na quebra da ligação peptídica da proteína através da hidrólise catalítica. São usadas para a remoção de proteínas não fibrilares como albumina e globulinas.

- *Queratinases*

Queratina é a principal proteína estrutural de peles (epiderme), cabelos, pelos, lã, unhas e penas. É a proteína que forma fibras rígidas e é está presente na epiderme e tecidos esqueléticos. Penas contêm mais de 90% de queratina.

Conforme Tatineni *et al.* (2008) e Macedo *et al.* (2008), queratinases tem vários usos importantes em processos biotecnológicos, como: enzimas como uma alternativa para depilação de peles, em detergentes, na produção de fertilizantes e alimentos animais, em cosméticos, na degradação de resíduos industriais e na produção de filmes biodegradáveis. Animais e plantas são incapazes de hidrolisar queratina eficientemente. Queratina é uma proteína muito estável, mas pode ser hidrolisada por queratinases intra e extracelulares produzidas por alguns fungos, bactérias e actinomicetos.

- *Lipases*

Conforme Lotrakul e Dharmstithi (1997), a maioria das lipases produzidas atualmente é obtida a partir de fungos e leveduras, porém o interesse em lipases de origem bacteriana tem aumentado devido à sua maior estabilidade, quando expostas a altas temperaturas e outras condições severas, em comparação com as enzimas obtidas de outros microrganismos.

Segundo Kamini *et al.* (1998), lipases catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres. De acordo com os autores, microrganismos são produtores vigorosos de lipases. Os autores estudaram a obtenção de lipases a partir do *Aspergillus niger*, determinando as características (pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade e habilidade para remoção de óleo de oliva) da lipase extracelular obtida.

De acordo com Reis *et al.* (2008), lipases são enzimas solúveis em água que tem um papel importante no metabolismo e na digestão.

De acordo com Gutterres (2006), na produção de couros as lipases agem nas gorduras e lipídeos da carne e graxas e óleos produzidos nas glândulas.

Conforme Reddy (2007), lipases são utilizadas para desengraxe e depilação de peles, quando aplicadas em conjunto com surfactantes provocam um desengraxe mais eficiente. Lipases e proteases quando utilizadas conjuntamente, na etapa de recurtimento, removem gorduras, sujeiras e outras manchas, assim, obtém-se uma cor mais uniforme e brilhante. A utilização de lipases tem mostrado redução em manchas causadas por gordura natural, redução da descoloração nas rugas do pescoço e outras manchas.

- *Amilases*

Amilases são responsáveis pela degradação da molécula de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica. Podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, porém enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2005).

Na produção de couros, amilases podem ser utilizadas para a abertura da estrutura fibrosa da pele (THANIKAIVELAN *et al.*, 2006).

- *Colagenases*

Colagenases são da classe das metaloproteínases, que podem ser obtidas de diferentes fontes. Conforme Kanth *et al.* (2008), o modo de ação das colagenases é dependente da fonte da qual as mesmas foram obtidas. Colagenases de origem bacteriana clivam preferencialmente a ligação X-Gly (X é frequentemente um aminoácido neutro) da sequência –Gly-Pro-X-Gly-Pro-X. De acordo com os autores, colagênio curtido (isso é, com formação de *crosslinking* com substâncias curtentes) é resistente a ação da colagenase, a enzima não hidrolisa o couro curtido com cromo, mas causa abertura da estrutura fibrosa.

Conforme Ogino *et al.* (2008), colagenases obtidas a partir de diversos microrganismos têm sido estudadas em detalhes, porém estas enzimas tem grande dificuldade em degradar e solubilizar couro, que consiste principalmente de colagênio.

2.4.1 Obtenção de enzimas para aplicação em couros

Microrganismos produtores de enzimas com aplicação na produção de couros, entre elas proteases, queratinases, colagenases têm sido isolados em diversos *habitats*, como solo (MACEDO *et al.*, 2005; EFTEKHAR *et al.*, 2003; OGINO *et al.*, 2008; TATINENI *et al.*, 2008), resíduos e efluentes de curtumes (KUMAR *et al.*, 2008).

Ogino *et al.* (2008) isolaram 76 espécies de microrganismos capazes de degradar resíduos de couros em valores de pH neutro e 23 espécies de microrganismos capazes de degradar resíduos de couros em valores de pH alcalino.

Kumar *et al.* (2008) isolaram microrganismos capazes de usar aparas de peles caleiradas como fonte de nitrogênio e carbono. Os microrganismos foram selecionados a partir da água efluente do curtume. A seleção inicial dos microrganismos foi realizada utilizando placas contendo agar e leite desnatado, incubadas a 37°C por 24 horas. Uma região com ocorrência de hidrólise indicava a presença de organismos produtores de proteases. Estes foram cultivados em um meio com concentração mínima de sal, contendo: MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L); K₂HPO₄ (2,0 g/L), KH₂PO₄ (2,0 g/L), BSA (1,0 g/L). A atividade proteolítica foi determinada após 24 horas de cultivo. As bactérias com maior atividade proteolítica foram selecionadas e identificadas.

Os métodos mais comuns descritos na literatura para obtenção de enzimas com atividade proteolítica são a utilização de meios de cultura contendo agar e proteínas. As proteínas mais comuns são a caseína (EFTEKHAR *et al.*, 2003; TATINENI *et al.*, 2008), leite desnatado (GIONGO, 2006; PILLAI e ARCHANA, 2008; KUMAR *et al.*, 2008), penas moídas (MACEDO *et al.*, 2005, RIFFEL *et al.*, 2003). A atividade proteolítica é determinada através da formação de halo translúcido ao redor da colônia, gerado pelo consumo de substrato e que indica a produção de protease.

2.4.2 Aplicações diversas de enzimas na indústria curtidora

A seguir são apresentadas pesquisas realizadas por alguns autores aplicando enzimas em várias etapas do processo produtivo do couro. A Tabela 2.2 apresenta um resumo de algumas aplicações de enzimas na produção de couros.

Tabela 2.2: Etapas do processamento de couro nas quais há potencial para aplicação das enzimas

Etapa	Tecnologia utilizada atualmente	Alternativas	Prós	Contras
Remolho	Adição de tensoativos, sais neutros, ácidos e bactericidas	Enzimas proteolíticas e lipolíticas	Redução do impacto ambiental, redução do tempo de processo.	Alto custo, resistência do setor industrial em mudar processos já consolidados.
Depilação/caleiro	Cal e sulfetos	Enzimas com ação proteolítica (principalmente sobre colágeno e queratina)	Diminuição da carga orgânica dos efluentes devido a não destruição do pelo e possibilidade de recuperação do mesmo. Redução ou eliminação do uso de cal e sulfeto (Gutterres, 2008).	Possibilidade de danos à camada flor das peles.
Purga	Enzimas pancreáticas		Técnica já consolidada	Baixa especificidade destas enzimas.
Píquel	Adição de ácidos, especialmente, sulfúrico e fórmico	Adição de enzimas proteolíticas para aumentar a exaustão de curtentes vegetais (Kanth <i>et al.</i> 2009).	Redução dos níveis de DQO, sólidos totais e cloretos (Kanth <i>et al.</i> 2009).	Pode haver um aumento de custos.
Tingimento	Corantes e alguns auxiliares, ácidos para a fixação do corante.	Utilização de collagenases (Kanth <i>et al.</i> , 2008).	O uso da enzima propicia abertura da estrutura fibrosa, aumentando a difusão dos corantes e área superficial exposta a interação com o corante (Kanth <i>et al.</i> , 2008).	Custos da enzima e falta de mais estudos neste sentido.

Para todas as etapas acima, pode citar-se como ponto positivo o fato do processo enzimático não gerar resíduos químicos como efluente, podendo ser considerado ambientalmente correto. Além disso, estudos publicados na literatura, até o momento, indicam

que não há perda de resistência mecânica das peles tratadas com compostos enzimáticos (JIAN *et al.*, 2011; SARAVANABHAVAN *et al.*, 2003 e 2004; LI *et al.* 2010).

Conforme Thanikaivelan *et al.* (2004), as principais vantagens da utilização de enzimas no processo de remolho é a reidratação mais eficiente da pele, melhor abertura da fibra (maior penetração dos reagentes), degradação e dispersão de gorduras, remoção de carboidratos e proteínas da pele.

Aquim *et al.* (2008a) fizeram um estudo comparativo entre o processo de remolho e caleiro convencional e o processo enzimático (enzimas comerciais). Os autores avaliaram a estrutura da rede de fibras das peles obtidas através de MEV (microscopia eletrônica de varredura), testes físicos, matéria volátil e cinzas. A abertura das fibras é importante para a etapa de curtimento e recurtimento, para que os insumos sejam melhor absorvidos, e deve ser constatada nos dois processos propostos, apresentando certa equivalência, e se possível, até uma melhora no processo enzimático, frente ao processo convencional. Os resultados obtidos através da análise de MEV foram semelhantes para os processos. Para os testes físicos de tração, para as amostras de ambos os processos, não houve diferença significativa, visto que as tensões de ruptura, dos processos convencionais e enzimáticos, foram respectivamente, 42,12 MPa e 39,00 MPa, o que indica que não houve perdas de resistência mecânica do material no processo enzimático. A amostra de caleiro final, no processo enzimático, apresentou maior quantidade de matéria-volátil e cinzas, evidenciando que existe maior abertura na pele neste processo, e que a difusão do cálcio na mesma é maior. Isto é importante, pois, uma abertura de fibras, sem perder a estrutura requerida e manter as propriedades mecânicas, influi na qualidade do couro obtido, pois facilita as etapas subsequentes do processo de ribeira, e de curtimento.

Para o processo enzimático, os autores constataram uma diminuição do volume de água empregado, e também da quantidade de produtos químicos adicionados, sendo que a diminuição no total (produtos químicos e água) foi de aproximadamente 42%, conforme a Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Insumos aplicados nos processos convencional e enzimático.

	Processo convencional	Processo enzimático
Água (kg/kg de pele)	6,710	3,818
Produtos químicos (kg/ kg de pele)	0,0798	0,0623
Enzimas (kg/kg de pele)	-	0,0021
Total (kg de insumo/kg de pele)	6,790	3,883
% de redução no processo enzimático em relação ao processo convencional		42,82

Fonte: Aquim *et al.*, 2008a

Apesar da redução do uso de produtos químicos e menor consumo de água, o custo de um processo com menor impacto ambiental ainda é muito alto. Conforme Aquim *et al.* (2008 b) o custo de um processo ambientalmente correto, utilizando produtos menos impactantes ao

meio ambiente, que faz a depilação sem sulfetos, uso de enzimas e o curtimento sem cromo, ainda é o dobro de um processo usual, que realiza a depilação com cal e sulfeto e curte com cromo III. O processo usual é o mais utilizado pelos curtumes até os dias de hoje, com poucas alternativas voltadas ao meio ambiente, apenas com reciclo parcial do processo de depilação e caleiro e com adoção de sistemas de tratamento de efluentes (AQUIM *et al.*, 2008b).

Enzimas também podem ser utilizadas no processo de depilação, na remoção do pelo e da epiderme, remoção de componentes residuais, remoção/dispersão de componentes adiposos e redução na carga dos efluentes. Nesta etapa, as enzimas podem ser utilizadas de duas formas: uma enzima pode auxiliar um processo químico de depilação ou um reagente químico pode auxiliar um processo enzimático de depilação. Além disso, pode ser desenvolvido também um sistema de depilação sem destruição do pelo, isto se dará através do uso de enzimas, onde ocorrerá a retirada seletiva de componentes não colagenosos da matriz.

Macedo *et al.* (2005) estudaram a capacidade de remoção de pelos de uma queratinase obtida a partir da bactéria *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a enzima não hidrolisa o colagênio, além de apresentar uma remoção eficiente dos pelos, mantendo praticamente as mesmas condições (pH, tempo) do processo de depilação tradicional, porém sem adição de sulfeto.

Li *et al.* (2010) investigaram “um processo mais limpo” de ribeira para ser utilizado no processamento de peles bovinas. No processo experimental foram utilizadas enzimas juntamente com quantidade reduzida de produtos químicos. Para este processo, em comparação com o processo usual (controle), os autores atingiram 46%, 93%, 58% e 54% de redução na emissão de água, DQO, sólidos totais e nitrogênio amoniacal, respectivamente.

Dayanandan *et al.* (2003) estudaram a depilação de peles através do emprego de uma protease alcalina isolada do *Aspergillus tamarisii*. As propriedades físicas do couro obtido neste processo, em comparação com o processo tradicional, apresentaram melhores resultados para a resistência à tração e alongação.

Sivasubramanian *et al.* (2008a) testaram a utilização de uma protease alcalina de origem bacteriana na depilação de peles, visando a completa eliminação do uso de cal e sulfeto. Para avaliar a eficácia do processo enzimático foram realizados três estudos comparativos: o primeiro utilizando o processo convencional de depilação com cal e sulfeto, o segundo utilizando um processo misto, usando enzimas comerciais e quantidades reduzidas de cal e sulfeto e o terceiro empregando somente enzimas. Os autores realizaram um estudo da histologia da pele após os diferentes tratamentos. Para o processo enzimático foi observada uma completa remoção da epiderme, estruturas glandulares, pelos e folículos. Para o processo convencional observou-se uma remoção incompleta das camadas citadas e para o processo misto observou-se uma remoção moderada das mesmas. As peles tratadas somente com enzimas apresentaram maior abertura da estrutura fibrosa de colagênio, porém, não foram observados danos ao colagênio.

Sivasubramanian *et al.* (2008a) também destacaram as vantagens de realizar a depilação sem destruição do pelo (que é possível no processo enzimático). Além de diminuir a carga poluidora do efluente gerado (diminuição dos níveis de DQO, DBO, ST, STD), o pelo recuperado após o processo de depilação pode ser aplicado na produção de feltros, fertilizantes orgânicos, rações para aves. Os pelos recuperados, quando submetidos à hidrólise por meio de tratamentos térmicos, físicos ou químicos podem ser aplicados na geração de biogás, na produção de queratina, cosméticos, produtos farmacêuticos, na produção de produtos sintéticos, como o nylon, entre outras aplicações. Através de análise microscópica os autores observam que os pelos recuperados do processo enzimático estavam intactos, sem danos. Foi possível observar a raiz do pelo, enquanto que para o processo misto não foi possível visualizar a raiz. Para o processo convencional não foi possível analisar o pelo, uma vez que este estava totalmente destruído.

De acordo com Sivasubramanian *et al.* (2008a), os couros obtidos no processo enzimático e no processo convencional estão dentro dos padrões de qualidade exigidos. Porém os couros obtidos a partir do tratamento enzimático apresentaram valores maiores para tensão de ruptura e alongação, também foi possível observar maior permeabilidade ao vapor d'água, consequência da maior porosidade e maior abertura das fibras destas amostras. Os couros tratados com enzimas apresentaram valores maiores para o percentual de cromo, o que pode ser atribuído a um número maior de sítios disponíveis para formação de *crosslinking*, provocado pela ação enzimática.

Conforme Sivasubramanian *et al.* (2008a), o processo enzimático não gera efluentes com alta alcalinidade, o que facilita e diminuiu o valor gasto para realizar o tratamento dos mesmos.

Valeika *et al.* (2009) estudaram a utilização de hidróxido de sódio em substituição ao hidróxido de cálcio, durante a etapa de depilação e caleiro. O método é baseado na utilização de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio e sais como cloreto de sódio, sulfato de sódio e fosfato de sódio para regulação da abertura e inchamento da pele. As vantagens deste método consistem na substituição do hidróxido de cálcio e na redução significativa do consumo de sulfeto de sódio, o qual é um dos compostos químicos mais perigosos presentes nos efluentes de curtumes. A desvantagem deste processo está no maior inchamento causado pelo hidróxido de sódio em relação ao hidróxido de cálcio. Além disso, este processo, da mesma forma que o processo tradicional, degrada o pelo.

De acordo com Valeika *et al.* (2009), enzimas tem sido uma possibilidade para evitar a degradação do pelo. O uso de enzimas é um dos métodos mais promissores para diminuir os danos ambientais causados pela indústria do couro. Usando enzimas podem-se obter menores tempos de processamento, diminuição da quantidade de produtos químicos utilizados, mudanças na estrutura da pele. Enzimas podem ser utilizadas no processo de depilação sem destruição do pelo, elas atacam a ligação entre o pelo e a derme, conduzindo a soltura/perda do pelo.

No trabalho de Valeika *et al.* (2009), foram utilizados diferentes preparados enzimáticos (proteases) para o processo de depilação de peles. A atividade proteolítica das enzimas foi determinada utilizando caseína como substrato. A quantidade de colagênio foi determinada a partir do conteúdo de hidroxiprolina nas soluções de remolho e caleiro. A quantidade de cistina nas soluções obtidas foi determinada através de método colorimétrico. A quantidade de cistina está relacionada à degradação da queratina, a cistina é um aminoácido específico da queratina. A quantidade total de proteína foi determinada através do método Kjeldahl (nitrogênio total). Os resultados obtidos indicaram que as melhores condições para aplicação da enzima são tempo de processo entre 5,2 e 7 horas, pH do banho entre 10,8 e 12,5 e quantidade de enzima entre 0,6 e 0,7% em relação a massa de pele utilizada. Os couros obtidos tiveram características semelhantes aos couros obtidos através do processo tradicional. O resíduo gerado foi menos poluente, sem conter compostos insolúveis de cálcio e nem grandes quantidades de sulfeto e proteínas solúveis. Em geral, o resíduo contém 20 vezes menos sulfetos. Porém o processo sugerido pelos autores ainda é em torno de 10 a 15% mais caro que o processo convencional.

Thangam *et al.* (2001) investigaram o potencial de depilação de uma protease alcalina isolada do microorganismo *Alcaligenes faecalis*. Os resultados indicaram que a protease é adequada para o uso na depilação de couros e pode ser explorada como um agente de depilação ecologicamente correto.

Paul *et al.* (2001) realizaram uma série de testes pilotos, para depilação de peles bovinas, usando uma enzima neutra. A enzima provocou a soltura do pelo e em consequência a perda dos mesmos, sem causar danos às fibras de colagênio da derme.

Raju *et al.* (1996) avaliaram a eficácia de uma enzima obtida a partir da bactéria *Bacillus* ssp. A atividade e o desempenho da enzima satisfizeram as condições necessárias para sua aplicação na depilação. Assim, a enzima é uma boa opção para a utilização de tecnologias limpas.

Gehring *et al.* (2002) utilizaram uma mistura de enzimas proteolíticas derivadas da bactéria *Streptomyces griseus* para a depilação de pedaços de peles bovinas. Este processo de remoção do pelo pode ser utilizado em substituição ao processo tradicional que utiliza sulfeto.

Crispim e Mota (2003) avaliaram a utilização de enzimas na depilação sem destruição do pelo. Dois preparados enzimáticos foram usados, comparados com o processo tradicional houve uma redução de 50% da quantidade de sulfetos presentes no efluente líquido e 40% menos sólidos suspensos.

Thanikaivelan *et al.* (2006) desenvolveram um bioprocessamento alternativo, baseado na utilização de uma alfa-amilase para a abertura das fibras. A enzima foi aplicada após o processo de depilação enzimático. Neste processo, observou-se a redução em 45% da carga da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e 20% dos sólidos totais comparados com o processo convencional. Os couros obtidos a partir do processo alternativo possuíam características similares as dos couros obtidos através do processo convencional.

Durante o processo chamado de purga da pele, as enzimas podem atuar na remoção de pelos e epiderme degradados, promover a remoção de proteínas não estruturais, aumentar a remoção de carboidratos. As enzimas constituem o princípio ativo da purga. As purgas empregadas no curtume podem ser obtidas de pâncreas de animais, culturas de fungos e bactérias, bem como outras fontes, como vísceras de peixes. Normalmente, as enzimas utilizadas nesta etapa são resultantes da moagem do pâncreas bovino, ovino ou suíno (HOINACKI, 1994).

Addy *et al.* (2003) estudaram a aplicação de uma mistura de proteases para aumentar a área de couros. Os autores aplicaram o combinado enzimático em couros já curtidos, assim, o colagênio é resistente a degradação e não sofre danos pela ação enzimática. O composto enzimático foi adicionado ao couro durante a etapa de neutralização, 10 a 15 minutos após a adição dos agentes neutralizantes. A mistura enzimática preparada por Addy *et al.* (2003) foi adequada para obtenção de couros macios, como couros para estofamento, vestuário e luvas. Os resultados obtidos apontaram para um aumento na área de 2%, sem prejuízos a qualidade do couro.

Kanth *et al.* (2009) aplicaram uma protease ácida para aumentar a difusão de curtentes vegetais e, conseqüentemente obter melhor aproveitamento dos mesmos. Conforme os resultados obtidos pelos autores, o aproveitamento do curtente (esgotamento do banho) para o processo tradicional de curtimento foi de aproximadamente 85%, a temperatura de encolhimento do couro obtido foi de 82°C e o tempo necessário para que ocorresse a difusão (atravessamento) do curtente foi de 6,5 horas. Para o processo enzimático (0,2% de enzima, pH 4,5, tempo de ação de 30 minutos) o aproveitamento do curtente ficou em torno de 97%, a temperatura de encolhimento aumentou para 86°C e o tempo necessário para a difusão do curtente diminuiu para 4,5 horas. Propriedades de resistência como tensão de ruptura, tração e alongamento não apresentaram diferenças significativas entre o processo convencional e o enzimático.

Segundo Kanth *et al.* (2009), enzimas agem como biocatalisadores provocando abertura na rede de fibras do couro, assim, aumentam a difusão dos curtentes vegetais através da pele e a superfície de contato, possibilitando mais interações entre o agente curtente e a pele. Os autores observaram, através de análise de microscopia eletrônica de varredura, que a pele submetida ao tratamento enzimático apresentou maior abertura das fibras. Além disso, observou-se que não houve outras mudanças ou destruição da estrutura fibrosa. Ainda conforme os autores, para o processo enzimático houve diminuição nos níveis de sólidos totais, cloretos e DQO no efluente gerado, em 76, 97 e 25%, respectivamente. Os autores também realizaram uma avaliação econômica de ambos os processos e observaram que não há diferença significativa nos custos dos dois processos.

Kanth *et al.* (2008) estudaram a aplicação de uma colagenase bacteriana no tingimento de couros. Os autores obtiveram bons resultados, a exaustão (aproveitamento) dos corantes no banho chegou a 99%, enquanto que para o processo normal a exaustão do corante no banho atingiu no máximo 85%. A utilização das enzimas também fez com que se obtivessem couros mais macios e com as propriedades de resistência quase inalteradas.

De acordo com Whiteley e Lee (2006), a utilização de enzimas para o tratamento de resíduos foi proposta pela primeira vez em 1930, mas apenas nos anos de 1970 que enzimas foram utilizadas efetivamente para remoção de poluentes específicos.

Também pode ser realizado tratamento enzimático nos resíduos gerados durante o processamento do couro. Para resíduos não curtidos podem ser utilizadas enzimas proteolíticas, neutras e alcalinas, gerando hidrolisados ricos em gordura e proteínas, em temperaturas em torno de 50°C. Para os resíduos curtidos, portanto contendo cromo, obtêm-se através da hidrólise enzimática, três frações: a torta contendo cromo, proteínas e colagênio hidrolisado.

Kumar *et al.* (2008) estudaram a obtenção de uma protease alcalina a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* utilizando resíduos protéicos (não curtidos) de curtumes. A remoção seletiva de proteínas não fibrilares, como albumina e globulina, foi confirmada através de análise de microscopia eletrônica de varredura. A decomposição dos resíduos também foi confirmada através da análise (HPLC) dos aminoácidos liberados pela fermentação causada pela bactéria. Conforme os autores, o método microbiológico para a hidrólise dos resíduos protéicos é uma alternativa interessante aos métodos, químicos e térmicos, utilizados atualmente para o tratamento de resíduos sólidos.

Jian *et al.* (2008) estudaram a utilização de uma protease alcalina, obtida do *Bacillus licheniformis*, na degradação de resíduos de couros não curtidos (após o caleiro). Os autores também estudaram a influência do ultra-som (40 kHz) na hidrólise dos resíduos. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, com a utilização conjunta do ultra-som e da enzima, a hidrólise dos resíduos não curtidos passou de 57,6% para 84,1%. Segundo os autores isto ocorre, porque o ultra-som facilita a difusão da enzima através dos poros da pele e prejudica a integridade do colagênio. O pH utilizado durante a ação da enzima foi de 9,5 e a temperatura de 40°C. Através da análise dos aminoácidos presentes na solução final, após ação da enzima e do ultra-som, os autores observaram que ocorre o rompimento de regiões helicoidais do colagênio, as quais dificilmente são atacadas por proteases.

Amaral *et al.* (2008) estudaram a descromagem de serragem gerada na operação de rebaixamento (realizada para nivelar a espessura dos couros) de duas formas: através de ação enzimática, utilizando uma enzima experimental da Buckman *Laboratories*, e de bactérias redutoras, *Pseudomonas aeruginosas*, bem como avaliaram as possibilidades de utilização dos subprodutos obtidos após estes tratamentos. As variáveis testadas na etapa enzimática, em diferentes faixas, foram pH, temperatura, tempo de ação e quantidade de enzima necessárias para a ação nos resíduos cromados. Para a etapa bacteriana o pH foi controlado e foram testados diversos tempos de permanência da serragem em contato com a bactéria, após o qual as amostras foram filtradas, o líquido remanescente foi autoclavado a 120°C por 15 minutos e separado para a análise de cromo total.

2.4.3 Avaliação da ação enzimática em peles

Além do conhecimento das características da enzima a ser aplicada na pele para os mais diversos fins, é importante poder avaliar de forma quantitativa a ação da enzima na pele.

As formas descritas na literatura recentemente versam sobre a determinação de proteínas, proteínas interfibrilares (glicosaminas e proteoglicanos) e hidroxiprolina, além da avaliação da superfície da pele (camada flor) em microscópio óptico e/ou eletrônico. O efeito da ação enzimática também deve ser avaliado com base na resistência mecânica do couro obtido.

As glicosaminas também denominadas mucopolissacarídeos, são carboidratos lineares de peso molecular elevado, formados pela polimerização do ácido urônico e hexosamina (glicosamina ou galactosamina). A glicosamina mais comum é o ácido hialurônico, as demais são: sulfato de condroitina, sulfato de dermatana, queratossulfato e sulfato de heparitina. De acordo com Valeika *et al.* (2009), o sulfato de dermatana é parcialmente removido durante o processo de depilação/caleiro. Conforme BLC (2009), o sulfato de dermatana removido durante a depilação/caleiro é associado com a abertura da estrutura de fibras. Uma remoção eficiente do sulfato de dermatana resulta em uma estrutura de fibras abertas, facilita a difusão de insumos químicos de processos subsequentes, produz um couro macio, aumenta sua área, porém a remoção excessiva resulta em um couro solto e fraco.

Os proteoglicanos são proteínas extracelulares ligadas a glicosaminas (estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados). O principal proteoglicano é a decorina, constituída de uma única cadeia de sulfato de dermatana ligada a uma cadeia polipeptídica. De acordo com Ramos e Liu (2010), a remoção eficiente dos proteoglicanos da pele é importante para a qualidade do couro, promovendo maciez e flexibilidade.

Conforme Madhan *et al.* (2010), a remoção de material interfibrilar, tais como proteoglicanos e glicosaminoglicanos são parte fundamental do processo de caleiro e purga convencionais. Para a etapa de purga da pele, a remoção de material interfibrilar é facilitada através do uso de enzimas proteolíticas. A remoção de proteínas interfibrilares durante os processos de caleiro e purga é um processo estabelecido, porém a quantificação destes materiais não está bem desenvolvida. Os autores desenvolveram uma metodologia para a determinação da remoção destas proteínas durante o processo de caleiro e purga. Os métodos desenvolvidos pelos autores consistiram na construção de curvas padrão, utilizando mucina para a quantificação de proteoglicanos e sulfato de condroitina para a determinação da quantidade de glicosaminas, estes métodos foram utilizados no presente trabalho de doutorado para quantificação das proteínas interfibrilares removidas durante o processamento das peles.

A hidroxiprolina é um aminoácido característico do colágeno, sendo pouco encontrado em outras proteínas. Dentre os aminoácidos presentes na estrutura do colágeno, os que aparecem com maior frequência são a hidroxiprolina (11,28 %), prolina (11,77 %), glicina (33,43 %), alanina (11,97 %) e arginina (5,04 %) (MANCOPES *et al.*, 2008). Por esta razão, o conteúdo de hidroxiprolina tem sido utilizado como um indicador para a determinação de colágeno em peles ou liberação indesejada do mesmo em banhos de processos. A Tabela 2.4 apresenta uma estimativa do conteúdo de hidroxiprolina em diferentes tipos de pele.

Tabela 2.4: Conteúdo de hidroxiprolina em diferentes tipos de pele

Tipo de proteína	Hidroxiprolina/100g de proteína	Fator de conversão
Colágeno de peles de mamíferos	13,45	7,46
Colágeno de diferentes tipos de peixe	7,00 – 10,90	9,20 – 14,30

Fonte: Reich, 1966

Neste trabalho, a hidroxiprolina liberada para o banho foi quantificada conforme o método desenvolvido pelo Instituto Filk (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Alemanha, 2009 - trabalho não publicado).

Além das análises supra citadas, outra avaliação comum no caso da aplicação de enzimas nas diversas etapas de processamento de peles em couro é a determinação da resistência a tração e o alongamento, além da resistência ao rasgamento (AQUIM *et al.*, 2008a; JIAN *et al.*, 2011; SARAVANABHAVAN *et al.*, 2003 e 2004; LI *et al.* 2010).

Capítulo 3

Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather process

Artigo publicado no periódico: *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, p. 373 – 380, 2011.

Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture

Aline Dettmer^{a,*}, Marco A. Z. Ayub^b, Mariliz Gutterres^{a,*}

^aChemical Engineering Department, Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), Federal University of Rio Grande do Sul, Luiz Englert str., s/n°, 90.040-040, Porto Alegre – RS, Brazil

^bFood Science and Technology Institute, BiotecLab, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, 91570-901 Porto Alegre – RS, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 3954; fax: +55 51 3308 3277.

E-mail addresses: alinedet@enq.ufrgs.br, mariliz@enq.ufrgs.br

Abstract

The enzymatic treatment of hides in tannery processes is a promising technology. However, the reaction kinetics of commercial enzymes available to the leather industry are not fully understood and their activities have been mainly determined over model proteins such as casein as substrate, which is not of direct relevance in cattle hides. Therefore, it is important to determine their activities on collagen and keratin, the main proteins of skin, in order to use these enzymes in leather processing. This work describes the study of five proteases, used commercially in tanneries, to assess their ability to act upon collagen and keratin and to determine their unhairing. Results showed that all tested commercial enzymes had more activity on collagen than on keratin. Unhairing was also tested and four out of five enzymes tested showed some unhairing activity. Optima of temperature and pH of enzymes were very similar for all five enzymes, with maximal activities around 55°C and 9 to 12, respectively.

Keywords: Unhairing commercial enzymes, enzyme characterization, leather tanning.

3.1 Introduction

The leather industry converts hide (putrescible) into commercial leather (non-putrescible) using large amounts of chemicals, generating environmental impact. Leather processing involves a series of unit operations, of which the process of unhairing is the first major step in the leather making. The pelt has to be freed from the epidermis and hair, including the hair roots, and the keratinous material filling the hair follicles before proceeding to the next step, the tanning (Sivasubramanian *et al.* 2008). During the unhairing process large quantities of water and toxic chemicals are employed, such as sulfide, generating huge amounts of effluent that must be treated, as well as solid wastes, which could be reused or better treated to avoid soil and water contaminations (Zhi-Hua *et al.*, 2009; Priya *et al.* 2008; Galarza *et al.*, 2009).

Despite its high environmental impact, the leather industry is economically important in regions where tanneries are prevalent and, in 2008, 343 million pieces of leather were produced worldwide. In this context, Brazil is one of the world's largest leather producers, with a production of 44 million pieces in 2009, representing 13% of the total global production (Brazilian Guide of Leather, 2010).

The application of biotechnology in leather manufacturing, with the replacement of chemicals for enzymes, is an alternative for the reduction of the environmental impact. Enzymes can be applied in different steps of the process such as in soaking, liming, unhairing, bating, dyeing, degreasing, and also for effluent treatment, both solid and liquid (Kanth *et al.*, 2009; Kanth *et al.*, 2008; Macedo *et al.*, 2005; Dayanandan *et al.*, 2003; Lutckmeier *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Despite being consolidated for other industrial applications, the use of enzymes in the leather industry needs more research to be effectively used in large scale operations and at competitive costs. Enzymes have been used in tanning industries for several years, but the majority of enzymatic preparations do not present sufficient specificity. Some of the expected advantages of using enzymes in leather processing are the shorter wetting time, better fiber opening, solubilization and removal of proteins, fat and carbohydrates (Thanikaivelan *et al.*, 2004). Enzymes could also be used for the unhairing process, on epidermis and hair removal, removal of residual components, removal/dispersion of adipose components, and reduction on effluent load (Wang *et al.*, 2009).

The currently marketed enzymes lack sufficient specificity and their characteristics are not well established in detail. Usually, their activities were determined using casein as substrate (BASF, 1995), while cattle hides do not have this protein in its composition. Therefore, it is important to establish their activities on collagen, the main component of animal skin, and keratin in order to allow their use in the leather processing.

In this work, commercial enzymes available for the soaking, liming, and bating processes were characterized for their best pH, temperature, thermal stability, and the influence of inhibitors. Furthermore, due to the possibility of eliminating the use of lime and sulfide, these commercial enzymes were also tested in hide unhairing process.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Chemicals

Five commercial protease preparations were used in this research and, for simplicity, they were identified as “A” to “E”. Enzymes A (Buzyme 7703, Buckman Laboratories), B, and C (Tanzyme RD 04 and CD 05, respectively, are both provided by Tanquímica) are non-specified preparation of microbial proteolytic enzymes, recommended for soaking and liming by their producers. Enzyme D (Tanzyme P 10, from Tanquímica), is a trypsin, while enzyme E (Buzyme 7706, from Buckman Laboratories) is a preparation of proteolytic enzymes. They are both applied during bating process. The substrates for the enzymes used in his work were azocasein, keratin azure, and azocoll, and they were bought from Sigma-Aldrich. All other reagents were of analytical grade.

3.2.2 Proteolytic assay

Proteolysis using azocasein as substrate was based on Giongo *et al.* (2007). Enzymatic solutions were prepared immediately before their use with concentrations of 5 mg of commercial enzyme/ml of distilled water. The reaction mixture contained 100 μ l of substrate (azocasein 10 mg/ml), 100 μ l of buffer (0.1M sodium bicarbonate or sodium phosphate,

according to pH value), and 100 μ l of enzyme solution (5 mg of enzyme/ml of distilled water). Samples were incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was stopped using 500 μ l of 10% trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation at 10,000 g for 5 min, 800 μ l of the supernatant were added to 200 μ l of 1.8N NaOH and the absorbance was determined at 420 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 420 nm for 30 min at 37°C. Reaction controls were prepared by adding the enzyme solution, buffer and substrate solution to TCA.

3.2.3 Keratinolytic and Collagenolytic assay

Enzymatic activities on keratin and collagen were determined using keratin azure and azocoll as substrates, respectively. The methodology was adapted from Adigüzel *et al.* (2009) and Ionata *et al.* (2008).

Keratinolytic activity was determined by incubating 500 μ l of enzyme solution with 4 mg of keratin azure and 500 μ l of buffer (0.1 M sodium bicarbonate or sodium phosphate, according to pH value). The reaction mixture was incubated at 55°C, for 30 min under agitation. After centrifugation at 10,000g for 5 min, the absorbance was determined at 595 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 595 nm for 30 min at 55°C. The control was prepared adding enzymatic solution and buffer, without substrate. The same procedure was used to evaluate enzymatic activity for azocoll.

3.2.4 Effects of pH and temperature on enzymatic activities

The enzymes were characterized for their optimum pH, temperature, and thermal stability, using azocasein as substrate. The activities were evaluated in 0.1M sodium phosphate (pH 6 – 8), or in 0.1M sodium bicarbonate (pH 9 – 13) buffers, at 37°C. The effect of temperature on enzymatic activities was tested between 28 and 75°C, with the pH fixed in its best value, previously determined. The thermal stability of the enzymes were determined at their optimal pH, with enzymatic solutions being exposed to temperatures of 37, 45, and 55°C for 15, 30, 60, and 120 min. The residual enzymatic activities were determined as described above at 37°C and using azocasein as substrate.

3.2.5 Effect of inhibitors and some chemical products on the enzymatic activity

The effects of some chemicals on the activities of enzymes were tested. The chemicals were: 5 mM EDTA; 0.1% (w/v) surfactant (Eusapon, Basf); 0.1% (v/v) fatty alcohols (Busperse 7769, Buckman Laboratories); salts (0.5 and 1% w/v calcium carbonate; 0.3% w/v sodium carbonate); and 1% (w/v) sulfides; which are normally used during the leather production process. Although CaCO₃ is insoluble at these concentrations, it were used to follow the practice by the leather industry, since the excess of this salt provides for skin saturation. Enzymatic solutions (50 ml of 5 mg enzyme/ml of distilled water) were preincubated for 15 min at room temperature with the tested chemicals at room temperature. The residual enzymatic activities were determined as described above at 37°C and using azocasein as substrate.

3.2.6 Unhairing activity

Bovine skin pieces weighing approximately 40 g were immersed in the enzyme solution (5 mg of commercial enzyme/ml of distilled water, pH 8) and incubated for 18 h at room temperature. About 2 ml of enzyme solution/g of hide were used for these experiments. The tests were conducted in a laboratory drum cylindrical rotating reactor (which is used for hide and leather processing) at 24 rpm. The next day the pieces were analyzed for presence or absence of depilated areas and change of color after incubation with the enzymatic solution.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Effects of pH and temperature on the proteolytic activities

The effects of pH on the enzymatic activities of the five commercial enzymes are shown in Figure 3.1 (A). As can be seen, proteolytic activities varied markedly from enzyme to enzyme but in general they followed the expected profile suggested by their producers. Enzymes A, B, and C are recommended to be used in soaking and liming processes, where the usual pH ranges from 7.0 to 13.0. While Enzymes D and E are recommended for the bating process, in which the pH varies between 7.5 and 10. Almost all the tested enzymes showed a remarkable loss of activity at pH lower than 7 and higher than 13, showing a plateau of high activity for pH varying from 7 to 12. These plateaus suggest the presence of two or more isoforms of the enzymes with the same specific substrate activities, but dependent on pH variations. Mixtures of enzyme isoforms are common in commercial enzymatic preparations for technical applications such as in the leather industry. These preparations can be used over a large range of pH, which is interesting from the industrial point of view.

The profile of temperature influence over proteolytic activities can be observed in Figure 3.1(B), with maximal activities around 55°C for enzymes A, B, and C, while enzymes D and E showed their best for 37°C. Enzymes used for bating process (enzyme D) are from the pancreatic family, such as trypsin, explaining their usually lower activities at higher temperatures. Above 60°C all enzymes presented decreased activities. These temperature profiles are similar to those found by other authors. The enzyme described by Ionata *et al.* (2008) had optimal activity at 55°C, while Farag and Hassan (2004) also reported the highest activities for a keratinase from *Aspergillus oryzae* at 55°C.

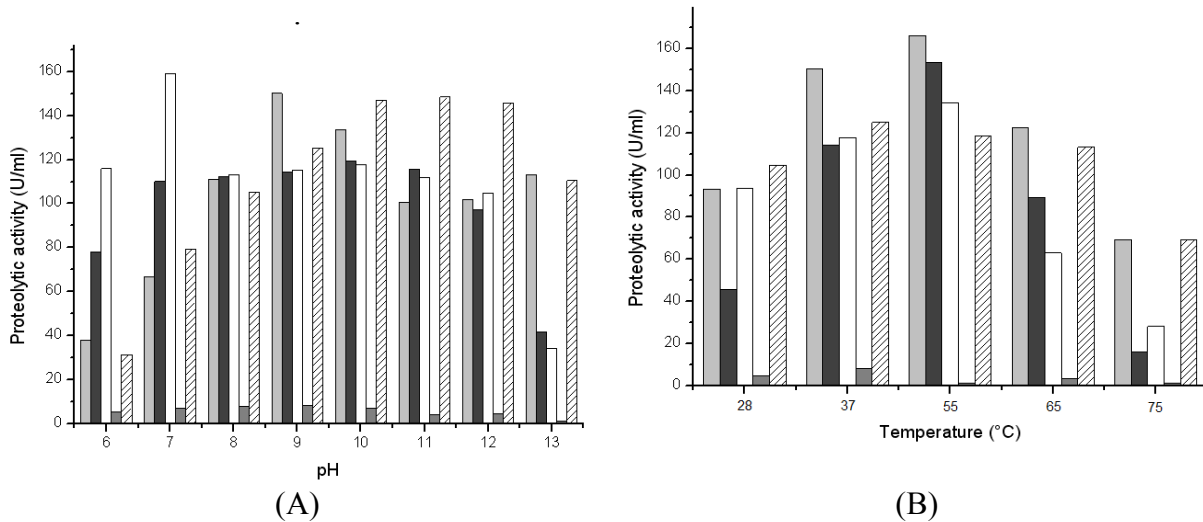


Figure 3.1: Effect of (A) pH and (B) temperature on the proteolytic activity, using azocasein as substrate. Enzyme A (□), enzyme B (■), enzyme C (□), enzyme D (■), enzyme E (▨).

3.3.2 Thermal stability of enzymes

The thermal stability of enzymes is very important for their industrial utilization. In Figure 2, the thermal stability profiles of all enzymes tested are presented. Enzyme A was the most stable, maintaining its activity for 120 minutes at 37 and 45°C, although even short times of incubation at 55°C were sufficient for its inactivation. The remaining enzymes were less stable at any tested temperature. Tatieni *et al.* (2008) reported that the activity of an enzyme from *Streptomyces* sp. was 80% stable at 50°C and completely inactivated at 70°C and higher temperatures. Ogino *et al.* (2008) evaluated the thermal stability of a *Bacillus* sp. enzyme. The authors found that the enzyme was stable from 30 to 40°C and about 60% of the activity remained at 50°C, losing completely its activity above 60°C for 10 min.

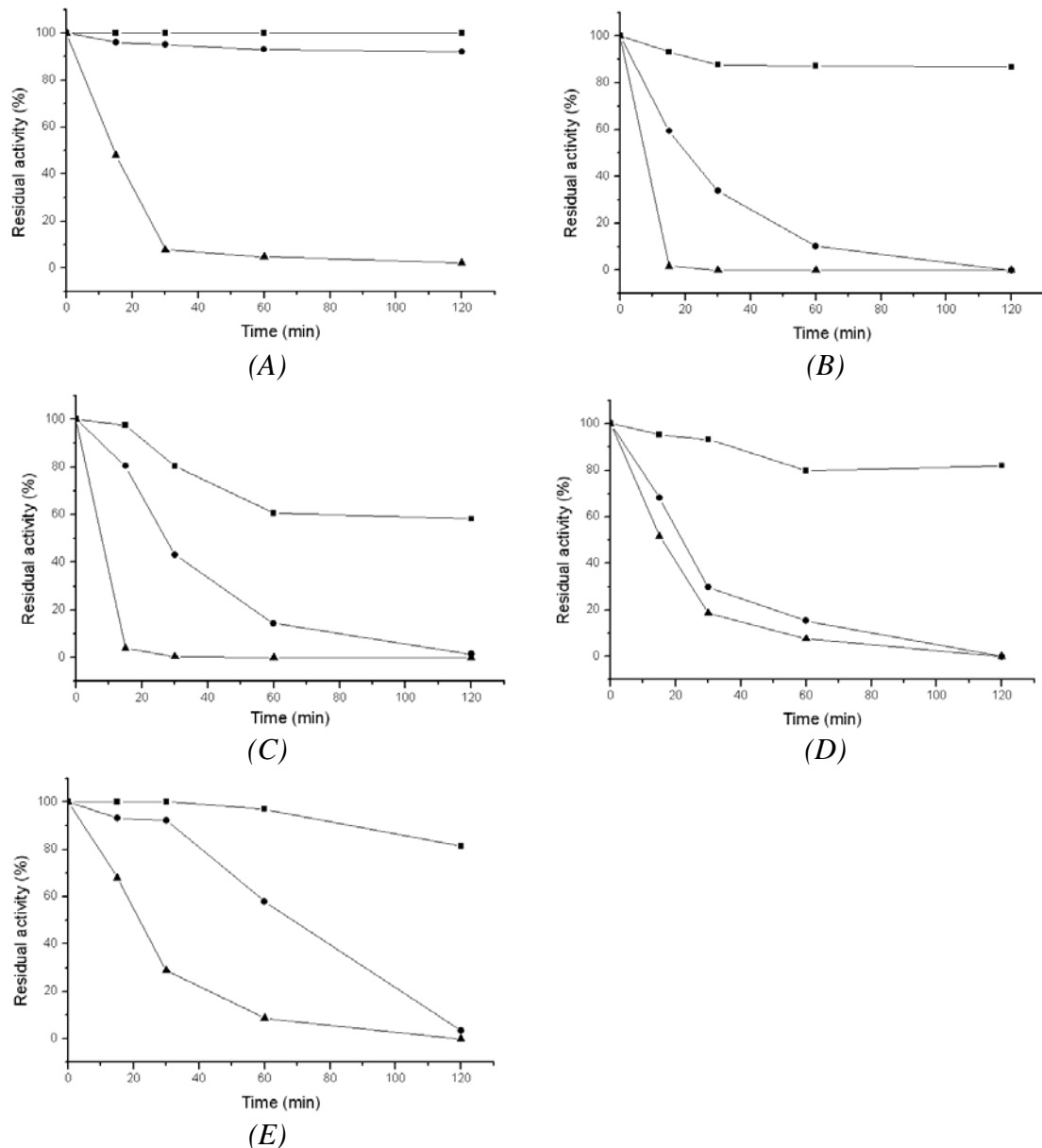


Figure 3.2: Thermal stability of protease preparations A, B, C, D and E. 37°C (—■—), 45°C (—●—), 55°C (—▲—).

3.3.3 Enzymatic activities over different proteic substrates: Azocoll, keratin azure, and azocasein

Hides are mainly constituted of three layers: epidermis, which is basically keratin, dermis that is composed of collagen fibers, and hypodermis, mainly fat, which is completely removed during the fleshing process. Therefore, we carried out experiments testing the activities of the 5 enzymes over different types of substrates, simulating different proteic structures. These were azocoll, keratin azure, and azocasein, and the results are summarized in Table 3.1. Ratios between activities on different substrates are presented in Table 3.2.

Table 3.1: Proteolytic activity on different substrates

Substrate	Enzymatic activity (U/ml)				
	Enzyme				
	A	B	C	D	E
Keratin azure	25±1.98	11±3.00	12±0.2	5±0.3	13±1.76
Azocoll	110±0.85	32±1.70	25±5.2	8±1.3	76±0.6
Azocasein	166±3.96	153±1.27	134±2.1	8±0.57	145±1.91

Values were means ± standard deviation for three samples of the experiment.

Enzymes A, B, C and E exhibited the highest activities for azocasein, but were also active with the other substrates, keratin azure and azocoll. Keratin azure, which is an insoluble substrate, was less susceptible to enzymatic attack. According to Ionata *et al.* (2008), data from soluble proteins cannot be compared with those for insoluble proteins since the mechanism of action of enzymes on this substrate will be a function of the surface area. Enzyme A showed the highest activities among all enzymes tested, justifying its use in hide unhairing. However, its high activity with collagen (azocoll) might cause loss of skin mechanical strength and, therefore, its use must be carefully controlled. Keratinolytic proteases with mild collagenolytic and elastolytic activities might be particularly suitable for enhancing the dehairing process without harming the tensile strength of leather (Gupta and Ramnani, 2006). Results for collagenolytic activity suggest that enzymes A and E should be applied carefully, observing the time and amounts indicated in order to avoid loss of mechanical strength of the leather.

According to the ratios between keratin azure/azocasein and azocoll/azocasein, all 5 commercial enzymes can be classified as collagenolytic enzymes. All tested enzymes presented higher activities with collagen than with keratin, as can be seen in the results presented in Table 3.2. These results contrast with other reports, which presented higher ratios between keratin azure and azocasein than those for the commercial enzymes described in this work, as well as lower azocoll activities

Table 3.2: Ratios between proteolytic activities on different substrates

Substrate	Ratios Between Enzymatic activities							
	Commercial Enzymes					Other Works		
	A	B	C	D	E	Farag <i>et al.</i> (2004)	Pillai and Archana (2008)	Macedo <i>et al.</i> (2008)
Keratin azure/ Azocasein Ratio	0.15	0.07	0.09	0.63	0.09	0.92	0.94	0.012
Azocoll/Azocasein Ratio	0.66	0.21	0.19	1.00	0.52	0.83	0.125	0

3.3.4 Inhibitors of enzymes activities

The salts and other chemicals present in industrial solutions may interfere with enzyme activity and therefore must be tested in order to prevent process losses. Table 3.3 presents the results of the effects of inhibitors and other chemical products on the enzymatic activities of the tested enzymes.

Table 3.3: Effect of some inhibitors and chemical products on the enzymatic activity

Chemical	Concentration	Residual Caseinolytic Activity (%)				
		Enzyme				
		A	B	C	D	E
EDTA	5 mM	87±3.97	33±1.70	69±0.70	87±0.70	104±2.58
Fatty alcohol (Busperse 7769)	0.1% (v/v)	111±1.50	96±1.60	100±3.45	85±0.76	96±2.75
Sodium carbonate	0.3% (w/v)	103±0.20	97±1.37	97±3.97	103±0.21	98±2.90
Calcium carbonate	0.5% (w/v)	85±3.30	107±4.33	77±0.78	0	83±0.68
	1% (w/v)	76±6.92	113±13.71	79±1.27	0	85±8.76
Surfactant (Eusapon)	0.1% (w/v)	87±7.20	92±1.77	87±1.31	161±1.60	82±4.34
Sodium sulfide	1% (w/v)	138±2.57	54±1.30	57±3.97	44±1.40	75±0.75

Values were means ± standard deviation for three samples of the experiment.

EDTA caused reductions of the activities of enzymes B and C, with little or no effect on enzymes A, D, and E. This might indicate the presence of metallic cations at the active centres of enzymes B and C, susceptible to EDTA sequestration (Kumar and Takagi, 1999). According to the manufactureres, enzymes B and C are non-specific preparations of microbial proteolytic enzymes, probably a mix of metalloproteases (inhibited by EDTA) and other proteases. These explain the residual activity of enzymes A, D and E after contact with EDTA, because these enzymes may not be metalloproteases or may contain a minor fraction of metalloproteases. Tatineni *et al.* (2008) reported that a keratinase from *Streptomyces* sp. retains only 27% of its original activity after incubation with EDTA.

Fatty alcohol, which is an organic solvent, sodium carbonate, and the surfactant caused no significant variations in enzymes activities, except for enzyme D, which was more active in the presence of the surfactant, possible because this agent might have facilitated its action. Riffel *et al.* (2003) determined the residual activities of bacterial enzymes after incubation with organic solvents, the remaining activities being between 56 and 70%. Enzyme D was completely inhibited when incubated with calcium carbonate. Enzymes B, C and D were inhibited by sodium sulfide, while enzyme A was activated by this chemical. Syed *et al.* (2009) reported that a keratinase from *S. gulbargensis* was totally inhibited by calcium compounds and its activity increased in the presence of sodium sulfite. Riffel *et al.* (2007) reported that a protease from *Chryseobacterium* sp. showed a 3.5 fold increase in its activity in the presence of calcium ions.

3.3.5 Enzyme application on leather unhairing

After these activities characterizations, the commercial enzymes were applied in leather unhairing process to see whether their applications were promising. Figure 3.3 shows the results.

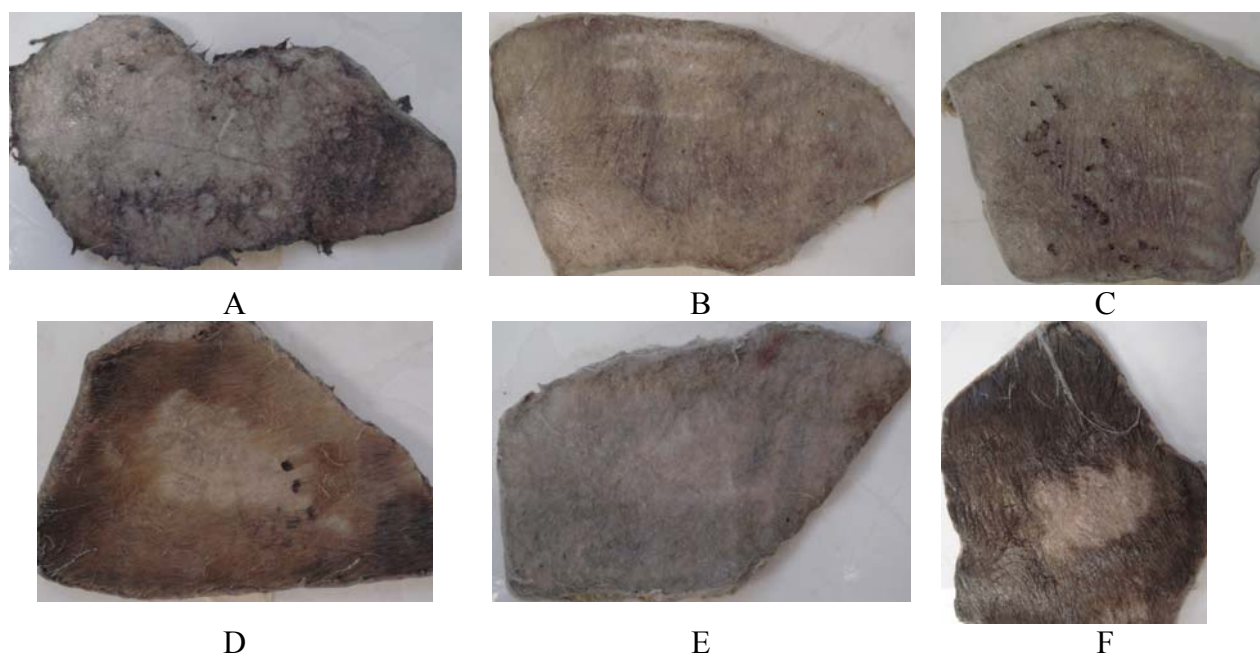


Figure 3.3: Hide unhairing tests. Enzyme A (A); Enzyme B (B); Enzyme C (C); Enzyme D (D); Enzyme E (E); Control, without enzyme (F). The unhaired box in the control was mechanically produced with a razor to serve as area of reference.

The enzymatic treatment of the hides produced significant differences compared to the control. Hides treated with enzymes A, B, C, and E presented large depilated areas. These hides presented a dark coloration, caused by the incomplete removal of epidermis and pigments. According to Priya *et al.* (2008), enzymatic processes are associated with problems such as high cost, potential hide damage, processing time, retention of ‘fine’ or ‘short’ hairs after depilation, improper removal of epidermis and pigments, and the inability to control the action of the enzyme on the desired reticular structure of the dermis. Enzyme D showed a weak activity on leather, probably due to its low proteolytic, collagenolytic, and keratynolytic activities. Galarza *et al.* (2009) reported that the use of proteolytic enzymes in the unhairing process causes the digestion of the cells in the Malpighi’s layer, of the basal cells of the hair bulb, degrading the medulla, but not the cortex. The keratin in the cortex is called hard keratin, as opposed to the soft keratin that is found in the hair medulla. During enzymatic unhairing (or hair loosening) there is a partial or total destruction of the tissues sustaining the hairs, the components of the epidermis surrounding the follicle and the root sheaths. These tissues contain few disulfide bonds compared with hard keratins. It can, therefore, be suggested that the commercial enzymes tested in this work presented some capability to digest the soft α -keratin. Pillai and Archana (2008) reported that an enzymatic preparation from *Bacillus subtilis* was ineffective in the hydrolysis of native α -keratin, while under similar conditions, the feather β -keratins were nearly completely degraded.

3.4 Conclusions

The results of this work may help to elucidate some properties of enzymes used or recommended for leather production, including the determination of the ideal pH and temperature in which the enzymes will show best stabilities and activities. Activities on different substrates were tested, showing that enzyme A could be efficiently used for leather

unhairing due to its good activity on keratin azure and azocoll, with enzymes B, C, and E showing a somewhat smaller unhairing activity. The chemicals normally used during leather production did not inhibit most of the tested enzymes.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq (CTAgro 40/2008) and CAPES Brazilian Agencies for their financial support of this study and for scholarships for the first author.

3.5 References

- ADIGÜZEL, A.C.; BITLISLI, B.O.; YASA, I.; ERIKSEN, N.T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 226-234, 2009.
- BASF, Vademécum para el técnico em curtición. 3ª edición, revisada y ampliada, agosto 1995.
- Brazilian Guide of Leather, ABQTIC, 2010.
- DAYANANDAN, A.; KANAGARAJ, J.; SOUNDERRAJ, L.; GOVINDARAJU, R.; RAJKUMAR, G. S. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *J of Cleaner Production*, **11**, 533-536, 2003.
- FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 85-93, 2004.
- GALARZA, B.C.; CAVELLO, I.; GRECO, C.A.; HOURS, R.; SCHULDT, M.M.; CANTERA, C.S. Alternative Technologies for adding value to bovine hair waste, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **94**, 26-32, 2009.
- GIONGO, J.L.; LUCAS, F.S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 375-382, 2007.
- GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol Biotechnol*, **70**, 21-33, 2006.
- IONATA, E.; CANGANELLA, F.; BIANCONI, G.; BENNO, Y.; SAKAMOTO, M.; CAPASSO, A.; ROSSI, M.; LA CARA, F. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov. a thermotolerant organism isolated from solfatic muds. *Microbiol. Research*, **163**, 105-112, 2008.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. *Dyes and pigments*, **76**, 338-347, 2008.

KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. *J. of Cleaner Production*, **17**, 507-515, 2009.

KUMAR, A.G.; SWARNALATHA, S.; SAIRAM, B.; SEKARAN, G. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresource Technol*, **99**, 1939-1944, 2008.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Advances*, **17**, p. 561-594, 1999.

LUTCKMEIER, C.; AMARAL, L.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N; Dechroming of wet-blue leather wastes, XVII FLAQTIC Congress, Rio de Janeiro, 2008.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiol*, Jan. 2005, 594-596.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; TERMIGNONI, C. Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *Can. J. Microbiology*, **54**, 180-188, 2008.

OGINO, H.; OTSUBO, T.; ISHIKAWA H. Screening, purification and characterization of a leather-degrading protease. *Biochem. Engineering J.*, **38**, p. 234-240, 2008.

PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 643-650, 2008.

PRIYA, S.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R.; RAMASAMI, T. Depilation of skins by pure enzymes. *J. of the Society of Leather Technologists and Chemists*, **92**, 214-221, 2008.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.*, **179**, 258-265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J. of Biotechnol.* **128**, 693-703, 2007.

SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOHAR, B.M.; RAJARAM, A.; PUVANAKRISHNAN, R. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, **70**, 1015-1024, 2008.

SYED, D.G.; LEE J.C.; LI, W.J.; KIM, C.J.; AGASA, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.*, **100**, 1868-1871, 2009.

TATINENI, R.; DODDAPANENI, K.K.; POTUMARTHI, R.C.; VELLANKI, R.N.; KANDATHIL, M.T.; KOLLI, N.; MANGAMOORI, L.N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces sp.* *Bioresource Technol.*, **99**, 1596-1602, 2008.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR B.U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing, *Trends in Biotechnol.*, **22**, 2004.

ZHI-HUA, S.; QING, L.S.; JIAN-WEI, L.; OLLIS, D.L. Lime-free removal of non-collagen proteins from sheepskins: quantitative analysis by gel electrophoresis. *J. of the Society of Leather Technol. and Chem.*, **93**, 229-232, 2009.

WANG, R.; MIN, C.; HAIMING, C.; LI, Z. Enzyme unhairing – an eco-friendly biotechnological process. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **93**, 51-55, 2009.

Capítulo 4

Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides

Artigo aceito para publicação no periódico: *Chemical Engineering and Technology*, em janeiro de 2012.

Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides

Aline Dettmer^{a,*}, Jhonnattas Coelho Cavalheiro^b, Élitia Cavalli^a, Daniele Misturini Rossi^b, Carolina de Souza Gusatti^c, Marco Antônio Záchia Ayub^{b,*}, Mariliz Gutterres^{a,*}

^aChemical Engineering Department, Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), ^bFood Science and Technology Institute, Biotechnology Laboratory (BiotecLab), ^cMicrobiology Department, Institute of Basic Sciences of Health; Federal University of Rio Grande do Sul, Luiz Englert str., s/n^o, 90.040-040, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding authors. Tel.: +55 51 3308 3954; fax: +55 51 3308 3277;
E-mail addresses: alinedet@enq.ufrgs.br (A. Dettmer); mariliz@enq.ufrgs.br (M. Gutterres); mazayub@ufrgs.br (M. A. Z. Ayub).

ABSTRACT

In this work is described the screening and isolation of a new *Bacillus subtilis* strain and the production of its proteases for leather unhairing. *B. subtilis* strain BLBc 11 was isolated from the aerobic sludge of a tannery and the optimization of enzyme production by this bacterium was carried out using Plackett-Burman and Central Composite Design. The unhairing and inter-fibrillary removal capabilities were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and by the determination of proteoglycans and glycosoaminoglycans. Crude enzymatic extracts of cultures of *B. subtilis* BLBc 11 were used for the unhairing process of hides showing excellent results, suggesting that this safe enzymatic preparation can be used for the replacement of the toxic chemicals commonly used in this process.

Keywords: Leather production; hide unhairing optimization; proteolytic enzymes; sulfides replacement.

4.1 Introduction

The leather industry poses a potential negative impact for the environment, since it employs large quantities of water and chemicals, generating high amounts of liquid effluents and solid wastes that must be treated. Chemicals such as chromium (III), used for tanning, and sodium sulfides that are employed for unhairing, present the risk to be converted to their toxic forms, chromium (VI) and hydrogen sulfides, when they are disposed of in solid wastes and residual waters. Noxious gasses such as H₂S can also be produced and released to the environment during the wastewater treatment [1]. Leather processing involves a series of unit operations in which the process of unhairing is the first major step, preparing the hide for the tanning operation [2]. The conventional unhairing process is the most polluting stage of this industry, since it uses hazardous chemicals, such as hydrogen sulfide and lime, representing approximately 80% to 90% of the total pollution of leather manufacturing. Human exposure to high levels of hydrogen sulfide (H₂S) has been associated with a number of respiratory and neurological problems, and it is fatal to humans and animals at concentrations as low as 200 ppm. The extensive use of hazardous sulfide not only leads to unfavorable consequences for the environment, but also undermines the efficiency of effluent treatment plants [3-6].

Despite these facts, lime and sulfide are largely used for leather unhairing, since they are inexpensive. Therefore, research is in need for the substitution of these chemicals, with biological and enzymatic methods been emphasized as promising technologies [3]. However, the prices of enzymes are too high to be economically and extensively used by the leather industry. In this context, it is important the understanding of the chemical composition of leather in order to allow for better enzyme applications. In the leather structure, glycosaminoglycans are linear carbohydrates with high molecular weight, with hyaluronic acid as the main glucosamine, the others being chondroitin and dermatan sulfate. According to Valeika et al. (2009) [7], dermatan sulfate is partially removed during the liming-unhairing process, with 50 to 60% of it being eliminated in this process.

Proteoglycans are extracellular proteins linked to glycosaminoglycans. The most important of these proteoglycans is decorin, which consists of a single chain of dermatan sulfate linked to a polypeptide chain. According to Ramos and Liu (2010) [8], the efficient removal of proteoglycans from the hide is important for the leather quality, promoting softness and flexibility. On the other hand, hydroxyproline is an important component of the collagen, being practically absent in other leather proteins. For this reason, the content of hydroxyproline has been used as an indicator to determine the content of collagen in hides.

So far, the most studied proteases used for hide unhairing are from the keratinase family [9-12]. Microorganisms that produce proteases can be isolated from several environmental sources [9-16]. After screening, the optimizations of cultivation conditions and media formulations for enzyme production are essential steps in order to improve productivity and cost reductions, at the same time minimizing the amount of unsuitable components at the end of cultivation [17]. The use of Plackett-Burmann (PB) design allows for the screening of main factors from a large number of process variables, quite useful in preliminary studies to select variables that can be used or eliminated in further optimization processes. In addition, central composite design (CCD) and the response surface methodology (RSM) are efficient strategic experimental tools by which the optimal conditions of a multivariable system may be determined [18].

In a previous work, five commercial enzymes were characterized for their activities over azocasein, keratin azure, and azocoll, as well as for their unhairing properties [19]. Since the prospect for new potentially commercial enzymes is always interesting, in the present work is described the isolation and selection of microorganisms showing specific proteolytic activities and the optimization of medium composition for enzyme production that could be applied to leather unhairing. The unhairing and the inter-fibrillary removal capabilities of these enzymatic preparations were then evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and by the determination of proteoglycan, glycosaminoglycans, and hydroxyproline.

4.2 Experimental

4.2.1 Bacteria isolation

The screening of new microorganisms to be applied in the unhairing of leather was carried out by sampling the sludge of a local tannery (Kern-Mattes, Portão, RS, Brazil). Samples were directly plated on to Luria-Bertani agar plates with 1% (w/v) skimmed milk

after appropriate dilutions with 0.9 % sterile saline solution [16]. Plates were incubated for 48 h at 37°C, and the proteolytic activities were detected by the formation of translucent halos around the colonies, which were selected and isolated for more detailed studies.

For the quantitative estimation of extracellular protease activity by the selected bacteria, single colonies were picked-up and were grown in medium (M), containing (in g/l): K₂HPO₄, 7; KH₂PO₄, 3; MgSO₄, 0.1; yeast extract, 5; soybean meal, 10, [16]. Growth conditions were 37°C, pH 7 and 80 rpm of agitation in a rotatory shaker.

4.2.2 Bacterial strain identification

Microorganisms were identified on the basis of the 16S rRNA gene sequencing. Sequencing was made using an ABI-PRISM 3100 with Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing RR-100 reagent (Applied Biosystems).

4.2.3 Inocula preparation

For enzyme production, single colonies of bacteria from plates were inoculated into 100 ml of medium (M) in Erlenmeyer flasks (250 ml) and incubated at 37°C in a rotatory shaker at 80 rpm. After reaching an optical density (OD, 600 nm) of 1.0, an aliquot of these cultures were inoculated into production flasks corresponding to 10% (v/v) of the final volume.

4.2.4 Proteolytic assays

The proteolytic activities of microbial cultures were specifically investigated for their action over azocasein, keratin azure, and azocoll. The methodology of proteolytic activity over azocasein was based on Giongo et al. (2007) [19]. The cultivation broth was centrifuged at 10,000 g for 10 min and the supernatant was used for the enzymatic assay. The reaction mixture contained 100 µl of substrate (azocasein 10 mg/ml), 100 µl of buffer and 100 µl of supernatant with the enzyme. Samples were incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was stopped using 500 µl of 10% TCA (trichloroacetic acid). After centrifugation at 10,000 g for 5 min, 800 µl of the supernatant were added to 200 µl of 1.8N NaOH and the absorbance was determined at 420 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 420 nm for 30 min at 37°C. A control was prepared adding buffer and substrate solution to TCA. Enzymatic activities over keratin and collagen were determined using keratin azure and azocoll as substrates, respectively. The methodology was adapted from Adigüzel et al. (2009) [20] and Ionata et al. (2008) [10]. Both keratinolytic and collagenolytic activities were determined by incubating 500 µl of the enzymatic supernatant with 4 mg of either keratin azure or azocoll and 500 µl of buffer. The reaction mixture was incubated at 55°C for 30 min under agitation. After centrifugation at 10,000 g for 5 min, the absorbance was measured at 595 nm. One unit of enzyme activity was the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 595 nm for 30 min at 55°C. A control was prepared adding enzymatic solution and buffer, without substrate.

4.2.5 Identification of significant factors for enzyme activity using the Plackett-Burman design

After selecting the halo-forming colonies, the optimization of cultivation conditions was carried out following three incremental steps. The first step for the selection of significant variables for proteases production, several carbon sources (glucose, maltose, and glycerol), nitrogen sources (yeast extract, peptone, and soybean meal), and inorganic salts (magnesium sulfate, calcium chloride, and heptahydrate ferrous sulfate) were tested using the Plackett-Burmann design approach as it is presented in Tables 4.1 and 4.2. Three central points were added in order to test the reproducibility of the experiments.

4.2.6 Optimization of cultivation medium and conditions using the Central Composite Design

The next step for the formulation of the culture medium was to optimize the levels of significant variables for proteases production. For this purpose, the central composite design (CCD) and the response surface methodology (RSM) were carried out, with peptone, soybean meal, and yeast extract as the significant variables, each assessed at five levels, as shown in Table 4.3. The quadratic equation for the variables was expressed as follows:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

Where Y is the response variable, b_0 the constant, b_i the coefficient of the linear effect, b_{ii} the coefficient for the quadratic effect, b_{ij} the coefficient for the interaction effect. The above quadratic equation was used to plot the surfaces for the variables.

After the optimization of medium composition, the effects of pH and temperature were evaluated and optimized by a 2^2 factorial design. The variables are presented in Table 4.4, with three central points.

For all experimental designs, Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was used for regression and graphical analysis of data. The significances of the regression coefficients were determined by the Student's t-test; the second-order model equation was determined by the Fischer's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R^2 .

4.2.7 Enzymatic characterization of extracts

The enzyme extracts obtained from optimized cultivations were characterized for their best pH, temperature, and thermal stability. The activities were evaluated in sodium phosphate 0.1M (pH 6 to 8), or in sodium bicarbonate 0.1M (pH 9 to 13) buffers, at 37°C. The effects of temperature on enzymatic activities were tested between 28 and 75°C, with the pH fixed at its best previously determined value. The thermal stability of the enzymes were determined at their optimal pH, with enzymatic solutions being exposed to temperatures of 37, 45, and 55°C for 15, 30, 60, and 120 min. The residual enzymatic activities were determined as described above (at 37°C) using azocasein as substrate. The effects of some chemicals on the activities of enzymes were tested using EDTA, 5 mM; surfactant (Eusapon S, BASF), 0.1% (w/v); fatty alcohols (Busperse 7769, Buckman Laboratories), 0.1% (v/v); salts (calcium hydroxide, 0.5

and 1% w/v, sodium carbonate, 0.3% w/v); and sulfides, 1% (w/v); which were chosen because they are normally used during the leather production process. Enzymes were pre-incubated for 15 min at room temperature with the tested chemicals. Again, the residual enzymatic activities were determined as described above (at 37°C) using azocasein as substrate.

4.2.8 Measuring the unhairing activity

The unhairing process was devised as a simple and fast method in order to verify whether the proteases of *B. subtilis* BLBc 11 were suitable for this process. Pieces of bovine skins weighing approximately 40 g were immersed into 80 ml of crude enzyme extract obtained from 48 h cultivations, standardized to have a proteolytic activity of 115 U/ml. The hide samples were incubated for 6, 12, and 18 h at room temperature and compared with a control (treated just with water) and with a piece of hide submitted to the conventional chemical process. The tests were conducted in a laboratory drum (cylindrical rotating reactor, used for hide and leather processing), at 24 rpm. The hides were microscopically evaluated and the inter-fibrillary proteins proteoglycan and glycosaminoglycans released into the bath were analyzed following a protocol described by Madhan et al. (2010) [21]. The content of hydroxyproline was also determined using a method developed at the FILK Institute (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Germany, 2009, unpublished work).

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Isolation and identification of enzyme producing microorganisms

Of thousands of colonies spread onto plates, only 10 colonies were able to form clear halos indicating proteolytic activities. These colonies were isolated and numbered. According to the 16S rRNA gene sequencing analysis, all isolated colonies were of the genus *Bacillus*, showing greater than 98% of genetic identity. The isolate BLBc 11 was selected for further studies because its activity over azocoll was the lowest among the 10 isolates, suggesting that it would present a lower effect on collagen, the main leather protein that should be preserved. This isolate presented activities of 115 U/ml, 9.2 U/ml, and 61.3 U/ml, on azocasein, keratin azure, and azocoll, respectively, and was genetically identified as a *Bacillus subtilis* strain.

4.3.2 Selection of significant variables using the Plackett-Burmann design

Nine variables were analyzed regarding their effects on the proteolytic activities of *B. subtilis* BLBc 11 using the Plackett-Burmann design, with their responses shown in Table 4.1 and the statistical analysis in Table 4.2.

Table 4.1: Experiment design used in the Plackett-Burmann and the corresponding experimental responses

Run order	Codified values															Real values									Y (Enzymatic activity, U/ml)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	10.00	4.00	2.50	10.00	1.00	0.10	2.00	10.00	1.00	105.07
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	10.00	8.00	2.50	10.00	0.10	1.00	2.00	2.00	1.00	145.30
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	10.00	8.00	7.50	10.00	0.10	0.10	10.00	2.00	0.10	76.53
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	10.00	8.00	7.50	30.00	0.10	0.10	2.00	10.00	0.10	122.60
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	2.00	8.00	7.50	30.00	1.00	0.10	2.00	2.00	1.00	57.73
6	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	10.00	8.00	7.50	30.00	1.00	1.00	2.00	2.00	0.10	70.90
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	2.00	8.00	2.50	30.00	1.00	1.00	10.00	2.00	0.10	67.30
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	10.00	4.00	7.50	10.00	1.00	1.00	10.00	10.00	0.10	55.50
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	10.00	8.00	2.50	30.00	0.10	1.00	10.00	10.00	1.00	40.70
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	2.00	8.00	7.50	10.00	1.00	0.10	10.00	10.00	1.00	38.60
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	2.00	4.00	7.50	30.00	0.10	1.00	2.00	10.00	1.00	72.35
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	10.00	4.00	2.50	30.00	1.00	0.10	10.00	2.00	1.00	88.47
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	2.00	8.00	2.50	10.00	1.00	1.00	2.00	10.00	0.10	183.30
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	2.00	4.00	7.50	10.00	0.10	1.00	10.00	2.00	1.00	77.97
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	2.00	4.00	2.50	30.00	0.10	0.10	10.00	10.00	0.10	35.33
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.00	4.00	2.50	10.00	0.10	0.10	2.00	2.00	0.10	184.10
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.00	6.00	5.00	20.00	0.55	0.55	6.00	6.00	0.55	46.80
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.00	6.00	5.00	20.00	0.55	0.55	6.00	6.00	0.55	40.43
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.00	6.00	5.00	20.00	0.55	0.55	6.00	6.00	0.55	37.15

X₁ – glucose; X₂ – maltose; X₃ – peptone; X₄ – soybean meal; X₅ – magnesium sulfate; X₆ – calcium chloride; X₇ – yeast extract; X₈ – glycerol; X₉ – heptahydrate ferrous sulfate

Variables with $P < 0.10$ were considered to have a significant effect on the response and were selected for further optimization studies. Yeast extract, with $P = 0.0118$, was the most significant factor, followed by soybean meal (0.0627) and peptone (0.0907).

Table 4.2: Effect estimates for enzymatic activity from the result of PB design for *B. subtilis* BLBc 11

Variables	Parameters	Efeccts	P-Value
X ₁	Glucose	-1.45	0.9385
X ₂	Maltose	5.30	0.7788
X ₃	Peptone*	-34.67	0.0907
X ₄	Soybean meal*	-38.87	0.0627
X ₅	Magnesium sulfate	-11.00	0.5627
X ₆	Calcium chloride	0.61	0.9741
X ₇	Yeast extract*	-57.62	0.0118
X ₈	Glycerol	-14.36	0.4531
X ₉	Heptahydrate ferrous sulfate	-21.17	0.2772

*Statistically significant at 90% confidence level

4.3.3 Optimization of medium composition and culture conditions of *B. subtilis* BLBc 11 cultivation

Central composite design (CCD) was used to optimize the concentrations of peptone, soybean meal, and yeast extract for the proteolytic activity of *B. subtilis* BLBc 11 and the design matrix with the corresponding results are presented in Table 4.3. The first and second order soybean meal (X₄) and yeast extract (X₇) coefficients of the model were the significant variables (90% confidence level). ANOVA analysis showed that the model using the first and second order coefficients of these variables (X₃, X₄) was very reliable, with R² of 0.89 and R²_{ajd} of 0.85, meaning that 89% of the total variation is explained by the model. The regression equation coefficients were calculated and the data was fitted to a second-order polynomial equation and the response of protease production (Y) by *B. subtilis* BLBc 11 can be expressed in terms of the following simplified equation (2):

$$Y = -283.77 + 50.54X_4 - 1.97X_4^2 - 75.10X_7 - 14.17X_7^2 \quad (2)$$

Table 4.3: Central composite design for cultivation medium and responses for proteases activity

Run order	Codified values			Real values			Y (Enzymatic activity, U/ml)
	X ₃	X ₄	X ₇	X ₃	X ₄	X ₇	
1	-1	-1	-1	1.5	6	2	19.37
2	-1	-1	1	1.5	6	4	12.60
3	-1	1	-1	1.5	12	2	139.25
4	-1	1	1	1.5	12	4	129.33
5	1	-1	-1	3	6	2	14.50
6	1	-1	1	3	6	4	20.30
7	1	1	-1	3	12	2	125.40
8	1	1	1	3	12	4	117.43
9	-1.68	0	0	1	9	3	126.07
10	1.68	0	0	3.51	9	3	114.77
11	0	-1.68	0	2.25	3.96	3	15.13
12	0	1.68	0	2.25	14.04	3	118.77
13	0	0	-1.68	2.25	9	1.32	111.60
14	0	0	1.68	2.25	9	4.68	42.30
15	0	0	0	2.25	9	3	102.37
16	0	0	0	2.25	9	3	106.90

X₃ – peptone; X₄ – soybean meal; X₇ – yeast extract.

The three-dimensional response surface (Fig. 4.1A) shows the interaction between yeast extract and soybean meal, clearly indicating that highest concentrations of soybean meal (14 g/l, codified level 1.68) and yeast extract between 2 and 3 g/l (codified level 0 and -1) are the best conditions for the enzymatic activity; peptone concentration was fixed at concentration of 1 g/l (the lowest codified level -1.68). The optimized medium composition was then proposed to be as: 1 g/l of peptone, 14 g/l of soybean meal, and 2 g/l of yeast extract.

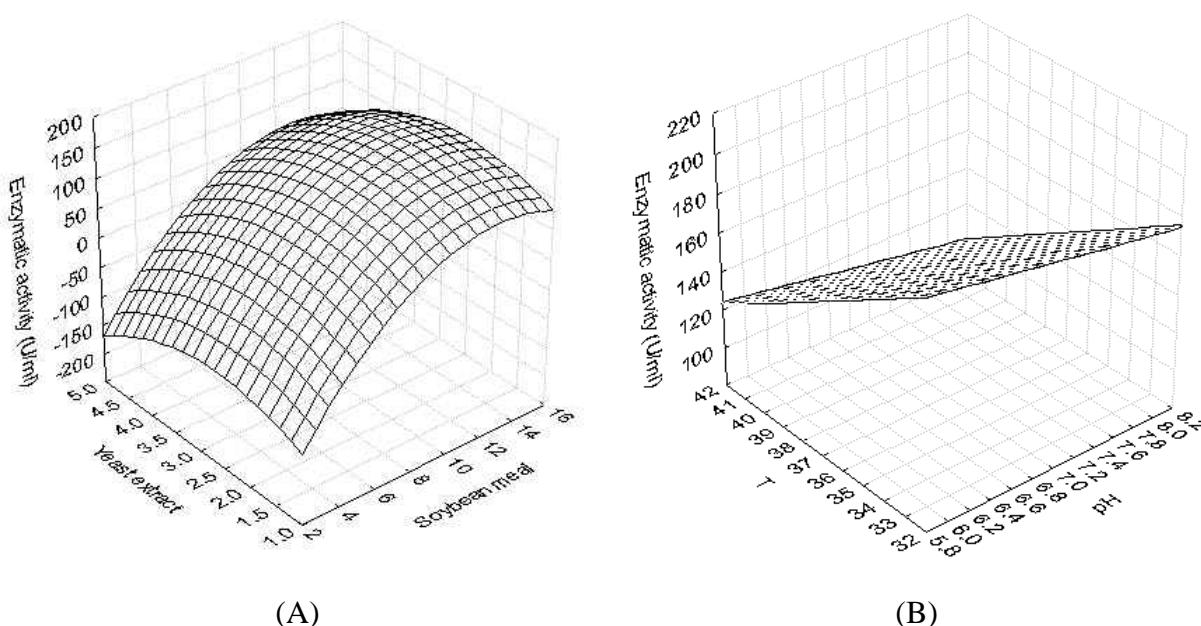


Figure 4.1: Response surface curves of proteolytic activity showing the interaction between (A) yeast extract and soybean meal after 48 h of incubation; peptone concentration was fixed as 1 g/l; (B) pH and temperature after 48 h of incubation.

The effects of pH and temperature were evaluated using the previously optimized cultivation medium, and results are presented in Table 4.4. The analysis of their effects on the proteolytic activity of *B. subtilis* BLBc 11 indicated that both variables were significant (90% confidence level), the model being very reliable with a R^2 of 0.95. The equation that describe protease production can be expressed according Equation (3):

$$Y = 491 - 9.66X_{10} - 7.44X_{11} \quad (3)$$

Table 4.4: 2^2 factorial design for pH and T and responses for proteases activity

Run order	Codified values		Real values		Y (Enzymatic activity, U/ml)
	pH (X_{10})	T ($^{\circ}$ C) (X_{11})	X_{10}	X_{11}	
1	-1	-1	6	33	180.80
2	1	-1	8	33	169.83
3	-1	1	6	41	129.63
4	1	1	8	41	101.97
5	0	0	7	37	155.43
6	0	0	7	37	152.82
7	0	0	7	37	153.00

Temperature was adjusted to 33° C and the pH to 7.00. Figure 4.1B shows the response surface for pH and temperature. The validation of the statistical model was carried out as independent cultures were run using the optimal conditions (medium composition, pH, and temperature), producing an activity of 153.4 U/ml (mean of duplicates) after 48 h of cultivation, which is close to the predicted value of 170 U/ml (Figure 4.2), and representing an increase of approximately 30% on the proteolytic activity when compared to non-optimized cultures.

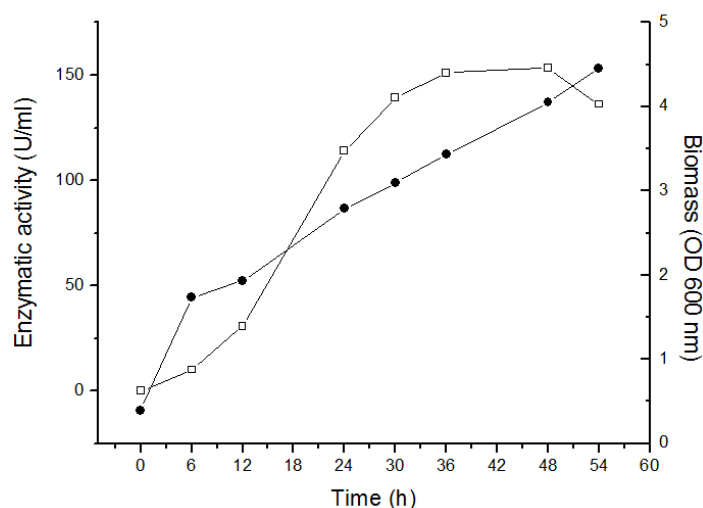


Figure 4.2: Validation of the statistical model and regression equation. Enzymatic activity ($-\square-$) and cell growth ($-\bullet-$).

4.3.4 Enzymatic extract characterization

The effects of pH and temperature on the enzymatic activity are shown in Figures 4.3A and 4.3B, respectively. Proteolytic activities are plateaued from pH 6.0 to 10, while maximal activities are around 55°C; Although activities at 28°C were only 55% of the maximal, they were still satisfactory from the point of view of practical work, since the application of enzymes in the stages of leather production generally occurs at temperatures between 25 to 28°C.

The thermal stability of the proteolytic extract of *B. subtilis* BLBc 11 is presented in Figure 4.3C. The enzymatic activities were stable at 37 and 45°C, maintaining about 80% of its initial activity after 120 minutes. Gessesse et al. (2003) [22] reported that a proteolytic enzyme from *B. pseudofornis* sp. kept around 80% of its activity at 55°C, whilst being completely inactivated at 65°C after 20 min of incubation. Ogino et al. (2008) [23] evaluated the thermal stability of a proteolytic preparation from a *Bacillus* sp. and found that the enzyme was stable at 30 and 40°C, kept about 60% of the activity at 50°C, but was completely inactivated above 60°C after only 10 min of incubation.

The presence of salts and other chemicals used in industrial solutions for hide unhairing may interfere with enzyme activity and therefore must be tested in order to prevent process losses. In Table 4.5 are presented the results of the effects of inhibitors and other chemical products on the enzymatic activity. EDTA, sodium sulfide, and the surfactant caused partial reductions of enzymatic activities, suggesting the presence of metalloproteases and other proteases that are not inhibited. Fatty alcohol, sodium carbonate, and calcium hydroxide caused no significant variations on enzymes activities. Other authors determined the residual activities of bacterial enzymes after incubation with organic solvents showing remaining activities in between 56 and 70% [11] and reported that a keratinase from *Streptomyces* sp. retains only 27% of its original activity after incubation with EDTA [15].

Table 4.5: Effect of some inhibitors and chemical products on the enzymatic activity

Chemical	Concentration	Residual activity (%)*
EDTA	0.15% (w/v)	69.39 ± 3.21
Fatty alcohol (Busperse 7769)	0.1% (v/v)	97.45 ± 3.84
Sodium carbonate	0.3% (w/v)	88.96 ± 0.90
Calcium hydroxide	0.5% (w/v)	101.96 ± 2.05
	1% (w/v)	98.84 ± 4.88
Surfactant (Eusapon S)	0.1% (w/v)	77.09 ± 12.23
Sodium sulfide	1% (w/v)	64.13 ± 1.15

* Values were means ± standard deviation for three samples of the experiment.

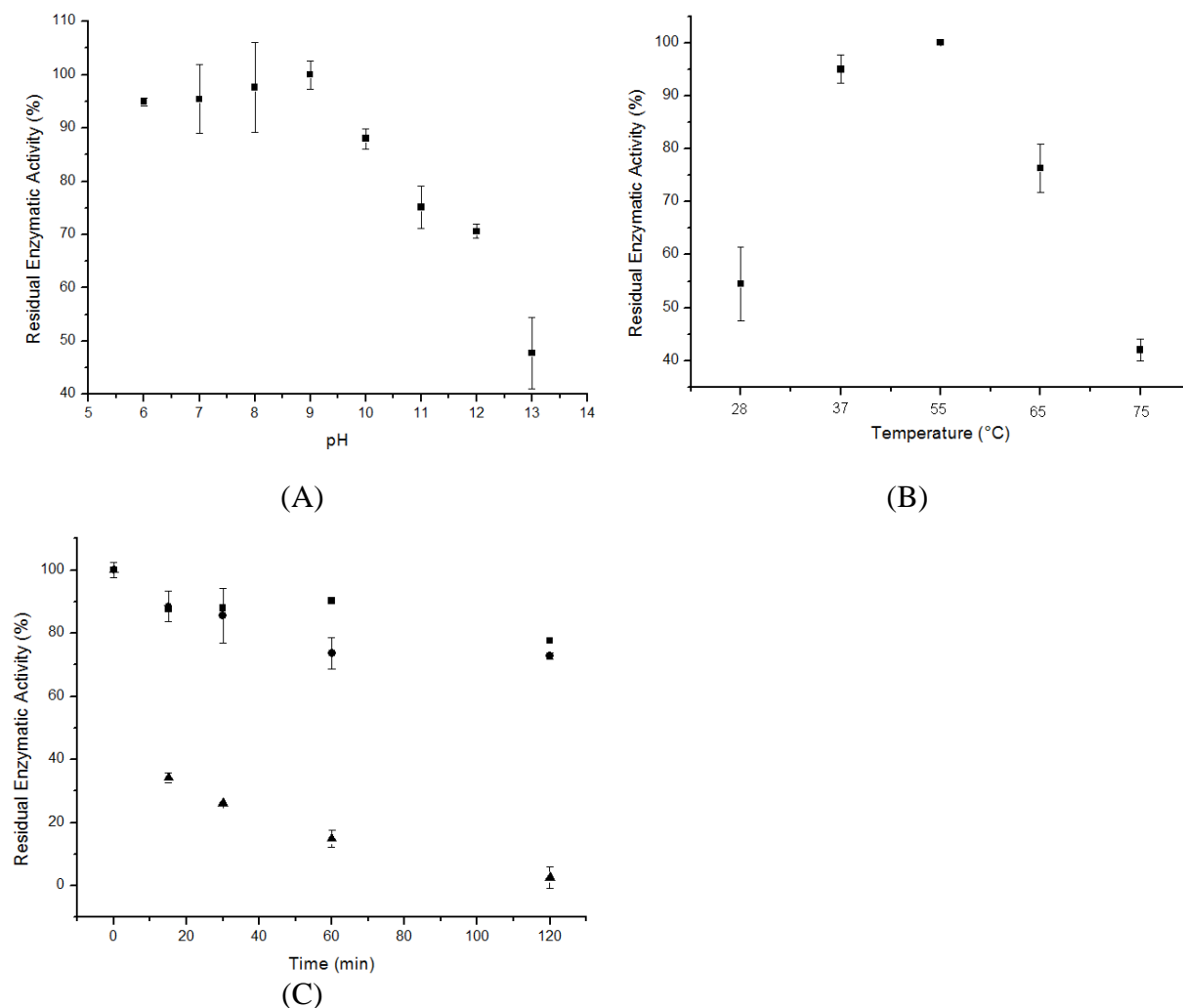


Figure 4.3: Effects of pH (A) and temperature (B) on the enzymatic activity; (C) thermal stabilities of the proteolytic enzymatic preparation of *B. subtilis* BLBc 11 at 37°C (—■—), 45°C (—●—), and 55°C (—▲—). Azocasein was used as substrate.

4.3.5 Hide unhairing

The enzymatic crude extracts from cultures of *B. subtilis* BLBc 11 were applied on pieces of hide to test their capability for hide unhairing and results are presented in Figure 4.4, showing significant differences between enzymatic treated hides and the control. Hides treated with the enzymatic extract show large areas without hair as can be observed in Figure 4.4 B, compared against the control (Figure 4.4A). Another evidence of enzyme action was the clean appearance of hide, caused by the removal of epidermis and pigments as a consequence of enzymatic action.

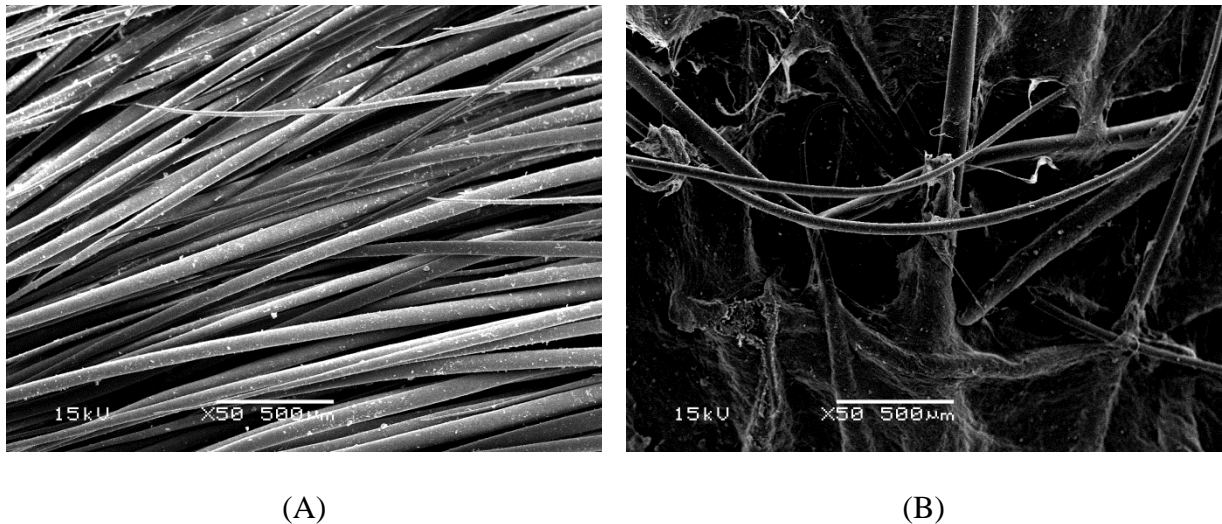


Figure 4.4: SEM of control samples without enzyme (A), and of hides after application of crude enzymatic extract of *B. subtilis* BLBc 11 (B); (50x magnification).

Several theories have been proposed in order to explain the mechanism of enzymatic unhairing. Galarza et al. (2009) [24] proposed that the proteolytic unhairing process causes the digestion of the cells in the Malpighi's layer of the basal cells of the hair bulb, also degrading the medulla, but not the cortex. Therefore, it would be a partial or total destruction of the tissues sustaining the hairs, the components of the epidermis surrounding the follicle, and the root sheath and this process facilitates the unhairing. According to Wang et al. (2009) [1], non-collagenous proteolytic enzymes will specifically hydrolyze protein from the basement membrane and surrounding tissue leading to unhairing, while collagenolytic proteases have little contribution to depilation. Gupta and Ramnani (2006) [25] proposed that proteases with mild collagenolytic and elastolytic activities might be particularly suitable to enhance unhairing without harming the tensile strength of leather.

The analysis of inter-fibrillary proteins (proteoglycans and glycosaminoglycans), and hydroxyproline that were liberated into the bath solution of hides incubation with either enzyme or chemicals are presented in Table 4.6. This analysis is a simple and efficient way to compare both processes, allowing evaluating the capability of the enzyme to remove the inter-fibrillary proteins and any attack on collagen proteins.

Table 4.6: Liberated inter-fibrillary proteins and hydroxyproline in the bath after enzymatic and conventional (chemical) unhairing processes

Process/ Incubation time	Amount of protein and amino acid liberated		
	mg glycosaminoglycans/g of hide	mg proteoglycans/g of hide	μg hydroxyproline/g of hide
Chemical (10h)	0.0006	0.0077	0
Enzymatic (6h)	0	0.0396	0.0091
Enzymatic (12h)	0.0019	0.0630	0.0177
Enzymatic (18h)	0.0029	0.0668	0.0194

It was observed that, for the conventional chemical process, there was no liberation of hydroxyproline into the bath, meaning that this process does not attack the collagen. As expected, there was a small amount of hydroxyproline liberated into the bath when the enzymatic process was used because the enzymatic preparation presents activity over azocoll. From the observations made from the SEM analysis and the visual inspection, there was no apparent damage to the leather grain (external hide surface), although this effect should be more thoroughly observed by optical microscopy. It was also observed extensive removal of inter-fibrillary proteins for the enzymatic process, which is very important since this effect is exactly the aim of the initial steps of leather processing.

Madhan et al. (2010) [21], quantified the inter-fibrillary material released in the liming and bathing processes, both conventional and enzymatic, and found that 2.01 mg of proteoglycans/g of raw wet salted weight hide were released after 24 h of incubation with chemicals, while in the enzymatic process 3.72 mg of proteoglycans/g of raw wet salted weight hides were released after 6 hours of incubation.

4.4 Conclusions

The *B. subtilis* BLBc 11 strain demonstrated to be an excellent producer of proteolytic enzymes with hide unhairing capabilities. Planning with P-B and CCD experimental designs were successful to define optimal medium composition, pH, and temperature of cultures of *B. subtilis* BLBc 11 to increase the proteolytic activity and predicting conditions to be used in scaling-up this bioprocess, reducing overall costs of proteases production for the leather industry. The application of the crude proteolytic extract of cultures directly over hides was also effective for the removal of inter-fibrillary proteins, granting further studies for its applications.

Acknowledgements

The authors wish to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), both Brazilian agencies for scientific research and development, for their financial support of this study.

4.5 References

1. Kage, S.; Ikeda, H.; Ikeda, N.; Tsujita, A.; Kudo, K., *Legal Medicine*, **2004**, 6, 182.
2. Wang, R.; Min, C.; Haiming, C.; Li, Z., *J. Soc. Leather Technol. Chem.* **2009**, 93, 51.
3. Davies, R. M., *J. Soc. Leather Technol. Chem.* **1997**, 81, 310.
4. Lambert, T. W., Goodwin, V. M., Stefani D., Strosher L., *Science of the Total Environment*, **2006**, 367, 1.
5. Skrajny B., Reiffensteinb R. J., Sainsbury R. S., Roth S. H., *Toxicology Letters* **1996**, 84, 43.

6. Zhi-Hua, S.; Qing L. S.; Jian-Wei, L.; Ollis, D. L., *J. Soc. Leather Technol. Chem*, **2009**, *93*, 229.
7. Valeika, V.; Beleska, K.; Valeikiene, V.; Kolodzeiskis V., *J. of Clean Prod*, **2009**, *17*, 214.
8. Ramos, M. L. A.; Liu, C.K., *J. of the American Leather Chemists Association*, **2010**, *105*, 222.
9. De Toni, C.H.; Richter, M.F.; Chagas, J.R.; Henriques, J.A.P.; Termignoni, C., *Can. J. Microbiol*, **2002**, *48*, 342.
10. Ionata, E.; Canganella, F.; Bianconi, G.; Benno, Y.; Sakamoto, M.; Capasso, A.; Rossi, M.; La Cara, F., *Microbiological Research*, **2008**, *163*, 105.
11. Riffel, A.; Lucas, F.; Heeb, P.; Brandelli, A., *Arch. Microbiol.*, **2003**, *179*, 258.
12. Ya-Peng, C.; Fu-Hong, X.; Jing-Hua, L.; Shi-Jun, Q., *J. of Environmental Sciences*, **2007**, *19*, 1125.
13. Macedo, A.J.; Silva, W.O.B.; Gava, R.; Driemeier, D.; Henriques, J.A.P.; Termignoni, C., *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, *Jan. 2005*, 594.
14. Farag, A.M.; Hassan, M.A., *Enzyne and Microbial. Technol*, **2004**, *34*, 85.
15. Tatineni, R.; Doddapaneni, K.K.; Potumarthi, R.C.; Vellanki, R.N.; Kandathil, M.T.; Kolli, N.; Mangamoori, L.N., *Bioresource Technology*, **2008**, *99*, 1596.
16. Pillai, P.; Archana, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *78*, 643.
17. Kumar, C.G.; Takagi, H., *Biotechnol. Advances*, **1999**, *17*, 561.
18. Reddy, L.V.A.; Wee, Y.J.; Yun, J.S.; Ryu, H.W., *Bioresource Technol.*, **2008**, *99*, 2242.
19. Giongo, J.L.; Lucas, F.S.; Casarin, F.; Heeb, P.; Brandelli, A., *World J Microbiol. Biotechnol*, **2007**, *23*, 375.
20. Adigüzel, A.C.; Bitlisli, B.O.; Yasa, I.; Eriksen, N.T., *J. Appl. Microbiol.*, **2009**, *107*, 226.
21. Madhan, B.; Dineshkumar, M.; Rao, J.R.; Nair, B.U., *J. of the American Leather Chemists Association*, **2010**, *105*, 145.
22. Gessesse, A.; Kaul, R.H.; Gashe, B.A.; Mattiasson, B., *Enzymes and Microbial Techn.*, **2003**, *32*, 519.
23. Ogino, H.; Otsubo, T.; Ishikawa H., *Biochemical Engineerring Journal*, **2008**, *38*, 234.
24. Galarza, B.C.; Cavello, I.; Greco, C.A.; Hours, R.; Schuldt, M.M.; Cantera, C.S., *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **2009**, *94*, 26.

25. Gupta, R.; Ramnani, P., *Appl. Microbiol Biotechnol*, **2006**, 70, 21.

Capítulo 5

Environmentally friendly leather unhairing: enzymatic leather processing for the replacement of sodium sulfide and deliming

Artigo enviado para publicação no periódico: *Journal of Cleaner Production*, em 13/12/2011.

Environmentally friendly leather unhairing: enzymatic leather processing for the replacement of sodium sulfide and deliming

Aline Dettmer^{a,*}, Élita Cavalli^a, Marco A. Z. Ayub^{b,*}, Mariliz Gutterres^{a,*}

^aChemical Engineering Department, Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), ^bBiotechnology & Biochemical Engineering Laboratory, (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Luiz Englert str., s/n°, 90.040-040, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding authors. Tel.: +55 51 3308 3954; fax: +55 51 3308 3277.

E-mail addresses: alinedet@enq.ufrgs.br (A. Dettmer); mariliz@enq.ufrgs.br (M. Gutterres); mazayub@ufrgs.br (M. A. Z. Ayub)

ABSTRACT

In this work is described the use of an enzyme preparation produced by a new strain of *Bacillus subtilis* for leather unhairing aiming at completely replace the chemical process, which uses toxic sulfides and lime. The whole process was designed to be fast and cheap, by applying the crude enzymatic extracts of *B. subtilis* BLBc 11 cultures on the hides, with good results obtained in just 6 h of process. The treated hides were evaluated for their quality by optical microscopy and analyses of inter-fibrillary proteins (proteoglycans and glycosaminoglycans). Undesired damage to the leather grain was evaluated by the determination of free hydroxyproline in the process liquor. Furthermore, the environmental impact of chemical and enzymatic treatments were compared, and the processes were evaluated by analyzing the COD, BOD, total nitrogen, and sulfides in the residual wastewater, as well as the properties of the finished leather. COD reductions were of 42 %, 100 %, and 82 % compared with the chemical process for the unhairing, deliming, and bating steps, respectively. The enzymatic unhairing process showed excellent results, with time reduction for unhairing of more than 50 %, without the need for deliming, suggesting that this enzymatic preparation could be used to replace the chemical process.

Keywords: enzymes; inter-fibrillary proteins; unhairing; hide.

5.1 Introduction

In the last decades, there are growing concerns on the negative environmental impacts of industrial development, resulting in many technological changes and influencing the actions of public and private institutions. The adoption of new, cleaner technologies is not instantaneous, while the more economically attractive, cost effective solutions, being preferred by a larger number of companies, even if they present some degree of environmental damage. Expensive and complex technologies tend to diffuse very slowly¹.

Tanneries are among the oldest industries, transforming hides into leather through a cascade of several unit operations. To date, the unhairing steps use sulfides and a large amount of chemical products. According to Jian et al. 2011², the conventional lime-sulfide process leads to the destruction of the hair, causing high emissions of COD, BOD and TSS loads in the effluent of these industries. Moreover, the use of lime in the unhairing process

requires its removal, usually by the addition of ammonium salts, which represents high amounts of nitrogen in the stream of wastewater, one of the main contaminants of liquid effluents³.

Another concern in tanneries is the use of chromium⁴ and the possibility of its conversion to toxic forms. Special attention is required for the disposal of solid wastes because of the large amounts that are generated and legal restrictions⁵. However, chromium remains as the main tanning agent, especially due to the characteristics it confers to leather⁶.

Many attempts are being applied to reduce the environmental impact of tanneries, either by the use of environmentally-friendly processes, or through the reduction and reuse of wastewaters and solid wastes⁷⁻¹⁶.

Among the new technologies, the use of proteolytic enzymes is being experimentally tried for the unhairing process. Despite being consolidated for other industrial applications, the use of enzymes in the leather industry is not common¹⁷. An investigation of tanneries operating in the south Brazil, one important region for this economic activity, shows that only 22 % use a safer environmental unhairing process, substituting sulfides for other chemicals such as amines, while 78 % remain using sulfides and none enzymes¹⁶.

In this work, an enzymatic unhairing process is proposed in substitution to the conventional lime and sodium sulfide process. The quality of the leather obtained was evaluated by optical microscopy of the hide and a thorough analysis of the process wastewater was carried out in order to determine the removal of inter-fibrillary proteins (proteoglycan and glycosoaminoglycans) and enzymatic attack on the hide collagen fibrous structure by the release of hydroxyproline. Glycosoaminoglycans are high molecular weight linear carbohydrates, the commonest being the hyaluronic acid, dermatan and chondroitin sulfates. Dermatan sulfate is partially removed during lime and unhairing process¹⁸ and it is related with a structural fiber opening; its efficient removal facilitates the diffusion of chemical products in the subsequent process steps, also being responsible for producing softer leather. However, an excessive removal leads to weak and loose leathers. Proteoglycans are extracellular proteins bound to glycosoaminoglycans. The main proteoglycan is decorin, consisting of dermatan sulfate bound to a polypeptide chain. Efficient removal of proteoglycan is important for leather quality, promoting softness and flexibility¹⁹.

Enzymatic unhairing hides were also tanned using chromium and a chrome free formulation, in order to compare the unhairing system influence on final leather quality and the possibility of substituting chromium.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Enzyme production

The enzymatic preparations used in this work were obtained from cultures of *B. subtilis* BLBc 11, a bacterium isolated from a local tannery sludge and that has been described in details in a previous work²⁰. Enzymes used for the tests were obtained from the cultivation

broth centrifuged at 10 000 g for 15 min and the supernatant was used as the crude extract for the unhairing process.

5.2.2 Determination of enzymatic unhairing time

Samples preparation: Bovine hides were purchased from a local tannery. A mini drum (cylindrical rotating reactor, used for hide and leather processing) fitted at 15 rpm and 25°C was used for determination of the best time process. Bovine hides pieces were soaked using 200 % of its mass fraction of water, 0.3 % mass fraction of sodium carbonate and 0.15 % mass fraction of surfactant Eusapon LDE, during 3 h.

Enzyme preparation application: Eight pieces of hides weighing approximately 200 g were immersed into the crude enzyme extract, standardized to have a proteolytic activity of 200 U/g of hide. The enzymatic activity was determined as described by the authors in a previous study²⁰. The enzymatic treatment run for 12 h and a sample of hide was taken every 90 min, along with a sample of the reaction solution for analysis. Process solution was analyzed for its hydroxyproline content, inter-fibrillary protein, and residual enzymatic activity, according to methods described by Dettmer et al. (2011)²⁰.

The determination of the ideal process time was based on the analysis of the removed inter-fibrillary protein, the released hydroxyproline into the process solution, and the evaluation of the unhairing and quality of leather by image analysis obtained from the hide under optical microscopy.

5.2.3 Scale up and environmental comparison between conventional and enzymatic unhairing processes

For the scaling-up, a hide was divided into four pieces, as shown in Figure 5.1. Pieces I and III were submitted to enzymatic unhairing, while pieces II and IV to the conventional chemical process. The processes steps and chemicals used are presented in Table 5.1.

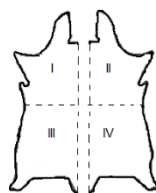


Figure 5.1: Bovine hide splitting for scale-up tests

For the enzymatic unhairing, the soaked hide samples were immersed into the crude enzymatic extract and incubated for 6 h, 25°C, and 15 rpm. For the conventional process, a formulation commonly used in tanneries was used (Table 5.1).

The wastewater of each process was analyzed for the environmental impact, and the levels of COD, BOD, total nitrogen (Kjeldahl Method) and sulfides were determined, following The Brazilian National Standard Methods²¹.

Table 5.1: Chemicals and times for conventional and enzymatic process

Process	Chemical	Amount ** (mass fraction %)		Time (h)	
		C*	E*	C*	E*
Soaking	Water	200	200	-	-
	Surfactant	0.05	0.05	0.67	0.67
	Water	150	150	-	-
	Sodium carbonate	0.25	0.25	-	-
	Surfactant	0.12	0.12	-	-
	Bactericidal	0.10	0.10	6	6
Unhairing and liming	Water	100	-	0.25	-
	Amine	0.40	-	-	-
	Surfactant	0.12	-	-	-
	Sodium sulfide	0.15	-	-	-
	Hydrated lime	0.50	-	0.67	-
	Sodium sulfide	0.45	-	0.67	-
	Hydrated lime	0.30	-	-	-
	Sodium sulfide	0.45	-	1	-
	Hydrated lime	0.30	-	-	-
	Sodium sulfide	0.45	-	2	-
	Water	50	-	-	-
	Hydrated lime	1.15	-	1	-
	Surfactant	0.12	-	-	-
	Hydrated lime	1.15	-	15	-
	Enzymatic crude extract	-	***	-	6
Deliming	Water	100	-	-	-
	Ammonium sulfate	0.40	-	-	-
	Surfactant	0.10	-	0.5	-
	Water	100	-	0.5	-
	Surfactant	0.10	-	-	-
	Ammonium sulfate	1	-	0.25	-
	Dicarboxylic acid (1:5)	1	-	1.5	-
	Surfactant	0.10	-	-	-
	Ammonium sulfate	1	-	0.25	-
	Dicarboxylic acid (1:5)	1	-	1.5	-
Bating	Water	50	50	-	-
	Buzyne 7706	0.02	0.02	0.5	0.5
Pickling	Water	100	100	0.33	0.33
	Water	40	40	-	-
	NaCl	4	4	0.5	0.5
	Formic acid (1:10)	0.30	0.30	0.33	0.33
	Sulfuric acid (1:10)	1.50	1.50	5	5

*C = Conventional unhairing process; E = Enzymatic unhairing process

** Offers calculated on hide weight

*** Quantity of enzymatic crude extract was defined according to the enzymatic unhairing.

5.2.4 Tanning obtained leather quality characteristics

For the evaluation of the influence of unhairing process and fiber opening on tanned leather quality, as well as for the possible substitution of chrome, two different tanning agents were used. The pickling step, which consists in acidifying the hides with a solution of acids (according to Table 5.1), preceded the tanning step. Hide samples I and II were tanned with chromium, while pieces III and IV were tanned using a chrome-free formulation. The chemicals used for each process are listed in Table 5.2. The final leather was evaluated for chromium content²², thermal stability (shrinkage temperature) using an apparatus with hot water and a coupled thermometer, which permits determine the exact temperature where leather fibers retract. Thermal stability was also determined using differential scanning calorimetry (DSC) (SDT Q600 V8.3 Build 101, Japan), while the tensile strength and elongation²³, and the tear strength²⁴ using the Universal Machine of Testing (AME 5 kN, Oswaldo Filizola, Brazil).

Table 5.2: Chemicals and time process for chromium and chromium-free tanning

Process	Chemical	Amount* (mass fraction %)	Time (h)
Chromium tanning	Sodium formate	0.50	
	Fungicide	0.075	
	Basic chromium sulfate	5.30	5
	Magnesium oxide	0.40	5
	Fungicide	0.075	6
Chromium-free tanning	Sellatan CF-NEW (1:3)	2	1
	Sellatan CF-NEW (1:3)	2	14
	Sellatan FL	5	1
	Sodium acetate (1:3)	0.50	1
	Sodium acetate (1:3)	0.50	0.5
	Sodium acetate (1:3)	1	0.5
	Sodium acetate (1:3)	0.50	1
	Acticide WB 420	0.20	
	Borron ST	0.20	0.33

* Offers calculated on hide weight

5.3 Results and discussion

5.3.1 Process time determination

Images obtained for different unhairing times with the enzymatic crude extract application are presented in Figure 5.2. It was possible to evaluate the unhairing process through optical microscopy of the pieces of hide; Figure 5.2A shows the control, pieces of hide that were just soaked, without any enzyme application. After 6 h of enzymatic treatment

(Figure 5.2E), the hide was showing a perfect grain surface, with very few and sparse hairs. The process time obtained in this work is exceptionally good when compared with other literature reports on the use of enzymes, with unhairing procedures spanning from 24 h for cattle hides¹²; 18 h for goat skins²⁵, to 12 h for pigskins². Furthermore, in all these cases the enzymes were used in combination with chemicals. Finally, another important point was the fact that the unhairing in this work occurred without the use of any mechanical force, such as assistance of knives or blades. Above 6 h of reaction, samples started to show some damages to the hides grains (Figure 5.2G).

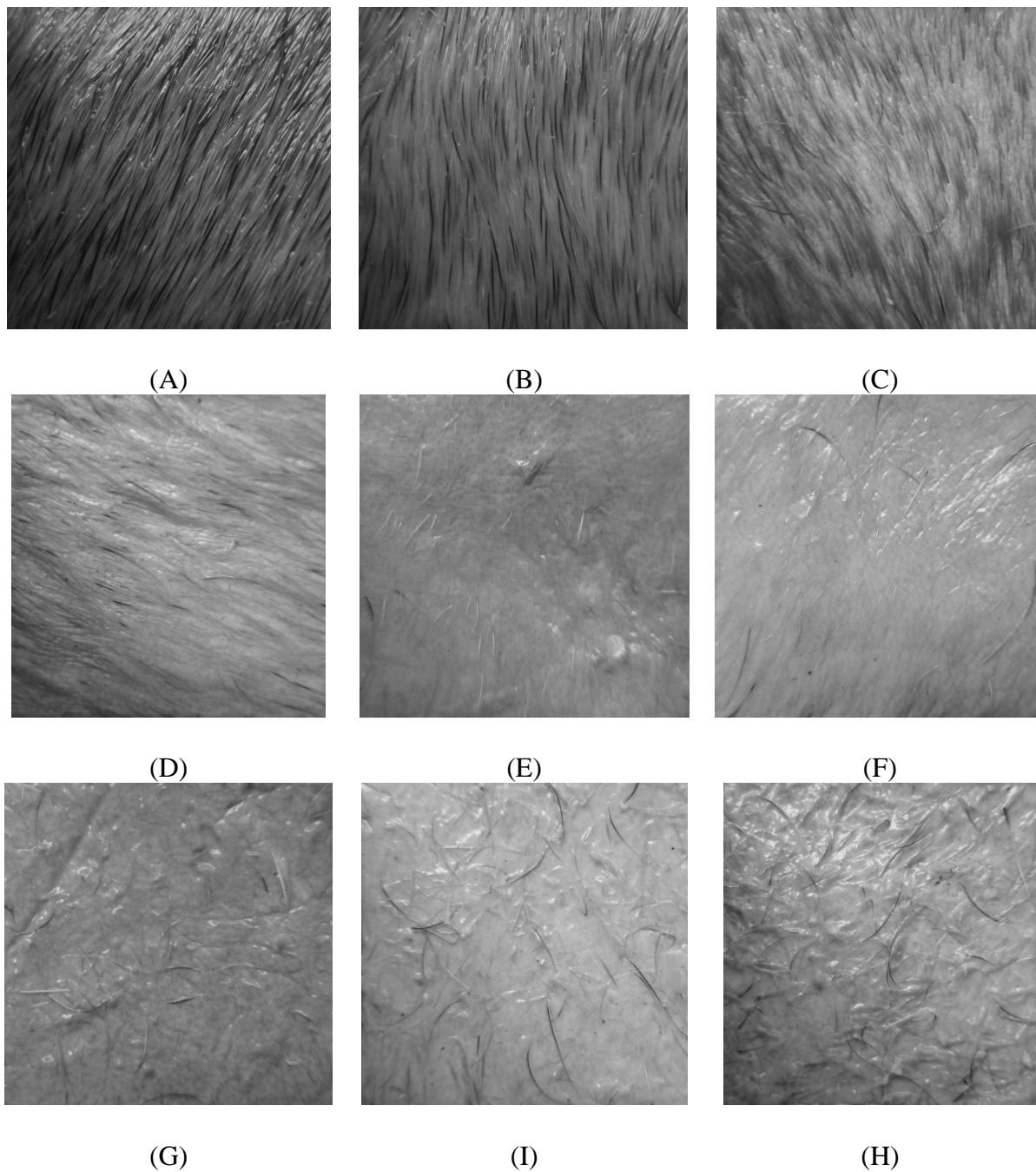


Figure 5.2: Optical microscopy results for different unhairing process times. (A) Control (soaked but not submitted to enzymatic action). Process Times: (B) 1.5 h, (C) 3 h, (D) 4.5 h, (E) 6 h, (F) 7.5 h, (G) 9 h, (H) 10.5 h, (I) 12 h.

Evaluating the results presented in Table 5.3, it is also possible to observe the hide degradation when the process time exceed 9 h, since the amount of hydroxyproline released into the wastewater increased from 8×10^{-4} μg (7.5 h of process) to 2×10^{-3} μg (9 h of process). Table 5.3 also shows that the amount of proteoglycans increased with the time process, as well as the amount of glycosaminoglycans. It is believed that the mechanical action in the drum and the presence of enzymes facilitate the removal of hyaluronic acid (glucosamine). Enzymes contribute to the opening of fibers process when they degrade dermatan sulfate of the protein structure^{19,26,27}. Thus, using constant mechanical action and with high residual enzymatic activity, the increasing of released inter-fibrillary proteins was expected. After 12 h of process, the residual activity of crude enzymatic extract was still very high, with 80 % of its initial proteolytic activity being kept, showing the prospect of enzymatic extract reuse.

Table 5.3: Results for inter-fibrillary proteins, hydroxyproline and residual enzymatic activity at different times of enzymes application

Process time (h)	Proteoglycans (mg/g of hide)	Glicosoaminoglycans (mg/g of hide)	Hydroxyproline ($\mu\text{g/g}$ of hide)	Residual enzymatic activity (%)
1.5	$2.22 \pm 0.32 \times 10^{-4}$	$0.6 \pm 0.22 \times 10^{-4}$	$1.2 \pm 0.63 \times 10^{-4}$	95 ± 0.27
3	$3.33 \pm 0.94 \times 10^{-4}$	$1.0 \pm 0.09 \times 10^{-4}$	0.0 ± 0.00	81 ± 3.10
4.5	$8.13 \pm 1.46 \times 10^{-4}$	$1.3 \pm 0.32 \times 10^{-4}$	$2.9 \pm 0.74 \times 10^{-4}$	85 ± 0.92
6	$11.75 \pm 1.28 \times 10^{-4}$	$1.6 \pm 0.08 \times 10^{-4}$	$4.22 \pm 1.09 \times 10^{-4}$	92 ± 3.10
7.5	$15.48 \pm 3.79 \times 10^{-4}$	$2.2 \pm 0.47 \times 10^{-4}$	$7.8 \pm 1.63 \times 10^{-4}$	87 ± 4.18
9	$21.93 \pm 0.18 \times 10^{-4}$	$3.0 \pm 0.51 \times 10^{-4}$	$20.1 \pm 5.56 \times 10^{-4}$	80 ± 3.20
10.5	$29.12 \pm 3.62 \times 10^{-4}$	$5.7 \pm 0.26 \times 10^{-4}$	$24.6 \pm 9.87 \times 10^{-4}$	77 ± 1.41
12	$42.75 \pm 6.15 \times 10^{-4}$	$10.7 \pm 0.06 \times 10^{-4}$	$73.7 \pm 7.98 \times 10^{-4}$	80 ± 0.79

5.3.2 Scaling up the process and the environmental comparison between conventional and enzymatic unhairing processes

The scaling up of a process and its environmental impact are very important aspects when considering new technologies. The following experiments were set up in order to look at these aspects when comparing the enzymatic and the chemical unhairing processes. Analyses of COD and BOD of the reactional solution wastewater were conducted, and the obtained results are presented in Table 5.4, showing significant reductions in COD and BOD. For COD, the reductions reached 42 %, 100 %, 82 % and 60 % for unhairing, delimiting, bating, and washing steps, respectively. The results for BOD level reduction were similar. According to some authors, the development of technologies without hair destruction, which is possible when enzymatic treatment is used in replacement of sulfides, could help to reduce from 40 to 60 % of COD, BOD, and total solids, and about 50 % of sulfide concentrations from liming effluents^{25,28}.

Meeting the environmental standards required for nitrogen emissions after wastewater treatment still remains a challenge for many tanneries, thus the analysis of nitrogen in each step was also determined. During the unhairing process, there was a small increase in the nitrogen amount of the wastewater, since the crude enzymatic extract is rich in proteins. However, in all other steps, a significant reduction in the levels of nitrogen was observed: 100 % and 58 % for delimiting and bating process, respectively.

Table 5.4: Wastewater analyses for conventional and enzymatic process

Process steps	Nitrogen (g/l)**		BOD (g/l)		COD (g/l)		Reduced levels of COD and BOD (%)	
	C*	E*	C*	E*	C*	E*	BOD	COD
Soaking	0.11±0.196	0.11±0.196	0.50	0.50	3.20	3.20	0.00	0.00
Unhairing	0.29±0.065	0.49±0.025	4.65	2.80	15.50	8.98	39.78	42.11
Washing	0.25±0.006	0.17±0.016	1.25	1.20	4.11	3.96	4.00	3.63
Deliming	0.28±0.099	0.00±0.000	2.38	0.00	12.58	0.00	100	100
Bating	0.40±0.07	0.17±0.037	5.20	0.95	17.20	3.05	81.73	82.29
Washing	0.23±0.085	0.11±0.196	1.15	0.47	3.86	1.54	59.13	60.12

*E – Enzymatic C – Conventional

** Values were means ± standard deviation for three samples analysis. BOD and COD were analyzed in an external lab.

Another very important point in the proposed process are the reduction in process time, no addition of chemical products, especially lime and sulfide, consequently suppressing the deliming step, which needs several chemicals thus contributing to the increase of COD, BOD, and nitrogen levels in the wastewater.

In this work, the amount of sulfides in the unhairing wastewater showed a reduction of 61 % for the enzymatic hide unhairing, as compared to the chemical process. The sulfide present in wastewater effluent of the enzymatic treatment is probably originated from the disulfide bounds present in the enzyme molecule itself²⁹, or possibly from the degradation of keratin and consequent releasing of amino acids such as cystine, which contains sulfides.

5.3.3 Tanning and leather quality characteristics

None of the preceding actions could be worth if the leather quality would not match industrial standards. Therefore, the chromium content on leather for chromium-tanned samples was measured, along with the thermal stability (shrinkage temperature), tensile strength and elongation, and the tear strength of all the samples. The results are presented at Table 5.5. There were no significant differences in the chromium content and shrinkage temperature between the conventional and the enzymatic unhairing processes. The same happened for shrinkage temperature of chromium-free tanned samples. To confirm the shrinkage temperatures obtained when the samples were placed into hot water, DSC analysis were performed and the results are shown in Figure 5.3 for chromium and chromium-free tanned leather, respectively. It is possible to observe that the samples submitted to the same tanning agent presented the same melting (shrinkage) temperature, suggesting that the unhairing process (enzymatic or conventional) did not influence the final leather quality. Comparing the results for both tanning processes, it was expected that chromium tanned leather presented higher melting temperature³⁰, due the crosslinking that the metal form with proteins.

Table 5.5: Comparison of physical and mechanical proprieties, chromium content in leather, and shrinkage temperature of chromium and aldehyde tanned leather

		Conventional Process*		Enzymatic Process*	
		Aldehyde	Chromium	Aldehyde	Chromium
Tensile strength (MPa)	Along	68.68 ± 2.52	78.53 ± 9.95	51.94 ± 5.87	70.10 ± 1.02
	Across	75.54 ± 5.69	75.25 ± 4.49	90.19 ± 7.04	67.52 ± 8.94
Elongation at break (%)	Along	52.63 ± 4.61	42.11 ± 22.32	78.95 ± 27.43	73.68 ± 29.77
	Across	80 ± 15.70	39.47 ± 20.09	65.79 ± 24.68	76.32 ± 26.05
Tear strength (N/mm)	Along	40.49 ± 0.77	35.83 ± 2.76	36.85 ± 1.11	39.72 ± 1.96
	Across	34.95 ± 2.22	35.25 ± 4.03	36.40 ± 5.09	33.75 ± 2.53
% Chrome		-	3.03 ± 0.01	-	3.02 ± 0.04
Shrinkage temperature (°C)**		72 ± 1.00	96 ± 1.41	73 ± 0.72	96 ± 0.71

* Values were means ± standard deviation for three samples analysis.

** Values obtained after immersing samples in hot water

It was also observed that the enzymatic unhairing causes no losses of resistance on the samples, either tanned with chromium or in the chromium-free formulation. Similar results were reported by Saravanabhavan et al. (2003)³¹, who used two commercial enzymes for the unhairing of goat skins and its fiber opening, respectively, and compared the results with the conventional chemical treatment. Their process consisted of 18 h enzymatic action followed by unhairing using a blunt knife. The authors found no significant differences between the tanned skins treated with the two enzymes and the chemical process. Jian et al. (2011)² compared the resistance of pig skins after lime-sulfide unhairing and unhairing using commercial proteases (12 h of process), also concluding that the skins did not present any loss of resistance after the enzymatic treatment.

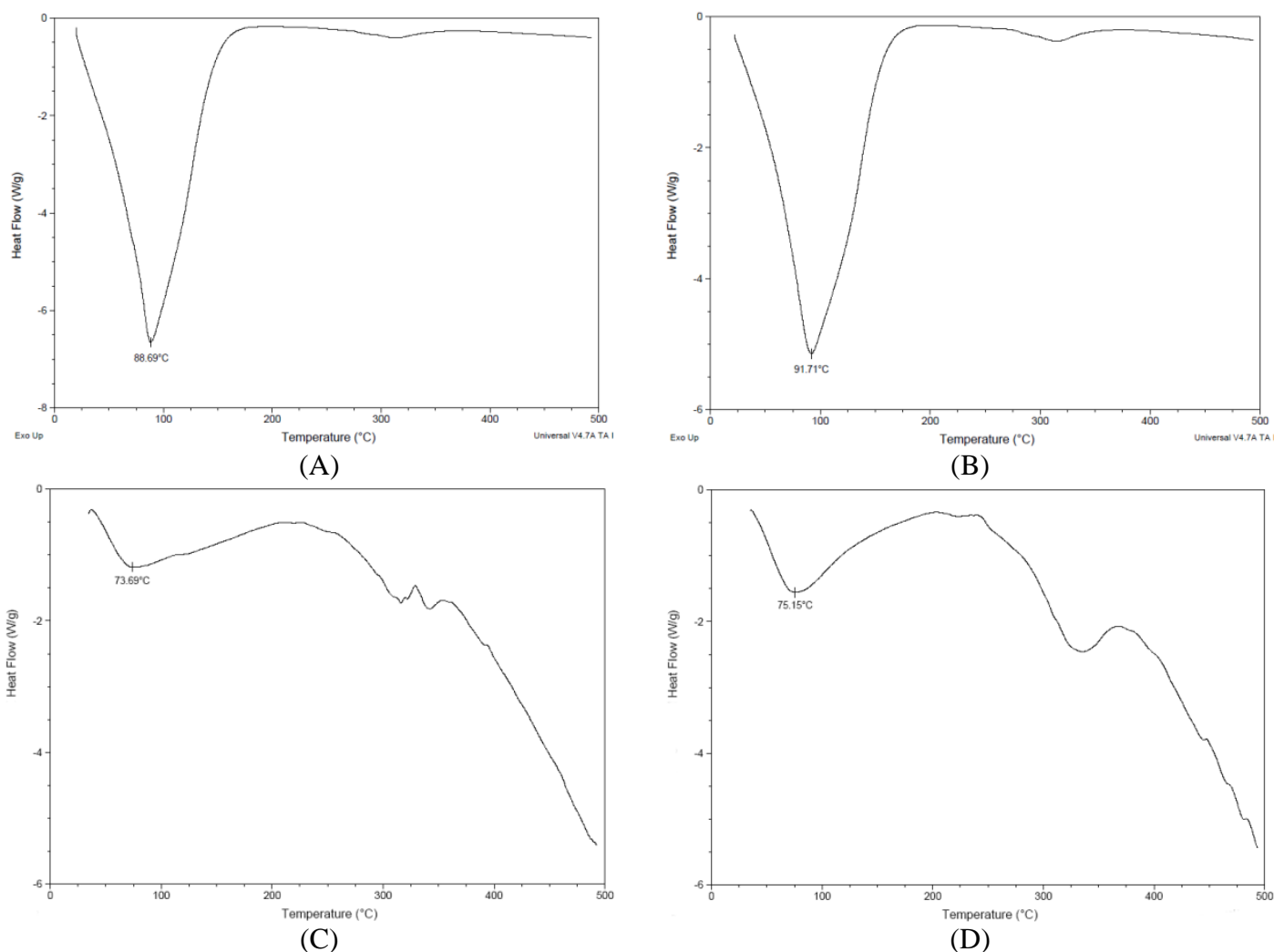


Figure 5.3: DSC analysis results. Chromium tanned samples (a) conventional unhairing process, (b) enzymatic unhairing process; Chromium-free tanned samples (c) conventional unhairing process, (d) enzymatic unhairing process.

In this work the kinetic study to determine the best time for enzymatic unhairing was carried out, the results showing that after 6 h of process it is possible to obtain hides successfully unhaired, without damages on grain and with satisfactory removal of inter-fibrillary proteins. This represents a reduction of more than 14 h for the enzymatic process as previously reported. The scale up and analysis of COD and BOD of reactional wastewaters showed that the enzymatic process contributes to a large decrease of these parameters, along with the levels of nitrogen and sulfides, which is environmentally extremely important. There was also the elimination of the deliming steps when using enzymatic process. The application of the crude extract of cultures directly over hides appear to be technically and cost effective in the process of unhairing, thus granting further studies in order to improve the use of this proteolytic system in the leather industry and its scaling up.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES and CNPq (Project #505822/2008-3) Brazilian agencies for scientific research and development for their financial support of this study. The

authors acknowledge the Curtume Nimo (Montenegro, RS, Brazil) for their kind collaboration by providing hide samples and materials.

5.4 References

1. KEMP, R.; VOLPI, M. The diffusion of clean technologies: a review with suggestions for future diffusion analysis. *J. Clean. Prod.*, 2008, 16S1, S14-S21.
2. JIAN, S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *J. Clean. Production*, 2011, 19, 325-331.
3. GUTTERRES, M.; BORDIGNON, S.R.; BAUR, L. Contamination of Used Soak/Unhairing Baths by Nitrogen in Comparison with Carbon and Soluble Protein Contents. *J. Society of Leather Technol. and Chemists*, 2011, 95, 35-38.
4. FUCK, W. F.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N. R.; BORDIGNON, S. The influence of Chromium supplied by tanning and wet finishing processes on the formation of Cr (VI) in leather, *Braz. J. Chem. Eng., abr./jun.* 2011, 28, no.2 221-228.
5. YILMAZ, O.; KANTARLI, C.; YUKSEL, M.; SAGLAM, M.; YANIK, J. Conversion of leather wastes to useful products, *Resources Conservation & Recycling*, 2007, 49, p. 436-448.
6. GUTTERRES, M. Alternatives for leather tanning. *Exclusive Journal*, p. 8, fev. 2011.
7. DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Obtaining sodium chromate from ash produced by thermal treatment of leather wastes. *Chem. Engineering J.*, 2010, 160, 8-12.
8. DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Production of basic chromium sulfate by using recovered chromium from ashes of thermally treated leather *J. Hazardous Materials*, 2010, 176, 710-714.
9. SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, U. B.; RAMASANI, T.; Natural Leathers from natural materials: progressing toward a new area in leather processing. *Environ. Sci. Technol.*, 2004, 38, 871-879.
10. WENZEL, B. M.; MARCÍLIO, N. R.; GODINHO, M.; MASOTTI, L.; MARTINS, C. B.; Iron and chromium sulfates from ferrochromium alloy for tanning. *Chem. Engineering J.*, 2010, 165, 17-25.
11. GUTTERRES, M.; AQUIM, P. M.; PASSOS, J. B.; TRIERWEILER, J. O. Water reuse in tannery beamhouse process *J. Clean. Prod.*, 18, 1545-1552, 2010.
12. LI, S.; LI, J.; YI, J.; SHAN, Z. Cleaner beam house processes trial on cattle sofa leather. *J. Clean. Production*, 2010, 18, 471-477.

13. JIAN S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste, *J. Clean. Prod.*, 2008, 16, 591-597.
14. KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. *J. Clean. Prod.*, 2009, 17, 507-515.
15. BAJZA, Z.; VRCEK, V.; Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste, *Waste Management*, 2001, 21, 79-84.
16. AQUIM, P.M.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J.O. Assessment of water management in tanneries: State of Rio Grande do Sul case study. *J. Society of Leather Technol. and Chemists*, 2010, 94, 253-258.
17. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; AYUB, M.A.Z. Hide Unhairing and Characterization of Commercial Enzymes Used in Leather Manufacture. *Braz. J. Chem. Eng.*, 28, No. 03, July-September, 2011
18. VALEIKA, V.; BELESKA, K.; VALEIKIENE, V.; KOLODZEISKIS V. An approach to cleaner production: from hair burning to hair saving using a lime-free unhairing system, *J. Clean Prod.*, 2009, 17, 214-221.
19. RAMOS, M. L. A.; LIU, C.K., 2010. A novel system of removing decorin, a minor proteoglycan of bovine hides, to improve the quality of leather. *JALCA*, 2010, 105, 222-227.
20. DETTMER, A.; CAVALLI, É.; GUTTERRES, M.; AYUB, M.A.Z. Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. *Chem. Eng. and Technol.*, *In press*.
21. Residual liquors and liming – Sulfides amount determination – Test method. ABNT – NBR 13340/1995
22. Annual Book of American Society for Testing and Materials Standard, Test Method for Chromic Oxide in Leather (*Perchloric Acid Oxidation*), ASTM D 2807-93 (Reapproved 1998) p.280-282, 1998.
23. Physical and mechanical tests – Determination of tensile strength and percentage extension, DIN EN ISO 3376, 2002.
24. Physical and mechanical tests – Determination of tear load – Part 1: Single edge tear, DIN EN ISO 3377-1, 2002.
25. SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOHAR, B.M.; PUVANAKRISHNAN, R. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, 2008, 70, 1025-1034.
26. KAZLAUSKAITÈ, E.; BALCIUNIENÈ, J.; ZALIAUSKIENE, A.; BELESKA, K., VALEIKA, V.; VALEIKIENE, V. Influence of unhairing method on dermatan sulphate and

microscopical investigation of pelt and leather. J. Society of Leather Technol. and Chemists, 2001, 86, 59-64.

27. MOZERSKY, S. M.; WILDERMUTH, R. J.; MARMER, W. N. Estimation of the sulfated glycosaminoglycan content of bovine skin with alcian blue. JALCA, 2003, 98, 337-343.

28. GALARZA, B.C.; CAVELLO, I.; GRECO, C.A.; HOURS, R.; SCHULDT, M.M.; CANTERA, C.S. Alternative Technologies for adding value to bovine hair waste, J. Soc. Leather Technol. Chem., 2009, 94, 26-32.

29. RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. J. Biotechnol., 2007, 128, 693–703.

30. GUTTERRES, M. Science for leather technology. 1 ed., Tríplice, Porto Alegre, 2008.

31. SARAVANABHAVAN, S.; ARAVINDHAN, R.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.R.; NAIR, B.U. Green solution for tannery pollution: effect of enzyme based lime-free unhairing and fibre opening in combination with pickle-free chrome tanning, Green Chemistry, 2003, 5, 707-714.

Capítulo 6

Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative

Artigo enviado para publicação no periódico: *Bioprocess and Biosystems Engineering*, em janeiro de 2012.

Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative

Aline Dettmer^{a,*}, Élita Cavalli^a, Marco A. Z. Ayub^{b,*}, Mariliz Gutterres^{a,*}

^aChemical Engineering Department, Laboratory for Leather and Environmental Studies (LACOURO), ^bBiotechnology & Biochemical Engineering Laboratory, (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Luiz Englert str., s/n°, 90.040-040, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding authors. Tel.: +55 51 3308 3954; fax: +55 51 3308 3277.

E-mail addresses: alinedet@enq.ufrgs.br (A. Dettmer); mariliz@enq.ufrgs.br (M. Gutterres); mazayub@ufrgs.br (M. A. Z. Ayub)

ABSTRACT

Background: In this work is described the isolation of a new proteases-producing strain of *Bacillus subtilis*, screened from aerobic tannery sludge, to be applied in leather production. The optimization of culture conditions to enhance the proteolytic activity was carried out using Central Composite Design. Characterization of enzymatic extract was carried out; hide unhairing and the inter-fibrillary removal capabilities of the enzymatic extract were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and by the determination of proteoglycans and glycosoaminoglycans. The leather quality obtained with this enzymatic preparation was assessed for possible damages to hide collagen by measuring the amount of hydroxyproline released into the reaction medium.

Results: Temperature were the most significant factor for culture conditions optimization. The crude enzymatic extract showed the best values for proteolytic activities at pH 9 and 10, temperature between 37 and 55°C, and showed good thermal stability up to 45°C. The treated hides presented few remaining hairs; for the enzymatic process, the removal of inter-fibrillary proteins was approximately 4-fold for glycosoaminoglycans and 6-fold for proteoglycans, when compared with the conventional unhairing process.

Conclusions: the enzyme application was successful for hide treatment, suggesting that this enzymatic preparation can be used in an environment-friendly leather production to replace the conventional chemical process.

Keywords: leather; unhairing; optimization; proteolytic enzymes; sulfide replacement.

6.1 Introduction

Among the most environment impacting industrial activities are those associated with the leather production. Tanneries use hides as raw materials, resulting in high amounts of solid waste that are not converted into leather. The hide represents 7 % of the cattle weight and 25 % of this is effectively transformed into leather, with the remaining process intermediates or by-products being considered of having a potentially high impact on the environmental.¹

The conventional mode of tanning process involves “do-undo” operations, where hides are subject of a wide range of unit operations, chemical reactions, and pH changes,²⁻⁴

requiring the use of acids and alkalis, and other salts such as ammonium sulfate, which contributes to high amounts of waste generation. Among the several phases of the tanning process, the liming/unhairing is responsible for most of the overall environment impact, as it generates 83 % of BOD, 73 % of COD, 60 % of suspended solids and 76 % of the total polluting charge produced during the manufacturing process of hides⁵. This is due to the traditional unhairing process that requires sodium sulfide and lime in the beamhouse phase.

Given to current trend of worldwide legislation on environmental standards of emission, tanneries are required to reduce all types of pollution (solid wastes, dissolved or suspended matters in effluents, BOD, COD). Consequently, the replacement of conventional unhairing process using sulfide and lime by a less polluting procedures is becoming increasingly important in order to reduce the pollution.⁶

Attempts have been made in order to replace or minimize the use of toxic chemicals and also to reuse or propose alternative treatments for liquid and solid wastes.⁷⁻¹⁴ One of the most significant technologies being considered in this process is the use of enzymes that could be used in substitution of the chemical unhairing process. To achieve these goals, it is important to understand the chemical characteristics and composition of leather in order to allow for better enzyme applications. During the traditional beamhouse process (liming/unhairing process) the collagen fiber network is opened and nonstructural proteins are removed.¹⁵ Glycosaminoglycans and proteoglycans are the most important inter-fibrillary proteins, with hyaluronic acid as the main glucosamine, the others being chondroitin and dermatan sulfate. The most important proteoglycan is decorin, which consists of a single chain of dermatan sulfate linked to a polypeptide chain. Hydroxyproline is an important component of the collagen, the content of hydroxyproline released into process wastewater can be used as an indicator to determine the eventual enzymatic attack on hide grain.

In this context, the central aim of this research is to study the possibility of applying enzymatic treatment to leather processing in order to reduce the environmental impact of this activity. First, a source of microbial enzyme was sought; aerobic sludge from a local tannery was used as microorganism source. After screening and selection, the optimizations of cultivation conditions for enzyme production were carried out through factorial designs. The unhairing capabilities of enzymatic extracts were evaluated by optical and scanning electron microscopy (SEM), and the inter-fibrillary removal and hydroxyproline content were compared for the traditional and the enzymatic unhairing processes.

6.2 Experimental

6.2.1 Screening for proteolytic activities in bacteria

The screening of proteolytic activities of bacteria was carried out using isolated strains that were sampled from the sludge of a local tannery (Kern-Mattes, Portão, RS, Brazil), which have been identified by 16S rRNA in a previous work.¹⁶

For the quantitative estimation of extracellular protease activity by the selected bacterium, single colonies were picked-up and were grown in medium (M), containing (in

g/l): K₂HPO₄, 7; KH₂PO₄, 3; MgSO₄, 0.1; yeast extract, 5; soybean meal, 10.18 Growth conditions were 37°C, pH 7 and 80 rpm of agitation in a rotatory shaker.

For the enzymatic extract production, single colonies of bacteria from plates were inoculated into 100 ml of medium M in Erlenmeyer flasks (250 ml) and incubated at 37°C in a rotatory shaker at 80 rpm. After reaching an optical density (OD, 600 nm) of 1.0, an aliquot of these cultures were inoculated into production flasks corresponding to 10 % (volume fraction) of the final culture volume.

The proteolytic activities of microbial cultures were specifically investigated for their action over azocasein, keratin azure, and azocoll. The cultivation broth was centrifuged at 10 000 g for 10 min and the supernatant was used for the enzymatic assay. The reaction mixture contained 100 µl of substrate (azocasein 10 mg/ml), 100 µl of buffer, and 100 µl of supernatant with the enzyme. Samples were incubated at 37°C for 30 min, and the reaction was stopped using 500 µl of 10 % TCA (trichloroacetic acid). After centrifugation at 10 000 g for 5 min, 800 µl of the supernatant were added to 200 µl of 1.8 N NaOH and the absorbance was determined at 420 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 420 nm for 30 min at 37°C. A control was prepared adding buffer and substrate solution to TCA. Enzymatic activities over keratin and collagen were determined using keratin azure and azocoll as substrates, respectively. Both keratinolytic and collagenolytic activities were determined by incubating 500 µl of the enzymatic supernatant with 4 mg of either keratin azure or azocoll and 500 µl of buffer. The reaction mixture was incubated at 55°C for 30 min under agitation. After centrifugation at 10 000 g for 5 min, the absorbance was measured at 595 nm. One unit of enzyme activity was the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 595 nm for 30 min at 55°C. A control was prepared adding enzymatic solution and buffer, without substrate.¹⁶

6.2.2 Optimization of cultivation conditions using the Central Composite Design

The effects of pH and temperature were evaluated and optimized by a central composite design. The variables are presented in Table 6.1, with three central points.

The quadratic equation for the variables was expressed as follows:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

Where Y is the response variable, b₀ the constant, b_i the coefficient of the linear effect, b_{ii} the coefficient for the quadratic effect, b_{ij} the coefficient for the interaction effect. The above quadratic equation was used to plot the surfaces for the variables.

For all experimental designs, Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was used for regression and graphical analysis of data. The significances of the regression coefficients were determined by the Student's t-test; the second-order model equation was determined by the Fischer's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R².

Table 6.1: Central composite design for pH and T and responses for proteases activity

Exp	Codified values		Real values		Y (Enzymatic activity, U/ml)
	T (°C) (X ₁)	pH (X ₂)	X ₁	X ₂	
1	-1	-1	33	6	146.23
2	-1	1	33	8	162.33
3	1	-1	41	6	83.13
4	1	1	41	8	59.10
5	0	0	37	7	134.00
6	0	0	37	7	134.87
7	0	0	37	7	135.13
8	1.41	0	42.64	7	46.53
9	-1.41	0	31.36	7	145.10
10	0	1.41	37	8.41	125.30
11	0	-1.41	37	5.59	107.50

6.2.3 Enzymatic characterization of extracts

The enzymatic characterization was carried out according to a previous work; with the following modifications.¹⁶ Enzyme extracts obtained from cultivations were characterized for their best pH, temperature, and thermal stability. For pH, the activities were evaluated in sodium phosphate 0.1 M (pH 6 to 8), or in sodium bicarbonate 0.1 M (pH 9 to 13) buffers, at 37°C. The effects of temperature on enzymatic activities were tested between 28 and 75°C, with the pH fixed in its best value, previously determined. The thermal stability of the enzymatic extract was determined at its optimal pH, with enzymatic solutions being exposed to temperatures of 37, 45, and 55°C for 15, 30, 60, and 120 min. The residual enzymatic activity was determined as described above at 37°C and using azocasein as substrate. The effects of some chemicals normally used during the leather production process on the activity of the enzymatic extract were also tested: EDTA, 5 mM; surfactant (Eusapon S, BASF), 0.1 % (mass fraction); fatty alcohols (Busperse 7769, Buckman Laboratories), 0.1 % (volume fraction); salts (calcium hydroxide, 0.5 and 1 % mass fraction, sodium carbonate, 0.3 % mass fraction); and sulfides, 1 % (mass fraction). Enzymes were preincubated for 15 min at room temperature with the tested chemicals. The residual enzymatic activities were determined as described above at 37°C and using azocasein as substrate.

6.2.4 Assessment of unhairing activity

For unhairing capability evaluation pieces of bovine hides weighing approximately 40 g were immersed into 80 ml of crude enzyme extract obtained from 48 h cultivations, standardized to have a proteolytic activity of 90 U/ml. The tests were conducted in a laboratory drum (cylindrical rotating reactor, used for hide and leather processing), at 24 rpm. The hide samples were incubated for 6, 12, and 18 h at 25°C and compared with a control (treated just with water) and with samples of hide submitted to the conventional chemical process (see Table 6.2). In case of enzymatic unhairing, enzymatic extracts were used during this step, consequently the next step, which consisted of deliming, the removal of liming added before is not necessary, contributing to a faster and environment-friendly process; in this case unhairing/liming, washing and deliming steps were replaced by the enzymatic unhairing single step. After unhairing, samples obtained from both processes were tanned using basic chromium sulfate; the formulation is presented in Table 6.2. The hides were

microscopically evaluated and the inter-fibrillary proteins proteoglycan and glycosaminoglycans released into the bath were analyzed following a protocol described by Madhan et al. (2010).¹⁸ The content of hydroxyproline was also determined using a method developed at the FILK Institut (Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen, Freiberg, Germany, 2009, unpublished work).

Table 6.2: Chemicals and times for leather processing

Process	Chemical	Quantity** (%)		Time (min)	
		C*	E*	C*	E*
Washing	Water	200	200	15	15
Soaking	Water	200	200		
	Sodium carbonate	0.3	0.3		
Unhairing and liming	Surfactant	0.15	0.15	180	180
	Water	50	-		
	Hydrated lime	1	-		
	Unhairing assist	0.6	-		
	Surfactant	0.08	-	60	
	Sodium Sulfide	1	-		
	Hydrated lime	0.5	-	45	
	Sodium Sulfide	1.5	-		
	Hydrated lime	0.5	-	60	
	Water	150	-		
	Hydrated lime	2	-		
	Surfactant	0.02	-	90	
	Enzymatic Unhairing	Enzymatic crude extract	-	***	-
Washing	Water	300	300	5	5
Deliming	Water	300	-		
	Ammonium sulfate	0.2	-	20	
	Water	30	-		
	Ammonium sulfate	1.5	-	20	
	Organic acid	0.5	-		
	Surfactant	0.12	-		
	Sodium bisulfite	0.4	-	75	
Bating	Water	40	40		
	Enzyme	0.04	0.04	15	15
Bating washing I	Water	300	300	15	15
Bating washing II	Water	300	300	15	15
Pickling	Water	50	50		
	NaCl	5	5	30	30
	Formic acid (1:10)	0.5	0.5	20	20
	Sulfuric acid (1:10)	1	1	120	120
Tanning	Basic chromium sulfate	6	6	overnight	overnight
Basification	Magnesium oxide	0.2	0.2	20	20
	Magnesium oxide	0.3		20	20

*C = Conventional unhairing process; E = Enzymatic unhairing process

** Offers calculated on hide weight

*** Quantity of enzymatic crude extract was defined according to the enzymatic unhairing.

6.3 Results and Discussion

6.3.1 Isolation of enzyme producing microorganisms

From colonies spread onto plates, only 10 colonies were able to form clear halos indicating proteolytic activities. These colonies were isolated, numbered and identified as *Bacillus subtilis* as presented at Table 6.3. All isolated strains were evaluated for their activities over azocoll, keratin azure, and azocasein substrates. One colony, named *B. subtilis* BLBc 17, was selected for further studies because its activity over keratin azure was the highest among the 10 isolates.

Table 6.3: – Activity of the isolated bacteria on different substrates and their identification by 16S rRNA.

Isolate	Activity on azocasein (U/ml)*	Activity on keratin azure (U/ml)**	Activity on azocoll (U/ml)**	Identification***
BLBc 11	114.97 ± 2.30	9.20 ± 0.76	61.33 ± 0.72	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc15.1	114.07 ± 2.65	5.70 ± 1.00	112.83 ± 1.10	<i>Bacillus atrophaeus</i>
BLBc15.2	117.73 ± 1.24	7.95 ± 0.65	116.17 ± 0.61	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc17	103.73 ± 2.08	13.45 ± 0.50	135.70 ± 1.52	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc 18	105.70 ± 2.50	8.35 ± 0.56	103.80 ± 2.69	<i>Bacillus pumilus</i>
BLBc 19	104.63 ± 1.07	9.75 ± 0.76	92.25 ± 2.08	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc 21	110.47 ± 2.00	5.00 ± 0.60	74.07 ± 1.00	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc 22	104.10 ± 1.04	5.20 ± 0.25	97.97 ± 2.51	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc 24	104.43 ± 1.25	4.45 ± 0.50	90.77 ± 1.32	<i>Bacillus subtilis</i>
BLBc 26	110.95 ± 1.15	5.85 ± 0.53	71.15 ± 0.75	<i>Bacillus subtilis</i>

*One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme causing a change of absorbance of 0.01 at 420 nm and **595 nm; ***Identifications were higher than 98% of genetic identity.

6.3.2 Optimization of culture conditions of *B. subtilis* Blbc 17 cultivation

The effects of pH and temperature were evaluated using cultivation medium M, and the results are presented in Table 6.1. The analysis of their effects on the proteolytic activity of *B. subtilis* Blbc 17 indicated that temperature was significant (95 % confidence level), the model being very reliable with a R^2 of 0.92. The coefficients related to pH were not significant. Temperature was fixed at 33°C and pH fixed at 7. The equation that describes protease production can be expressed according Equation (2):

$$Y = -857.29 + 62.81X_1 - 0.98X_1^2 \quad (2)$$

The validation of the statistical model was carried out as independent cultures were run using medium M, pH 7 and temperature at 33°C producing an activity of 170 U/ml (mean of duplicates) after 48 h of cultivation, see Figure 6.1. This is close to the predicted value of 150 U/ml (Figure 6.2).

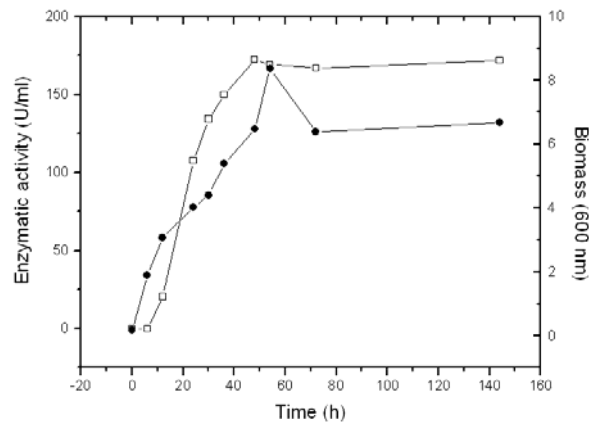


Figure 6.1: Validation of the statistical model and regression equation. Enzymatic activity (—□—) and cell growth (—●—).

Oskouie et al. (2008)¹⁹ optimized the production of cold-active proteases and found the optimal temperature of 7.96 °C; their validation of the experimental model was found to coincident with the predicted value. Chauhan and Gupta (2004)²⁰, studying the optimization of proteases production for detergents, did not obtain predictable values for their variables and the model failed to explain the production profile.

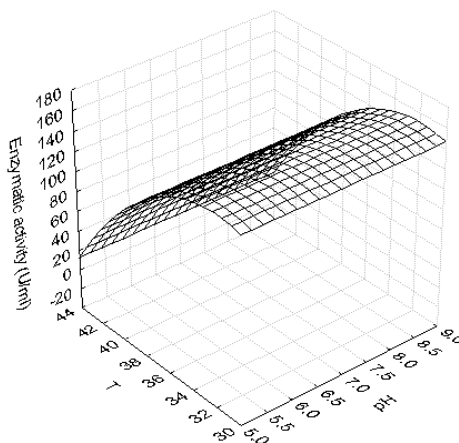


Figure 6.2: Response surface curves of proteolytic activity showing the interaction between pH and temperature after 48 h of incubation.

6.3.3 Enzymatic Characterization

The effects of pH on the enzymatic activity are shown in Figure 6.3A. The activities of the enzymes presented constant values for pH ranging from 6 to 12, decreasing for higher values, which is a promising result, since leather treatment is usually carried out at basic pH. The influence of temperature over proteolytic activities is shown in Figure 6.3B, with maximal activities between 37 and 55°C. Farag et al. (2004)²¹ characterize an enzyme that presented similar results, the authors obtain good relative proteolytic activity in the pH range from 6 to 11.

The thermal stability of the enzymatic extract was very good at 37°C and 45°C, maintaining about 90 % of its initial activity after 120 min; at 55°C, however, the activity was

lost after 30 min. Similar results were obtained by Wan et al. (2009)²² who evaluated the thermal stability of an alkaline protease and found that the enzyme presented good thermostability below 60°C, being quickly inactivated above 70°C. The proteolytic extract of a *Bacillus subtilis* strain showed thermal stability up to 65°C.¹⁷

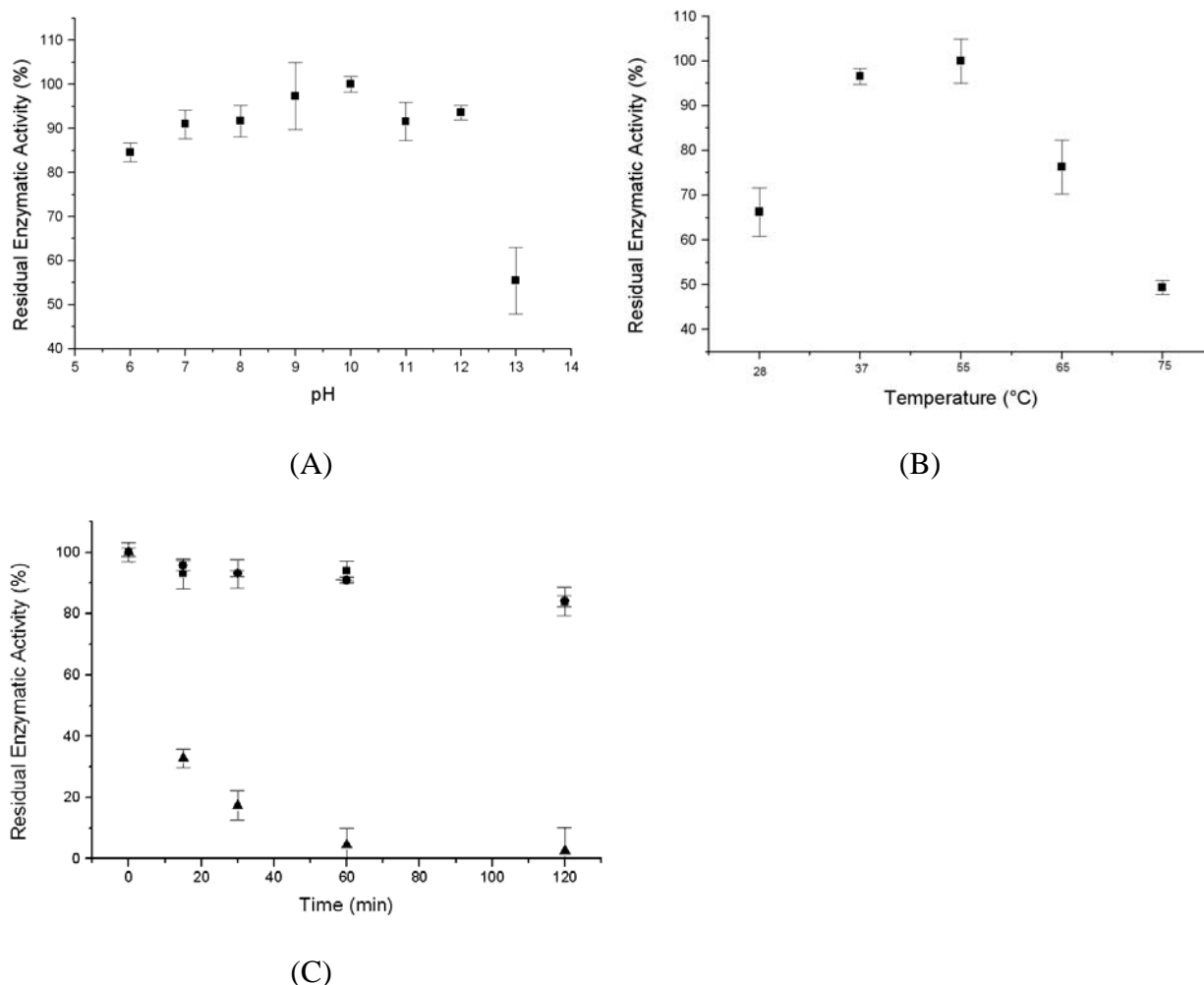


Figure 6.3: Effects of pH (A) and temperature (B) on the enzymatic activity; (C) thermal stabilities of the proteolytic enzymatic preparation of *B. subtilis* BLBc 17 at 37°C (—■—), 45°C (—●—), and 55°C (—▲—). Azocasein was used as substrate.

Salts and other chemicals used in industrial solutions may interfere with enzyme activity and therefore must be tested in order to prevent process losses. In Table 6.4 are presented the results of the effects of several chemical products on the enzymatic activity. The enzyme was partially inhibited by sodium sulfide and surfactant. EDTA, fatty alcohol, sodium carbonate, and the calcium hydroxide, caused no significant variations on enzymes activities.

Riffel et al. (2007)²³, reported the enzyme inhibition after exposure to mercaptoethanol, a reducing agent, suggesting that intact disulfide bonds are necessary for enzyme activity. The same model could be used to explain the residual activity of around 61 %, obtained in this work after contact with sodium sulfide, also a reducing agent.

Table 6.4: Effect of some inhibitors and chemical products on the enzymatic activity

Chemical	Concentration	Residual activity (%)
EDTA	0.15% (w/v)	90.59 ± 1.31
Fatty alcohol (Busperse 7769)	0.1% (v/v)	95.55 ± 4.92
Sodium carbonate	0.3% (w/v)	94.84 ± 7.69
Calcium hydroxide	0.5% (w/v)	98.58 ± 8.22
	1% (w/v)	97.94 ± 10.31
Surfactant (Eusapon)	0.1% (w/v)	79.52 ± 5.10
Sodium sulfide	1% (w/v)	61.12 ± 7.10

6.3.4 Hide unhairing

The enzymatic unhairing abilities of the enzymatic extract from cultures of *B. subtilis* Blbc 17 was evaluated over samples of hides. Results for optical and scanning electron microscopy are presented in Figure 6.4. Samples treated with the enzymatic extract presented few remaining hair (Figure 6.4B) compared to the control (Figure 6.4A).

Figures 6.4C and 6.4D show the results for the optical microscopy of tanned hide samples after enzymatic (18h) and conventional unhairing process, respectively. It is possible to observe for the proposed process some damage on the grain surface, possibly due to the long exposure time to enzymatic activity. According to Table 6.3, this enzymatic extract presented the highest activity on keratin azure and azocoll, so the damages occurring in the grain is probably due the high activity of the enzyme on collagen.

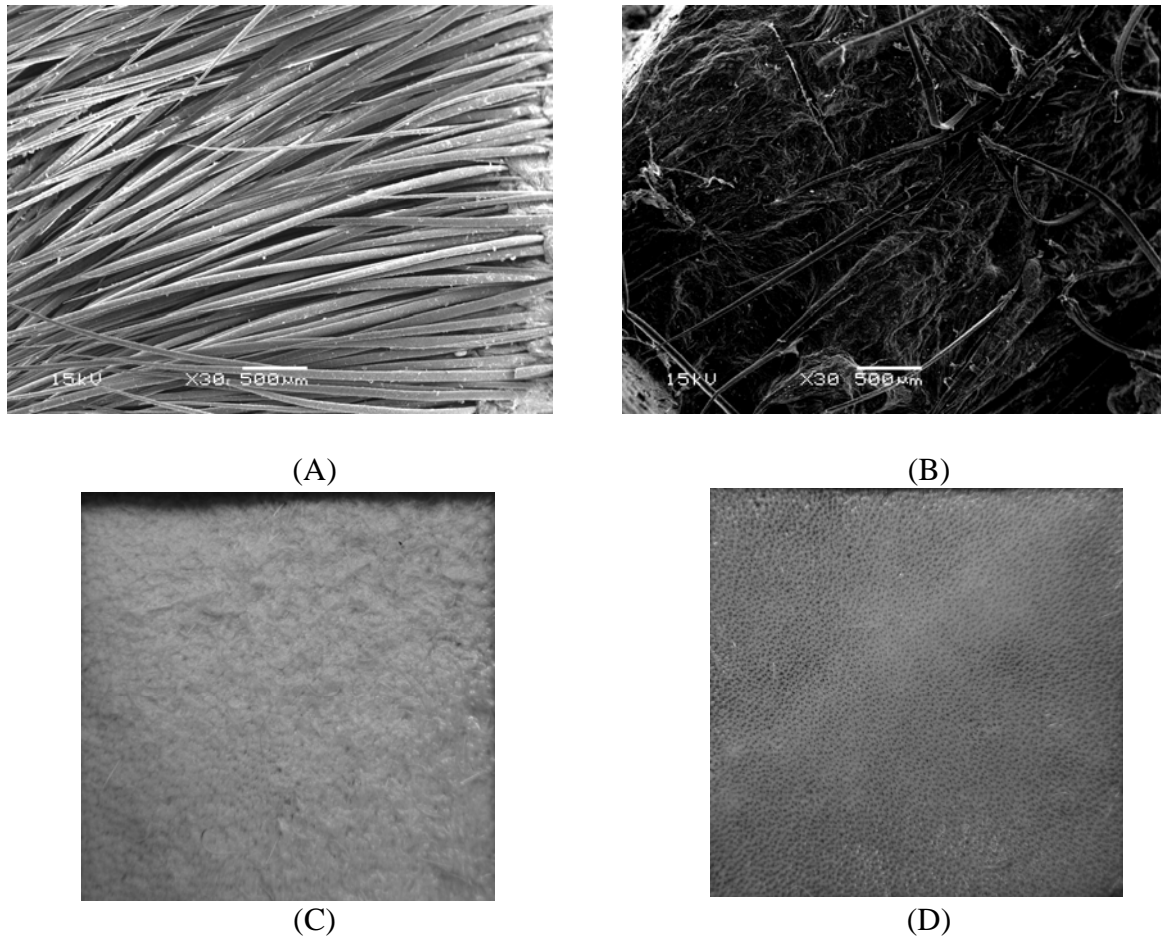


Figure 6.4: SEM of control samples without enzyme (A), and of hides after application of crude enzymatic extract of *B. subtilis* B1bc 17 (B); (30x magnification). Optical microscopy of a tanned leather after unhairing with crude enzymatic extract of *B. subtilis* 17 (C) and tanned leather after conventional unhairing process (D).

Results for inter-fibrillary proteins (proteoglycans and glycosaminoglycans), and hydroxyproline liberated into the bath during hide processing are presented in Table 6.5. The amounts of proteoglycans and glycosaminoglycans liberated into the bath were higher for the enzymatic than for conventional process. These results are very important because the removal of proteoglycans contributes to the opening up of fiber bundles¹⁰ and are exactly the aim of the initial steps of leather processing, producing soft leathers. According to Jian et al. 2011²⁴, saccharides (glycosaminoglycans) that are degraded and released into the treatment bath, might be due to the attacking of the core protein in proteoglycans by proteases. After the core is degraded, the integrity of proteoglycans is disrupted, and saccharides in proteoglycans are also degraded and released into the enzyme bath. For the conventional chemical process, there was no liberation of hydroxyproline into the bath, suggesting that this process does not injury collagen. However, the content of hydroxyproline liberated into the bath for enzymatic process was small and probably caused by the activity presented by the enzyme over collagen.

Table 6.5: Liberated inter-fibrillary proteins and hydroxyproline in the bath after enzymatic and conventional (chemical) unhairing processes

Process and Incubation time (h)	mg of glucosamine/g of hide	mg of proteoglycans/g of hide	µg of hydroxyproline/g of hide
Enzymatic (6)	$22.44 \pm 1.08 \times 10^{-4}$	$45.33 \pm 2.50 \times 10^{-3}$	$70.95 \pm 2.75 \times 10^{-3}$
Enzymatic (12)	$55.02 \pm 1.53 \times 10^{-4}$	$46.11 \pm 2.04 \times 10^{-3}$	$132.96 \pm 3.50 \times 10^{-3}$
Enzymatic (18)	$60.84 \pm 2.52 \times 10^{-4}$	$54.19 \pm 1.83 \times 10^{-3}$	$200.62 \pm 3.63 \times 10^{-3}$
Chemical (10)	$6.31 \pm 0.25 \times 10^{-4}$	$7.61 \pm 0.25 \times 10^{-3}$	0

The isolated *B. subtilis* Blbc 17 strain showed good capabilities to hide unhairing and inter-fibrillary protein removal. Central composite design was used to determine the best temperature and pH value, increasing proteolytic activity. The enzymatic extract presented good results for proteolytic activity in a large range of pH values and good thermal stability in the range of temperatures that are usually applied during leather processing, suggesting that this enzymatic preparation can be used in an environment-friendly leather production process.

Acknowledgements

The authors wish to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), both Brazilian agencies for scientific research and development, for their financial support of this study.

6.4 References

1. COOPER, M.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N. R. Environmental Developments and Researches in Brazilian Leather Sector. *JSLTC*. **95**, 243 – 249, (2011).
2. GUTTERRES, M.; AQUIM, P. M.; PASSOS, J. B.; TRIERWEILER, J. O. Water reuse in tannery beamhouse process. *J Clean Prod.* **18**, 1545-1552 (2010).
3. SREERAM, K.J.; RAMASAMI, T. Sustaining tanning process through conservation, recovery and better utilization of chromium. *Resources, Conservation & Recycling*, **38**, 185-212 (2003).
4. SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, U. B.; RAMASANI, T.; Natural Leathers from natural materials: progressing toward a new area in leather processing. *Environ Sci Technol.* **38**, 871- 879 (2004).
5. CASTIELLO, D.; PUCCINI, M.; SEGGIANI, M.; VITOLO, S.; ZAMMORI, F. Lyfe cycle assessment (LCA) of the oxidaditive unhairing process by hydrogen peroxide. *JALCA*. **103**, 1-6 (2008).
6. MARSAL, A.; COT, J.; BARTOLI, E.; BOSCH, T.; MANICH A. Oxidising unhairing process with air recovery. *JSLTC*. **86**, 30 – 33 (2001).
7. DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Obtaining sodium chromate from ash produced by thermal treatment of leather wastes. *Chem Eng J.* **160**, 8-12 (2010).

8. DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Production of basic chromium sulfate by using recovered chromium from ashes of thermally treated leather *J. Hazard Mater.* **176**, 710-714 (2010).
9. WENZEL, B. M.; MARCÍLIO, N. R.; GODINHO, M.; MASOTTI, L.; MARTINS, C. B.; Iron and chromium sulfates from ferrochromium alloy for tanning. *Chem Eng J.* **165**, 17-25, (2010).
10. LI, S.; LI, J.; YI, J.; SHAN, Z. Cleaner beam house processes trial on cattle sofa leather. *J Clean Prod.* **18**, 471-477 (2010).
11. JIAN S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste, *J Clean Prod.* **16**, 591-597 (2008).
12. KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. *J Clear Prod.* **17**, 507-515 (2009).
13. BAJZA, Z.; VRCEK, V.; Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste, *Waste Manag.* **21**, 79-84 (2001).
14. AQUIM, P.M.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J.O. Assessment of water management in tanneries: State of Rio Grande do Sul case study. *JSLTC.* **94**, 253-258 (2010).
15. UNEP/IE. Cleaner production in leather tanning, a workbook for trainers. 1^a ed. United Nations, 1996. P. IV3-23.
16. DETTMER, A.; Cavalli, É.; GUTTERRES, M.; AYUB, M.A.Z. Optimization of biotechnological process for hide unhairing in substitution of toxic sulfides. *Chemical Engineering and Technology*. In press.
17. PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl Microbiol Biotechnol.* **78**, 643-650 (2008).
18. MADHAN, B.; DINESHKUMAR, M.; RAO, J.R.; NAIR, B.U., Studies on the removal of inter-fibrillary materials part I: removal of protein, proteoglycan and glycosoaminoglycans from conventional beamhouse process. *JALCA*, **105**, 145-149 (2010).
19. OSKOUIE, S. F. G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem Eng J.* **39**, 37-42 (2008).
20. CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR -14. *Process Biochem.* **39**, 2115-2122 (2004).
21. FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol.* **34**, 85-93, 2004.
22. WAN, M.Y.; WANG, H.Y.; ZHANG, Y.Z. Substrate Specificity and Thermostability of the Dehairing Alkaline Protease from *Bacillus pumilis*. *Appl Biochem Biotechnol.* **159**, 394-403 (2009).

23. RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J Biotechnol.* **128**, 693–703 (2007).
24. JIAN, S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *J. Clean. Prod.* **19**, 325-331 (2011).

Capítulo 7

Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

A seguir serão apresentadas as conclusões deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

7.1 Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir:

- O processamento de couros permanece sendo um desafio quanto ao desenvolvimento e emprego das tecnologias mais limpas. As enzimas podem desempenhar um papel importante como uma tecnologia de migração do uso de produtos químicos para produtos naturais, mais corretos, ambientalmente. No entanto, sabe-se que os custos de sua aplicação continuam elevados, assim, mais pesquisas nesta área se fazem necessárias. E também, é de conhecimento da indústria que com emprego de enzimas sempre há o risco de ataque da estrutura de fibras da pele, com perda de substância dérmica e ataque da superfície da pele e perda de resistência física no couro. Os resultados obtidos neste trabalho sobre propriedades das enzimas comerciais serão úteis tanto para futuros trabalhos acadêmicos como também para utilização na indústria, já que características importantes das enzimas em questão foram detalhadas. Esses dados podem ser utilizados para permitir maior e melhor aplicação das enzimas nos processos produtivos, pois a inibição (ou não) delas em presença de produtos normalmente utilizados nas etapas produtivas do couro também estão apresentadas, bem como as faixas de pH e temperaturas em que as enzimas apresentam as maiores atividades.
- As duas bactérias isoladas neste trabalho e selecionadas para estudos mais detalhados apresentaram boa atividade sobre os substratos *keratin azure* e *azocoll* (mesmos substratos testados com as enzimas comerciais), o que possibilitará sua utilização nas etapas de depilação e caleiro, visando à remoção de pelos e de proteínas interfibrilares. A aplicação do planejamento experimental para a

seleção e otimização das condições de cultivo permite uma rápida identificação dos fatores significativos. Para a bactéria BLBc 11, o planejamento Plackett-Burman indicou que as variáveis significativas sobre a produção de proteases foram o extrato de levedura, a peptona e o farelo de soja. Esses fatores testados em planejamento composto central rotacional (CCR) produziram um modelo otimizado para a produção de proteases. Após a otimização do meio de cultivo, a temperatura e o pH foram otimizados com base em outro planejamento CCR, a temperatura foi fixada em 33°C e o pH em 7,0. Para a bactéria BLBc 17 a temperatura foi significativa para a produção de enzimas e foi fixada em 33°C.

- Os testes de caracterização das enzimas obtidas a partir das bactérias BLBc 11 e 17 mostraram que as enzimas apresentam melhores atividades enzimáticas em valores de pH de 9,0 e 10,0, respectivamente. Ambas apresentaram melhor desempenho na temperatura de 55°C, foram estáveis para as temperaturas de 37 e 45°C e foram totalmente inativadas para a exposição durante 120 min a 55°C. A estabilidade das enzimas nas temperaturas de 37 e 45°C, é um fato importante para sua aplicação no processamento de peles, uma vez que na maioria das etapas produtivas trabalha-se com temperaturas amenas, chegando a no máximo a 60°C (etapa de engraxe).
- Os resultados obtidos na comparação entre o processo convencional de depilação e o processo enzimático (utilizando as enzimas produzidas pela bactéria BLBc 11) mostraram que a utilização de enzimas é sim uma opção promissora para redução da carga poluidora dos efluentes gerados, pois se comprovou a redução nos níveis de DQO, DBO, nitrogênio e sulfetos quando da utilização do processo enzimático; além disso, possibilita a redução do tempo de processo de forma significativa, de 20 horas para 6 horas, porém requer cuidados no controle deste tempo para que não ocorram prejuízos ao couro. Observou-se ainda que com o processo de depilação proposto neste trabalho é possível obter couros com as mesmas propriedades daqueles submetidos ao processo convencional, pois foram obtidos resultados similares para ambos os processos quando avaliados atributos tais como: resistência à tração e ao rasgamento, percentual de cromo e temperatura de retração. A avaliação do processo enzimático através da quantificação de proteínas interfibrilares permitiu avaliar a eficiência das enzimas na remoção das proteínas interfibrilares, e um possível ataque indesejado ao colágeno através da hidroxiprolina liberada para o banho residual. Concluiu-se ainda que a atividade residual das enzimas após o processo de depilação é satisfatória, o que cria a possibilidade de sua reutilização.

7.2 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos neste trabalho fazem-se algumas sugestões para a realização de trabalhos futuros:

- Realização de novos testes, com aumento de escala e avaliação e comparação da qualidade do couro;

- Avaliação e comparação dos custos de produção entre os dois processos;
- Utilização de processos de depilação combinados, tais como enzimas combinadas com reagentes oxidantes (como peróxido de hidrogênio), para assim, possibilitar a depilação em um tempo ainda menor;
- Utilização das enzimas produzidas pelas bactérias BLBc 11 e 17 em outras etapas do processamento de peles, tais como curtimento, tingimento e tratamento de efluentes;
- Aumento da escala de produção das enzimas, estudo da produção de enzimas em biorreatores;
- Aprofundar os estudos relativos à purificação das enzimas; estudar a viabilidade e a influência da purificação do extrato enzimático em sua ação sobre a pele;

Referências Bibliográficas

ADDY, V.L.; BOYEN, P.; COVINGTON, A.D.; LANGRIDGE, D.; LAU, H.; RASMUSSEN, L.; WOOD, C.B. Area increases through a novel enzyme application. XXVII Congresso IULTCS, Cancun - México, 2003.

ALTERTHUMM, F. Elementos de Microbiologia. IN: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (coord.). Biotecnologia Industrial – Fundamentos, 1ª ed., v. 1, São Paulo, Blucher, 2001. p. 13 - 17.

AMARAL, L.; GUTTERRES, M. Descromagem de resíduos de couro wet-blue. XVII Congresso Latino Americano dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro, Rio de Janeiro - Brasil, 2008.

ANDRADE, J. C. S.; MARINHO, M. M. O.; KIPERSTOK, A. Uma política nacional de meio ambiente focada na produção limpa: elementos para discussão. Publicação da Rede de Tecnologias Limpas da Bahia – TECLIM, consulta em setembro de 2010.

AQUIM, P.M.; MANCOPES, F.; GUTTERRES, M. Emprego de enzimas como processo alternativo de ribeira na produção de couro, XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife – Brasil, 2008a.

AQUIM, P.M.; MANCOPES, F.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J.O. Avaliação Ambiental e econômica de tecnologias de processamento de peles em couros. XVII Congresso Latino Americano dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro, Rio de Janeiro - Brasil, 2008b.

AQUIM, P.M.; MANCOPES, F.; GUTTERRES, M.; TRIERWEILER, J.O. Assessment of water management in tanneries: State of Rio Grande do Sul case study. *J. of the Society of Leather Technol. and Chemists*, **94**, 253-258, 2010.

BAJZA, Z.; VRCEK, V.; Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste, *Waste Managment*, **21**, 79-84, 2001.

- BASF, Vademécum para el técnico em cutición. 3ª edición, revisada y ampliada, agosto 1995.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic Enzymes: a Pratical Approach*. New York: Oxford University Press, 1996. 257p.
- BLC – Conferência Internacional com o BLC Leather Technology Centre, maio de 2009, Estância Velha.
- CARVALHO, D. Cresce número de empresas de biotecnologia no Brasil. Disponível na internet, <http://www.agrolink.com.br/noticias/ClippingDetalhe.aspx?CodNoticia=133302>, acesso em 11 agosto de 2010.
- CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR -14. *Process Biochemistry*, 39, 2115-2122, 2004.
- COOPER, M.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N. R. Environmental Developments and Researches in Brazilian Leather Sector. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 95, 243 -249, 2011.
- CRISPIM, A.; MOTA, M. Unhairing with enzymes. *J. of the Society of Leather Technol. and Chemists*, 87, 198-202, 2003.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotechnology: Manual de Microbiologia Industrial*. Zaragoza: Acribia, 1993. 413p.
- DAVIES, R. M. Setting of consent limits for tanning industry trade effluents. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, 81, 310-315, 1997.
- DAYANANDAN, A.; KANAGARAJ, J.; SOUNDERRAJ, L.; GOVINDARAJU, R.; RAJKUMAR, G. S. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *J. of Clean. Prod.*, 11, 533-536, 2003.
- DE TONI, C.H.; RICHTER, M.F.; CHAGAS, J.R.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain. *Can. J. Microbiol.*, 48, 342-348, 2002.
- DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Obtaining sodium chromate from ash produced by thermal treatment of leather wastes *Chem. Engineering J.*, 160, 8-12, 2010 a.
- DETTMER, A.; NUNES, K.G.P.; GUTTERRES, M.; MARCÍLIO, N.R. Production of basic chromium sulfate by using recovered chromium from ashes of thermally treated leather *J. of Hazardous Materials*, 176, 710-714, 2010 b.

EFTEKHAR, F.; FOULADI, J.; FAGHIHI, M. Isolation and identification of an alkaline protease producing *Bacillus* from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*, **1**, No. 3, 183-185, 2003.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry*, **45**, 617-626, 2010.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 85-93, 2004.

GALARZA, B.C.; CAVELLO, I.; GRECO, C.A.; HOURS, R.; SCHULDT, M.M.; CANTERA, C.S. Alternative Technologies for adding value to bovine hair waste, *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, **94**, 26-32, 2009.

GEHRING A.G.; DIMAIO G.L.; MARMER W.N.; MAZENKO C.E.; Unhairing with proteolytic enzymes derived from *Streptomyces griseus*. *Journal of the American Leather Chemists Association*, **97(10)**, 406-411, 2002.

GESSESSE, A.; KAUL, R.H.; GASHE, B.A.; MATTIASSON, B. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzymes and Microbial Techn.*, **32**, 519-524, 2003.

GIONGO, J. L.; Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GIONGO, J.L.; LUCAS, F.S.; CASARIN, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 375-382, 2007.

Glossary of Dermatology. Disponível na internet: <http://cueflash.com/decks/ummsdermatology>, acesso em 10 de novembro de 2011.

GUIA DO COURO ABQTIC, 2011.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*. Jan. 2003, p. 1.

GUTTERRES, M. . Apostila da Disciplina Tecnologia do Couro I e II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

GUTTERRES, M. . Tendencias Emergentes en la Industria del Cuero. Boletin Tecnico de la Asociacion Quimica Espanola de la Industria de Cuero, Barcelona, **57**, n. 1, p. 22-27, 2006.

GUTTERRES, M. Estrutura de colagênio da pele. *Revista do Couro*, ed. 170, p. 76-80, 2004.

- GUTTERRES, M. Efeito do curtimento sobre a microestrutura dérmica, *Revista do Couro*, ed 164, 2003.
- GUTTERRES, M. Ciência rumo à tecnologia do couro, Porto Alegre, Tríplice Assessoria e Soluções Ambientais Ltda., 2008, p. 257.
- GUTTERRES, M.; AQUIM, P.M.; PASSOS, J.B.; TRIERWEILER, J.O. Water reuse in tannery beamhouse process, *J Clean Prod*, 2010, Article in press.
- HERFELD, H.; Bibliothek des Leders, Frankfurt am Main, Umschau, 1990, p. 40.
- HOINACKI, E.; MOREIRA, M.V.; KIEFER, C.G. Manual básico de processamento de couro. SENAI/RS, Porto Alegre, 1994.
- IONATA, E.; CANGANELLA, F.; BIANCONI, G.; BENNO, Y.; SAKAMOTO, M.; CAPASSO, A.; ROSSI, M.; LA CARA, F. A novel keratinase from *Clostridium sporogenes* bv. pennavorans bv. nov. a thermotolerant organism isolated from solfatic muds. *Microbiological Research*, 163, 105-112, 2008.
- JIAN S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste, *J. of Clean Prod*, **16**, 591-597, 2008.
- JIAN, S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *J. Clean. Production*, **19**, 325-331, 2011.
- KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus Níger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, **33(5)**, 505-511, 1998.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. *J. of Clear Prod*, **17**, 507-515, 2009.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. *Dyes and pigments*, **76**, 338-347, 2008.
- KEMP, R.; VOLPI, M. The diffusion of clean technologies: a review with suggestions for future diffusion analysis. *J. of Clean Prod*, **16S1**, S14-S21, 2008.
- KREYSA, G.; MARQUARDT, R. et al. Biotechnology 2020, from de transparent cell to custom designed process, DECHEMA, 2005, Frankfurt am Main.

KUMAR, A.G.; SWARNALATHA, S.; SAIRAM, B.; SEKARAN, G. Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries. *Bioresource Technology*, **99**, 1939-1944, 2008.

KUMAR, C.G., TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint, *Biotechnology Advances*, **17**, 561-594, 1999.

LAMBERT, T. W., GOODWIN, V. M., STEFANI D., STROSHER L. Hydrogen sulfide (H₂S) and sour gas effects on the eye, a historical perspective. *Science of the Total Environment*, **367**, 1-22, 2006.

LI, S.; LI, J.; YI, J.; Shan, Z. Cleaner beam house processes trial on cattle sofa leather. *J. Clean. Prod.*, **18**, 471-477, 2010.

LOTTRAKUL, p.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *J. of Biotechnology*, **54**, 113-120, 1997.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.P.; TERMIGNONI, C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2005, p. 594-596.

MACEDO, A.J.; SILVA, W.O.B.; TERMIGNONI, C. Proprieties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase. *J. Microbiology*, **54**, 180-188, 2008.

MADHAN, B.; DINESHKUMAR, M.; RAO, J.R.; NAIR, B.U. Studies on the removal of inter-fibrillary materials part II: removal of protein, proteoglycan and glycosaminoglycans from biobased pre-tanning process. *JALCA*, **105**, 181-188, 2010.

MANCOPE, F.; DETTMER, A.; BARRIONUEVO, P.; GUTTERRES, M. Colagênio: Estrutura, Propriedades e Processos. IN: GUTTERRES, M. Ciência rumo à tecnologia do couro, Porto Alegre, Tríplice Assessoria e Soluções Ambientais Ltda., 2008.

MANDAL, T.; DASGUPTA, D.; MANDAL, S.; DATTA, S. Treatment of leather industry wastewater by aerobic biological and Fenton oxidation process. *J. of Hazardous Materials*, **180**, 204-211, 2010.

MELETIS, C.D.; BARKER, J.E. Therapeutic Enzymes - using the Body's helpers as healers, *Alternative & Complementary Therapies*, 74-77, 2005.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments, 400p., New York, 2001, United States.

NETO, J. A. Algumas aplicações das Enzimas. IN: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (coord.). Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos, 1ª ed., v. 3, São Paulo, Blucher, 2001a. p. 405 - 406.

- NETO, J. A. Purificação das Enzimas. IN: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (coord.). *Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos*, 1ª ed., v. 3, São Paulo, Blucher, 2001b. p. 379 - 386.
- OGINO, H.; OTSUBO, T.; ISHIKAWA H. Screening, purification and characterization of a leather-degrading protease. *Biochemical Engineering Journal*, **38**, p. 234-240, 2008.
- OKAFOR, N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, 551p., New Hampshire, 2007, United States of America.
- OSKOUIE, S. F. G.; TABANDEH, F.; YAKHCHALI, B.; EFTEKHAR, F. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Bioch. Eng. J.*, 39, 37-42, 2008.
- PANDEY *et al.* *Enzyme Technology*. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005.
- PAREEK, N.; VIVEKANAND, V.; SAROJ, S.; SHARMA, A. K.; SINGH, R. P. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAEM-51. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1091 – 1097, 2012.
- PASSOS, J. B. Reúso da água: uma proposta de redução do consumo de águas em curtumes. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- PAUL, R.G.; MOHAMED I.; DAVIGHI D.; COVINGTON A.D.; ADDY V.L. The use of neutral protease in enzymatic unhairing. *J. of the American Leather Chemists Association*, **96(5)**, 180-185, 2001.
- PILLAI, P.; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 643-650, 2008.
- PRIYA, S.; RAJARAM, A.; RAJARAM, R.; RAMASAMI, T. Depilation of skins by pure enzymes. *J. of the Society of Leather Technol. and Chemists*, **92**, 214-221, 2008.
- RAJU, A.A; CHANDRABABU, N.K.; SAMIVELU, N.; ROSE, C.; RAO N.M.; Eco-friendly enzymatic dehairing using extracellular proteases from *Bacillus* species isolate. *JALCA*, **91(5)**, 115-119, 1996.
- RAMOS, M. L. A.; LIU, C.K., 2010. A novel system of removing decorin, a minor proteoglycan of bovine hides, to improve the quality of leather. *JALCA*, 105, 222-227.
- RADEVA, G.; VALCHEV, I.; PETRIN, S.; VALCHEVA, E.; TSEKOVA, P. Kinetic model of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1280-1285, 2012.

REDDY, R. Advances in stabilised enzymes for leather processing, SLTC, SA Convention, June 2007.

REDDY, L.V.A.; WEE, Y.J.; YUN, J.S.; RYU, H.W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burmann and response surface methodological approaches. *Bioresource Technol.*, **99**, 2242-2249, 2008.

REED, R. Science for Studies of Leather Technology. Oxford, Pergamon Press Ltd., 1996, p.140.

REICH, G. From collagen to leather – the theoretical background, 337p., Ludwigshafen, 2007, Alemanha.

REICH, G. Kollagen – Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung. Dresden, Verlag Theodor Steinkopff, 1966, p.38.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review, *Advances in Colloid and Surfaces Science*, **147-148**, 237-250, 2009.

RIFFEL, A.; LUCAS, F.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.*, **179**, 258-265, 2003.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J. of Biotechnol.* **128**, 693–703, 2007.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M.A.Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, **46**, 682-688, 2011.

ROSSI, D. Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado proteico a partir de enzimas microbianas. 112f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SARAVANABHAVAN, S.; ARAVINDHAN, R.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.R.; NAIR, B.U. Green solution for tannery pollution: effect of enzyme based lime-free unhairing and fibre opening in combination with pickle-free chrome tanning, *Green Chemistry*, **5**, 707-714, 2003.

SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, U. B.; RAMASANI, T.; Natural Leathers from natural materials: progressing toward a new area in leather processing. *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 871-879, 2004.

SHIMOMURA, T.; ITOH, T.; SUMIYA, T.; MIZUKAMI, F.; ONO, M. Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine. *Enzyme and Microbial Technology*, **45**, 443 – 448, 2009.

SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOHAR, B.M.; RAJARAM, A.; PUVANAKRISHNAN, R. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, **70**, 1015-1024, 2008 a.

SIVASUBRAMANIAN, S.; MANOHAR, B.M.; PUVANAKRISHNAN, R. Mechanism of enzymatic dehairing of skins using a bacterial alkaline protease. *Chemosphere*, **70**, 1025-1034, 2008 b.

SKRAJNY B., REIFFENSTEIN R. J., SAINSBURY R. S., ROTH S. H. Effects of repeated exposures of hydrogen sulphide on rat hippocampal EEG. *Toxicology Letters*, **84**, 43-53, 1996.

SOUSA, M. Depilação: um processo químico e bioquímico. *Revista do Couro*, **186**, 95-101, 2006.

SOUZA, C.F.V. Produção em cultivo submerso e no estado sólido e caracterização da transglutaminase (EC 2.3.2.13) no isolado amazônico *Bacillus circulans*. 2562f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SOUZA, F.R.; ALENCAR, M.I.F.; SILVA, E. M.; GUTTERRES, M. Aplicação de enzimas no processamento de couros: comparação entre processos químicos e coenzimáticos. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, Brasil, 2010.

SSBiotec, Biotecnologia e Qualidade de Vida. Disponível na internet: <http://www.sbbiotec.org.br>, acesso em 11 de agosto de 2010.

SYED, D.G.; LEE J.C.; LI, W.J.; KIM, C.J.; AGASA, D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technol.*, **100**, 1868–1871, 2009.

TATINENI, R.; DODDAPANENI, K.K.; POTUMARTHI, R.C.; VELLANKI, R.N.; KANDATHIL, M.T.; KOLLI, N.; MANGAMOORI, L.N. Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology*, **99**, 1596-1602, 2008.

THANGAM, E.B.; NAGARAJAN, T.; RAJKUMAR G.S.; CHANDRABABU N.K.; Application of alkaline protease isolated from *Alcaligenes faecalis* for enzymatic unhairing in tanneries. *J. of the Am. Leather Chemists Assoc.*, **96** (4), 127-133, 2001.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J. R.; NAIR B.U.; RAMASAMI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing, *Trends in Biotechnol.*, **22**, 2004.

THANIKAIVELAN, P.; CHANDRASEKARAN B.; BHARATH C.K.; ANANDHI C.; SARAVANABHAVAN, S.; RAO J.R. Single step of hair removal and fiber opening process: simultaneous and successive addition of protease and alpha-amylase. *J. of the Am. Leather Chemists Assoc.*, v. 101, p. 388-398, 2006.

TREVAN, M.D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K.H.; STANBURY, P. Biotecnología: Principios biológicos. Zaragoza: Acribia, 1990. 284p.

VALEIKA, V.; BELESKA, K.; VALEIKIENE, V.; KOLODZEISKIS V. An approach to cleaner production: from hair burning to hair saving using a lime-free unhairing system, *J. of Clean Prod*, **17**, 214-221, 2009.

VAN BEILEN, J. B; LI, Z. Enzyme Technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnol.*, **13**, 338 – 344, 2002.

VOET, D.; VOET, J.G; PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica, 931p., Porto Alegre, 2000, Brasil.

ZAHOOR, A.; REHMAN, A.; Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J. of Environmental Sciences*, **21**,814–820, 2009.

ZHI-HUA, S.; QING, L.S.; JIAN-WEI, L.; OLLIS, D.L. Lime-free removal of non-collagen proteins from sheepskins: quantitative analysis by gel electrophoresis. *J. of the Society of Leather Technol. and Chemists*, **93**, 229-232, 2009.

WAN, M.Y.; WANG, H.Y.; ZHANG, Y.Z. Substrate Specificity and Thermostability of the Dehairing Alkaline Protease from *Bacillus pumilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **159**, 394-403, 2009.

WINTER, C. Avaliação Analítica de Proteínas e Gorduras para Detecção de Constituintes Residuais da Pele em Efluentes. 2011. 38 f. Trabalho de conclusão de curso – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation, *Enzyme and Microbial Technol.*, **38**, 291-316, 2006.

YA-PENG, C.; FU-HONG, X.; JING-HUA, L.; SHI-JUN, Q. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation, *J. of Environmental Sciences*, **19**, 1125-1128, 2007.

Apêndice A

Demais trabalhos publicados como resultado desta Tese de Doutorado

1. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; CAVALLI, E.; AYUB, M.A.Z.; Screening of a new bacterium that produces enzymes with application on leather processing. In: XXXI Congress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies, Valencia, 2011. Trabalho completo e apresentação oral
2. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; CAVALLI, E.; AYUB, M.A.Z. Aplicação de enzimas microbianas na depilação de peles bovinas. In: X Oktoberforum – Seminário do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química UFRGS, Porto Alegre, 2011. Trabalho completo e apresentação oral
3. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; AYUB, M.A.Z. Biotecnologia aplicada ao setor coureiro. In: IX Oktoberforum – Seminário do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química UFRGS, Porto Alegre, 2010. Trabalho completo e apresentação oral
4. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; CAVALHEIRO, J.C.; AYUB, M.A.Z. Caracterização de enzimas comerciais aplicadas na produção de couros. In: Anais XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, 2010. Trabalho completo e apresentação oral
5. DETTMER, A.; GUTTERRES, M.; SOUZA, F.R.; AMARAL, L.; SOUSA, M. Applications of Biotechnology in Leather. In: Proceedings of XXX Congress of the International Union of Leather Technologists and Chemists Societies, Beijing, 2009. Trabalho completo.
6. DETTMER, A.; AYUB, M. A. Z. ; GUTTERRES, M. Biotecnologia aplicada ao setor coureiro. In: Anais do IV Simpósio Brasil Alemanha - Desenvolvimento Sustentável, Curitiba, 2009. Resumo expandido e apresentação em pôster.