

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

CENTRO DE BIOCÊNCIAS - CB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Licania rigida* BENTH.

ELIZIANNE PEREIRA COSTA

RECIFE, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

CENTRO DE BIOCÊNCIAS - CB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Licania rigida* BENTH.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia, linha de pesquisa Biomateriais e Microbiologia Básica e Aplicada.

ALUNA: ELIZIANNE PEREIRA COSTA

ORIENTADORA: ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO

CO-ORIENTADORA: JANETE MAGALI DE ARAÚJO

CO-ORIENTADOR: ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA

RECIFE, 2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Costa, Elizianne Pereira

Produção de proteases por actinobactéria isolada da rizosfera de *Licania rigida* Benth. / Elizianne Pereira Costa- Recife: O Autor, 2017.

113 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadores: Janete Magali de Araújo e Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Enzimas proteolíticas 2. Streptomyces 3. Termodinâmica I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orientadora) II. Araújo, Janete Magali de (coorientadora) III. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão (coorientador) IV. Título

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-277

ELIZIANNE PEREIRA COSTA

“PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ACTINOBACTÉRIA ISOLADA DA RIZOSFERA DE
Licania rigida BENTH.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Biotecnologia, linha de pesquisa Biomateriais e Microbiologia Básica e Aplicada.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto – Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dra. Maria Teresa dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Maria Carolina Albuquerque Wanderley
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof Dr. Vagne de Melo Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICATÓRIA

À minha família que tanto me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Ernandes e Divone, e à minha irmã, Elizabelle, por terem me apoiado em cada passo dessa longa jornada. Foram muitos percalços, mas eles estavam sempre presentes para me amparar e encorajar a alcançar meus objetivos.

À minha querida orientadora, Ana Lúcia F. Porto, que acreditou na minha capacidade e sempre esteve presente quando as dúvidas nublaram minha visão.

À minha co-Orientadora, Janete Magali de Araújo, que foi uma verdadeira mãe científica e um exemplo de profissional dedicado e apaixonado pelo que faz.

A meu co-Orientador, Romero Brandão, que me encorajou quando eu estava quase desistindo e tornou esse trabalho possível.

À profa Gláucia Manoella de Souza Lima pelo imenso suporte nos experimentos.

Aos meus amigos do grupo Ana Porto (CENAPESQ, LABTECBIO e LIKA), que são muitos e cujos nomes não citarei, pois certamente esquecerei alguém. Meu muito obrigada por compartilhar esses momentos de alegrias e estresses, sempre com um sorriso no rosto e uma parceria ímpar.

Às amigas Erika, Camila Diniz e Camila Valença que me fazem rir todo dia, mesmo que estejamos distantes. Vocês me fazem lembrar que a amizade pode superar o tempo e a distância, e mesmo assim ser sempre a mesma.

Aos amigos que a vida distanciou, mas continuam no meu coração: Adry, Mari, Aline, Karine, Fátima Regina, Iasmim, Evelyn, dentre tantos outros.

À FACEPE, agradeço enormemente o apoio financeiro que permitiu a realização desta tese.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

Diga-me, e eu esqueço.
Mostre-me, e eu me lembro.
Envolva-me, e eu entendo.

Provérbio Chinês

RESUMO

Proteases microbianas são muito utilizadas na indústria, tendo papel chave no desenvolvimento de diversos processos biotecnológicos. As collagenases são um grupo de proteases que degradam a tripla hélice do colágeno e são utilizadas na indústria farmacêutica, do couro e no amaciamento de carnes. O objetivo do presente trabalho foi identificar a linhagem *Streptomyces* sp. através de características morfológicas, bioquímicas e técnicas moleculares, avaliar a produção de proteases em diversos substratos (gelatina, resíduo de café, farinha de soja, farelo de trigo e penas de galinha), produzir e purificar collagenase obtida a partir de fermentação submersa, caracterizar a collagenase quanto à influência da temperatura, pH, íons metálicos, surfactantes e inibidores enzimáticos, produzir peptídeos a partir da degradação de colágeno tipo I e tipo V, verificar o potencial anticoagulante dos peptídeos obtidos, e avaliar a cinética e termodinâmica da hidrólise de azocoll pela collagenase purificada. A actinobactéria foi identificada como *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421, e apresentou produção de enzimas proteolíticas quando cultivada em fermentação submersa em todos os substratos testados. As maiores atividades enzimáticas obtidas foram: protease (46,62 U/mL) em meio contendo farinha de soja, queratinase (32,96 U/mL) em meio contendo penas de galinha e protease fibrinolítica (9,3 U/mL) em meio com farinha de soja. Essas proteases não apresentaram afinidade pela resina de troca iônica e foram coletadas na fração não adsorvida. A collagenase foi produzida nos cinco substratos, apresentando maior atividade em meio contendo resíduo de café (377,50 U/mL), a partir do qual foi purificada por cromatografias de troca iônica e exclusão molecular, com atividade collagenolítica de 150,50 U/mL, atividade específica de 16.723,00 U/mg, fator de purificação de 136,7 e massa molar de 41,28 kDa. A caracterização da collagenase demonstrou que a enzima é uma metaloprotease neutra, com máxima atividade a 60 °C, pH 7.0, e possui afinidade por íons metálicos mono- e di- valentes, além de ser potencializada na presença dos surfactantes Tween 20, Tween 80 e Triton X-100. A degradação de colágeno tipo V produziu peptídeos com atividade anticoagulante que retardaram o tempo de coagulação sanguínea em 88s em comparação ao controle. Na hidrólise do azocoll, os parâmetros cinéticos obtidos da collagenase foram: $K_m = 27,14 \text{ mg/mol}$; $V_{\max} = 714,29 \text{ mg/mol/min}$; $K_{\text{cat}} = 79,9 \text{ s}^{-1}$, e; $K_{\text{cat}}/K_m = 2,95 \text{ ml/mg.s}$. Os parâmetros termodinâmicos apresentaram os seguintes valores (a 25 °C): Energia de Ativação (E_a) = 65,224 KJ/mol; Entalpia (ΔH) = 62,75 KJ/mol; Entropia (ΔS) = 1,96 J/mol; Energia Livre de Gibbs (ΔG) = 62,16 KJ/mol; Energia Livre na Ligação ao Substrato (ΔG_{E-S}) = 8,18 KJ/mol, e; Energia Livre no Estado de Transição (ΔG_{E-T}) = -2,64 KJ/mol. Os dados mostram potencial na produção de proteases, especificamente de collagenase, em diversos substratos pela linhagem *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421, em especial no cultivo em meio de cultura contendo resíduo de café, um resíduo abundante no Brasil. A collagenase purificada apresenta características que a qualificam para uso na produção de peptídeos bioativos.

Palavras-chave: Collagenase. Protease. *Streptomyces antibioticus*. Resíduo de café. Termodinâmica.

ABSTRACT

Microbial proteases are widely used in industry, playing a key role in the development of various biotechnological processes. Collagenases are a group of proteases that degrade the triple helix structure of collagen and are used in pharmaceutical, leather and meat industry. The aim of the present work was to identify the strain *Streptomyces* sp. using morphological, biochemical and molecular techniques, to evaluate the production of proteases in various substrates (gelatin, coffee powder residue, soybean meal, wheat bran, and chicken feathers), to produce and purify collagenase obtained from submerged fermentation, to characterize the influence of temperature, pH, metallic ions, surfactants and enzymatic inhibitors on collagenase activity, produce peptides from degradation of type I and type V collagen, to verify the anticoagulant potential of the peptides obtained, and to evaluate the kinetics and thermodynamics of the azocoll hydrolysis by the purified collagenase. The actinobacteria was identified as *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421, and showed proteolytic enzyme production when grown in submerged fermentation in all substrates tested. The highest enzymatic activities were: protease (46.62 U/mL) in medium containing soybean meal, keratinase (32.96 U/mL) in medium containing chicken feathers and fibrinolytic protease (9.3 U/mL) in medium with soybean meal. These proteases had no affinity for the ion exchange resin and were collected in the non-adsorbed fraction. The collagenase was produced in the five substrates analyzed, showing higher activity in medium containing coffee powder residue (377.50 U/mL), from which it was purified by ion exchange and molecular exclusion chromatography, with a collagenolytic activity 150.50 U/mL, specific activity 16,723.00 U/mg, purification factor 136.7 and molar mass 41.28 kDa. The characterization of collagenase demonstrated that the enzyme is a neutral metalloprotease, with maximum activity at 60 °C, pH 7.0, has affinity for mono- and di-valent metal ions, and is potentiated in the presence of Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 surfactants. Degradation of type V collagen produced peptides with anticoagulant activity that delayed blood coagulation time in 88s when compared to control. In the azocoll hydrolysis, the kinetic parameters obtained from collagenase were: $K_m = 27,14 \text{ mg/mol}$; $V_{max} = 714,29 \text{ mg/mol/min}$; $K_{cat} = 79,9 \text{ s}^{-1}$, e; $K_{cat}/K_m = 2,95 \text{ ml/mg.s}$. The thermodynamic parameters showed the following values (at 25 °C): Activation energy (E_a) = 65,224 KJ/mol; Enthalpy (ΔH) = 62,75 KJ/mol; Entropy (ΔS) = 1,96 J/mol; Gibbs free energy of activation (ΔG) = 62,16 KJ/mol; Free energy of substrate binding (ΔG_{E-S}) = 8,18 KJ/mol, and; Free energy for transition state formation (ΔG_{E-T}) = -2,64 KJ/mol. The data show potential in the production of proteases, specifically collagenase, in several substrates by the strain *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421, especially in culture medium containing coffee residue, a residue abundant in Brazil. Purified collagenase has characteristics that qualify it for use in the production of bioactive peptides.

Keywords: Collagenase. Protease. *Streptomyces antibioticus*. Coffee powder residues. Thermodynamic

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 – Esquema representando a estrutura do colágeno. [A] Tripla-hélice formada por três cadeias α ; [B] Vista lateral da ligação entre Glicina e Prolina estabilizando as três cadeias. [C] Vista superior da ligação entre Glicina e Prolina estabilizando as três cadeias..... 17
- Figura 2 – Esquema do local de ação das proteases nas cadeias polipeptídicas..... 20
- Figura 3 – Diversidade de macromorfologia de actinobactérias. [A] *Streptomyces* sp.; [B] *Actinomadura meyeriae*; [C] *Nocardia asteroides*, e; [D] *Nocardiopsis iraniensis*..... 24

ARTIGO 1

- Figure 1 – Taxonomy of the *Streptomyces* sp. strain based on the sequencing of 16S rRNA gene within the genus *Streptomyces*..... 39
- Figure 2 – *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 grown on modified MS-2 medium containing chicken feathers. [A] Culture medium without inoculum; [B] Culture medium after 120 h of growth; [C] Bottom view of culture medium without inoculum; [D] Bottom view of culture medium after 120 h of fermentation..... 41
- Figure 3 – Ion-exchange chromatography of *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 enzymatic crude extract produced on MS-2 medium modified with [A] coffee powder residue, [B] gelatin, [C] chicken feather, [D] soybean flour, and [E] wheat bran. The solid line represents the detection of proteins by FPLC while dashed lines represent the different concentrations of NaCl in the sample elution..... 43

ARTIGO 2

- Figure 1 – Comparison of the cell growth, protein content and enzyme production by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 in fermentation using MS2 medium containing coffee powder residue..... 57
- Figure 2 – [A] Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A50 column; [B] Size exclusion chromatography on Superdex G75 HR10/300 GL column and; [C] Gelatin zymogram of the purified collagenase. Arrowheads indicate the positions of collagenase..... 60
- Figure 3 – Collagenolytic activity profile of the protease produced by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 in different temperatures [A] and pH [B]..... 62
- Figure 4 – [A] Electrophoretic profile of peptides obtained from the collagen degradation. Lane S shows the molecular weight markers; The lane 1 presents the degradation of type I collagen, and; The lane 2 corresponds to the degradation of type V collagen. [B] Activated partial thromboplastin time (APTT) assay by using bioactive peptides from type V collagen degradation. Straight line indicates coagulation time of control; Open label indicates enzyme with CaCl_2 ; and closed label indicates enzyme without CaCl_2 65

ARTIGO 3

- Figura 1 – Linearização da curva de Michaelis-Menten através do gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) da hidrólise de azocoll pela collagenase de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421..... 78
- Figura 2 – Gráfico de Arrhenius para a energia de ativação (E_a) da hidrólise do azocoll utilizando a inclinação da reta..... 80

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Tipos de colágeno mais comuns no organismo.....	18
Tabela 2 – Levantamento de alguns micro-organismos produtores de enzimas collagenolíticas.....	23
Tabela 3 – Métodos de purificação de collagenases bacterianas.....	27
Tabela 4 – Métodos de purificação de collagenases fúngicas.....	28

ARTIGO 1

Table 1 – Enzymatic activities of the crude extracts of <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 grown in MS2 medium modified with different substrates.....	40
Table 2 – Enzymatic activities of the crude enzymatic extracts from <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 submitted to ion-exchange chromatography.....	44

ARTIGO 2

Table 1 – Enzyme production levels from fermentations by <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 in modified MS2 media with different substrates.	68
Table 2 – Purification steps of collagenase produced by <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 in MS2 medium containing coffee powder residue.....	61
Table 3 – Effects of metal ions, surfactants and inhibitors on the collagenase by <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421.....	63

ARTIGO 3

Tabela 1 – Parâmetros cinéticos da reação de hidrólise do azocoll por collagenase de <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421.....	79
Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos de ativação para a collagenase de <i>S. antibioticus</i> UFPEDA3421 em várias temperaturas.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Colágeno	17
3.2	Proteases	19
3.3	Colagenases e Proteases Colagenolíticas	21
3.4	Micro-organismos produtores de colagenases	22
3.5	Actinobactérias	24
3.5.1	<i>Streptomyces</i>	25
3.6	Purificação de Colagenase Microbianas	26
4	ARTIGO 1 - ENZYMATIC PROSPECTION OF THE STRAIN <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 ISOLATED FROM CAATINGA SOIL USING AGROINDUSTRIAL RESIDUES	31
5	ARTIGO 2 - NEW COLLAGENASE FROM <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421 TO OBTAIN BIOACTIVE PEPTIDES WITH ANTICOAGULANT ACTIVITY	50
6	ARTIGO 3 - ANÁLISE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE UMA COLAGENASE ISOLADA DE <i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA3421	72
	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de enzimas industriais foi responsável por movimentar aproximadamente \$4,9 bilhões no ano de 2015, com prospecto de crescimento para \$6,3 bilhões até 2021. Esses valores são explicados pelo fato de que as enzimas industriais estão presentes no processo de fabricação de mais de 500 produtos, distribuído por mais de 150 processos industriais, sendo as proteases responsáveis por 60% desse mercado (ADRIO; DEMAİN, 2014; BCC RESEARCH, 2017).

As proteases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações amida presentes em proteínas. Sua utilização biotecnológica mostra-se bastante diversificada, sendo aplicadas em setores industriais participando de processos na produção de detergentes, alimentos, papel, tecido, couro, combustíveis, tratamento de efluentes e tendo também grande importância farmacêutica (JABALIA; MISHRA; CHAUDHARY, 2014; MAHDY et al, 2015; BATISTA et al, 2017).

Dentro deste grupo de enzimas são encontradas as collagenases e proteases collagenolíticas, que possuem a capacidade de degradar o colágeno em sua forma insolúvel e solúvel, respectivamente (SAXENA, 2015; ZHANG et al, 2015). Uma vez que o colágeno é constituinte de tecidos como pele, cartilagens, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos, membrana basal, dentre outros, as collagenases são moléculas com a importante função biológica de remodelação de tecidos *in vivo* e desenvolvimento embrionário (PAIVA; GRANJEIRO, 2014; WOODE; SHIOMI; D'ARMIENTO, 2015). Biotecnologicamente as collagenases estão relacionadas ao processamento de carnes e couro, à produção de cosméticos e ao tratamento de feridas, cicatrizes e doenças fibrosas (PAL; SURESH, 2016).

Embora as collagenases possam ser encontradas em animais e plantas, os micro-organismos destacam-se como seus maiores produtores. Diversas espécies de bactérias (*Clostridium histolyticum*, *Bacillus stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptospira interrogans*, dentre outros) e fungos (*Penicillium aurantiogriseum*, *Rhizoctonia solani*, *Beauveria bassiana*, *Cladosporium cladosporioides*, *Candida parapsilosis* e *C. albicans*, dentre outros) são amplamente estudados para a obtenção de collagenases (HAMDY, 2008; LIMA et al, 2009; SURAPHATHARAPRATEEP et al, 2011; SAYED et al, 2012; JANWITTHAYANANA, et al, 2013; LIMA et al, 2014; ISRAEL-ROMING et al, 2015; GASTON et al, 2015; SHARKOVA et al, 2015). Entretanto há uma escassez de trabalhos investigando espécies de actinobactérias como

produtoras de proteases collagenolíticas, ficando restritos a poucas espécies (RIPPON; PECK, 1967; GOSHEV et al, 2005; SAKURAI et al, 2009; HATANAKA; KAWAKAMI; URAJI, 2014). O papel biológico das collagenases microbianas está ligado às necessidades fisiológicas do micro-organismo para colonização e nutrição (HARRINGTON, 1996).

Para a obtenção dessas enzimas, micro-organismos de ambientes pouco estudados estão sendo analisados como fontes alternativas de biomoléculas com características diferentes das disponíveis no mercado (SALEM et al, 2016; YADAV et al, 2015). Para tanto, as condições de cultivo do micro-organismo e as características físico-químicas destas enzimas são fatores de intenso estudo para otimizar a produção e o potencial catalítico dessas moléculas.

Assim, a prospecção de actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*, representa uma potencial fonte de proteases que podem ser usadas nos mais diversos setores industriais e podendo fornecer enzimas com alta especificidade e aplicabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Identificar a linhagem *Streptomyces* sp. isolada da rizosfera de *Licania rigida* Benth. e produzir e purificar proteases usando diversos substratos

2.2 Específicos:

Identificar a linhagem *Streptomyces* sp. através de características morfológicas, fisiológicas e técnicas de biologia molecular;

Avaliar a produção de proteases em cultivo submerso com diferentes substratos;

Produzir collagenase por linhagem de *Streptomyces* sp. através de cultivo submerso em meio contendo o substrato mais promissor;

Purificar a collagenase através de cromatografias de troca iônica e exclusão molecular;

Analisar os parâmetros físico-químicos da collagenase purificada quanto à temperatura, pH, inibidores enzimáticos e íons metálicos;

Determinar os valores das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da collagenase;

Determinar os parâmetros termodinâmicos de entalpia, entropia, energia de ativação e energia livre de Gibbs na ativação da collagenase purificada.

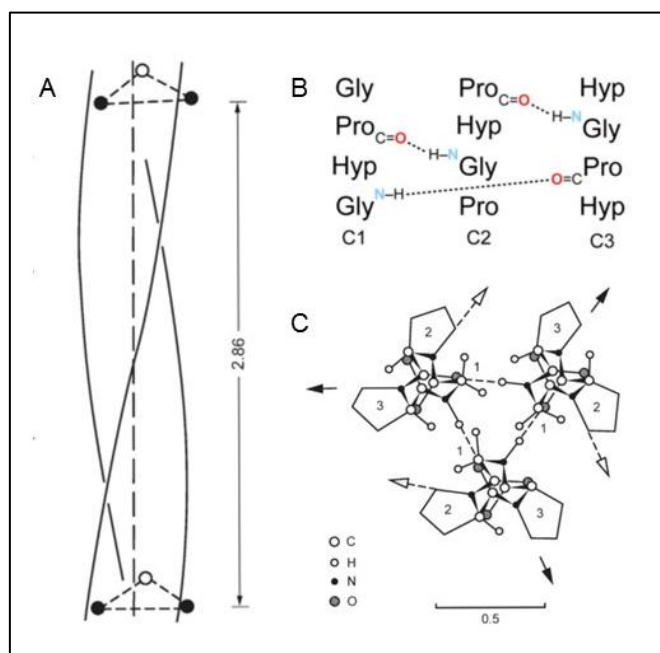
3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Colágeno

O colágeno corresponde a aproximadamente 30% das proteínas em mamíferos e sua superfamília possui ao menos 29 tipos diferentes de moléculas identificadas até o momento. A estrutura tridimensional do colágeno corresponde a uma tripla-hélice (Figura 1A) formada por três cadeias α polipeptídicas. Essas cadeias podem ser iguais (formando homotrímeros), ou diferentes (formando heterotrímeros). Elas têm em comum a sequência de aminoácidos –Gly-Xaa-Yaa–, onde Xaa e Yaa são frequentemente prolina e 4-hidroxi-prolina onde a presença de glicina a cada três aminoácidos estabiliza a tripla-hélice (FERRARO et al, 2017; RICARD-BLUM, 2011; SHOULDERS; RAINES, 2009). A estabilização de sua estrutura ocorre através de pontes de hidrogênio intra e inter-cadeias e através de pontes de hidrogênio mediadas por moléculas de água (USHARANI et al, 2014).

Figura 1 – Esquema representando a estrutura do colágeno. [A] Tripla-hélice formada por três cadeias α ; [B] Vista lateral da ligação entre Glicina e Prolina estabilizando as três cadeias. [C] Vista superior da ligação entre Glicina e Prolina estabilizando as três cadeias.



Fonte: [A] Engel; Bächinger (2005). [B] Shoulders; Raines (2009). [C] Engel; Bächinger (2005).

A diferenciação dos tipos de colágeno é relacionada à sequência de aminoácidos que formam a cadeia polipeptídica, bem como às diferenças estruturais nas três cadeias α . A tabela 1 mostra os tipos de colágeno mais comumente encontrados no homem.

Tabela 1 – Tipos de colágeno mais comuns no organismo.

Tipo de colágeno	Distribuição tecidual
I	Pele, ossos, tendões, vasos sanguíneos, córnea
II	Cartilagem, disco intervertebral, corpo vítreo
III	Vasos sanguíneos, pele fetal
IV	Membrana basal
VII	Abaixo do epitélio estratificado escamoso
IX	Cartilagem
XII	Tendões, ligamentos, alguns outros tecidos

Fonte: Adaptado de Harvey; Ferrier (2012)

A direção das voltas nas cadeias α (à esquerda) é oposta à direção das voltas na estrutura da tripla-hélice (à direita) e essas direções opostas favorecem a resistência da fibra do colágeno a tensão longitudinal. A união das moléculas de colágeno segue um padrão ordenado, sobreposto e paralelo para formar as fibrilas. Essas fibrilas, por fim, arrajam-se de forma diferente nos diversos tecidos. Os tendões são formados por feixes paralelos de fibrila, enquanto que a pele é formada por camadas de fibrilas em vários ângulos. Essa diferença na conformação é o que fornece as características do tecido (VOET; VOET, 2013; HARVEY; FERRIER, 2012).

A meia-vida das fibras de colágeno pode alcançar vários anos, entretanto elas podem sofrer ruptura por fatores externos como tensão ou lesões na pele. Adicionalmente, a estrutura do colágeno pode sofrer deformações causadas por doenças na síntese do colágeno relacionadas a mais de 1000 mutações genéticas, impossibilitando que o tecido tenha suas características normais de elasticidade e resistência, além de problemas vasculares e ósseos (HARVEY; FERRIER, 2012). O colágeno também é responsável pela firmeza da pele, resistência de ligamentos, adesão celular e regulação do crescimento celular, dentre outros (RICARD-BLUM, 2011).

Devido à sua estrutura, poucas enzimas possuem a capacidade de degradar o colágeno, requerendo a ação de um grupo específico de enzimas chamadas de collagenases. A degradação do colágeno está ligada a processos fisiológicos e patológicos. No homem, a degradação do colágeno está relacionada a processos naturais como o desenvolvimento embrionário, remodelação óssea e cicatrização. Essa degradação também é um fator importante na etiologia de patologias como lesões ósseas, doenças articulares, invasão tumoral, doenças pulmonares, tendinopatias e periodontite (WAHLGREN et al, 2001; CHAKRABARTI; PATEL, 2005; CUÉLLAR et al, 2016; ORFEI et al, 2016; SORSA et al, 2016; REMACLE et al, 2017). Para fins biotecnológicos, as collagenases são utilizadas no isolamento de células, cultivo celular, tratamento de doenças fibrosas e estudo de tecidos vegetais (FUJIO et al, 2014; GASTON et al, 2015; LUCZAK et al 2015; ALIPOUR et al, 2016; ZIEGELMANN et al 2016).

3.2 Proteases

As enzimas responsáveis pela degradação das proteínas são as proteases. Elas pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a quebra de ligações amida nas ligações peptídicas. Apesar de também serem chamadas de proteinases e peptidases, as proteinases degradam as proteínas, enquanto que as peptidases estão restritas aos fragmentos de proteínas ou peptídeos (CAMARGO et al, 2012; SAXENA, 2015).

Essas enzimas são agrupadas de acordo com a especificidade com o substrato, podendo clivar as extremidades C-terminal e N-terminal (exopeptidases) ou sequências dentro da cadeia polipeptídica (endopeptidases) como demonstrado na figura 2. A classificação das proteases pode ser feita, também, segundo a especificidade de sua cadeia lateral e da presença de grupo funcional no sítio ativo, agrupando-as em: serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases, treonino proteases, glutâmico proteases e metalo proteases (POLGÁR, 1989; BARRET, 1999; SAXENA, 2015).

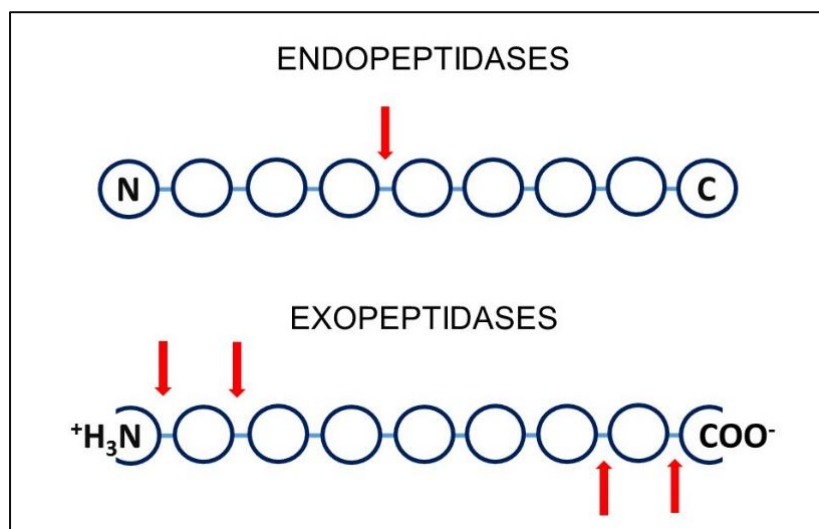


Figura 2 – Esquema do local de ação das proteases nas cadeias polipeptídicas.

Fonte: Adaptado de McDonald (1985).

Nas proteases do tipo serino, treonino e cisteíno a clivagem de ligações peptídicas ocorre através da cadeia lateral nucleofílica de um aminoácido. Por sua vez, as proteases do tipo aspartil, glutâmico e metalo atuam nas ligações peptídicas através de uma molécula de água ativada. As aspartil proteases possuem resíduos de aspartato como ligantes de moléculas de água ativadas, enquanto resíduos de glutamina são os ligantes das glutâmico proteases. Todas as enzimas aspartil e glutâmico proteases são endopeptidases. Nas metalo proteases o ligante normalmente é um íon divalente ancorado por aminoácidos (zinco, cobalto, manganês, níquel ou cobre). As cisteíno proteases atuam nas ligações peptídicas através dos grupos sulfidril de resíduos de cisteína, enquanto as serino proteases dependem de um grupo hidroxil de resíduos de serina. Esses dois tipos possuem mecanismo catalítico similar, onde um nucleófilo e um doador de prótons são requeridos (RAWLINGS; BARRETT, 2013a-d).

Nos organismos vivos, as proteases estão relacionadas a processos regulatórios, regulando a localização e atividade de outras proteínas, criando novas moléculas bioativas, contribuindo para o processamento da informação celular e gerando, transduzindo e amplificando os sinais moleculares. Porém, também são responsáveis por uma variedade de condições patológicas, como o câncer, desordens neurodegenerativas e cardiopatias (POLGÁR, 1989; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; LEBEAU; CRAIK, 2012).

Na indústria, as proteases são utilizadas em diversos processos tecnológicos como processamento de alimentos (atuando na clarificação de sucos e fermentação de bebidas e pães), papel (separando a celulose da lignina no processo de preparação da polpa), tecidos (no tratamento de lãs), formulação de detergentes (auxiliando a remoção de manchas), além de ter um importante papel no setor farmacêutico (SANDRI et al, 2013; PAUL et al, 2014; FONSECA et al, 2014; ZHANG; WANG, 2015). No Brasil¹, de janeiro a outubro de 2015, as proteases foram responsáveis por um total de US\$14,9 mi em exportações (COPELAND, 2004; CAMPBELL; FARREL, 2011; SAXENA, 2015; MDIC, 2015).

3.3 Colagenases e Proteases Colagenolíticas

Dentre as proteases, o grupo das colagenases possui a capacidade de degradar o colágeno nativo. Essas enzimas podem ser agrupadas em metaloproteases da matriz de mamíferos (MMPs), cisteíno proteases de mamíferos e algumas proteases bacterianas (ZHANG et al, 2015; DUARTE; CORREIA; ESTEVES, 2014).

As metalocolagenases são enzimas que com zinco-dependência encontradas em mamíferos e bactérias. Elas são denominadas como “colagenases verdadeiras” e têm a capacidade de degradar a forma em tripla hélice do colágeno insolúvel. As demais proteases colagenolíticas (serinocolagenases) clivam apenas a estrutura desnaturada do colágeno solúvel (ZHANG et al, 2015).

A dupla nomenclatura das colagenases (“colagenases verdadeiras” e “proteases colagenolíticas”) causa confusão dentre os cientistas, como demonstrado por Duarte e colaboradores (2014), onde o termo “colagenase” tem sido utilizado para denominar proteases cuja atividade proteolítica ocorre em condições físicas favoráveis à desnaturação proteica do colágeno. Para a definição do tipo de colagenase, análises utilizando inibidores enzimáticos específicos para cada grupo de enzima são realizadas, determinando assim, se a colagenase pertence ao grupo das metaloproteases ou das serinoproteases (PETROVA; SHISHKOV; VLAHOV, 2006; SAKURAI et al, 2009; RASKOVIC et al, 2014).

As colagenases pertencentes ao grupo das serino proteases normalmente possuem menor massa molar, enquanto as metalo proteases são maiores. As colagenases microbianas possuem uma

¹ Dados obtidos na base de dados AliceWeb2 através de pesquisa com código-chave 35079029 – outras proteases e seus concentrados.

grande diversidade de moléculas, desde enzimas de 24 a 150 kDa (WATANABE, 2004; DABOOR et al, 2010). Um caso excepcional foi relatado por Okamoto et al (2001), onde foi isolada uma serinocolagenase de *Bacillus* sp. (linhagem MO-1) com massa molar de 210 kDa, possuindo duas subunidades de 105 kDa.

Colagenases podem ter diversas funções, apresentando-se como: (1) Fatores de virulência (a habilidade de degradar o colágeno possibilita a invasão no tecido de hospedeiros, sendo um importante fator na etiologia das doenças); (2) Ferramentas biotecnológicas (no amaciamento de carne, curtimento de couro e obtenção de peptídeos bioativos a partir da degradação do colágeno), e; (3) Medicamentos (a colagenase proveniente de *Vibrio proteolyticus* ATCC 53599 é usada no tratamento tópico de feridas como escaras, que são compostas de proteínas desnaturadas como o colágeno, elastina, fibrina, hemoglobina e proteínas coaguladas, além de possuir efeito imuno estimulador e ser utilizada em tratamentos de cicatrização de feridas e na doença de Dupuytren, como alternativa ao uso de métodos invasivos, como cirurgias) (HARRINGTON, 1996; DABOOR et al, 2010; KASSENE et al, 2014; SINGH; BHATTACHARYYA, 2014; LIMA et al, 2014; PROKSCH et al, 2014; LIU et al, 2014; ONESTI et al, 2015; GASTON et al, 2015; SAXENA, 2015).

3.4 Micro-organismos produtores de colagenases

Colagenases são produzidas por diversos organismos desde nematódeos, peixes, mamíferos e plantas, mas grande parte dos estudos concentra-se nas enzimas produzidas pelos micro-organismos (MALAGÓN et al, 2010; DABOOR et al, 2012; RASKOVIC et al, 2014; QUILLARD et al, 2014).

No ano de 1974, Strauch fez um levantamento de micro-organismos produtores de colagenases, encontrando a enzima em espécies de bactérias (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium integumentum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium septicum*, *Clostridium chauvoei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas marinoglutinose*, *Staphylococcus aureus*, *Bacterioides melaninogenicus*, *Serratia marcescens*, *Achromobacteriophagus*, *Aeromonas*), actinobactérias (*Mycobacterium tuberculosis* e *Streptomyces madurae*) e em fungos (*Trychophyton schoenleinii*).

Atualmente o estudo de colagenases a partir de bactérias e fungos revela uma maior gama de espécies produtoras, com alguns representantes descritos na tabela 2. Isso se deve ao aumento na

quantidade de trabalhos de prospecção em ambientes pouco estudados, além da busca por novos micro-organismos produtores de enzimas com potencial biotecnológico.

Tabela 2 – Levantamento de alguns micro-organismos produtores de enzimas colagenolíticas.

Organismo	Atividade (U/ml)	PM (kDa)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Referências
<i>Candida parapsilosis</i>	44,00	97,20	40	8	Sayed et al, 2012
<i>Candida krusei</i>	30,00	66,40	40	8	Sayed et al, 2012
<i>Candida albicans</i>	7,06	N.I.	45	8,2	Lima et al, 2009
<i>Rhizoctonia solani</i>	212,33	66,00	40	5	Hamdy, 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	14,56	N.I	37	8	Balan et al, 2013
<i>Aspergillus ustus</i> 1	0,12	N.I.	N.I.	N.I.	Sharkova et al, 2015
<i>Beauveria bassiana</i> 2	0,29	N.I.	N.I.	N.I.	Sharkova et al, 2015
<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1	0,18	N.I.	N.I.	N.I.	Sharkova et al, 2015
<i>Bacillus cereus</i> CNA1	23,07	N.I.	45	7	Suphatharapratee; Cheirsilp; Jongjareonrak, 2011
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CNL3	10,53	N.I.	40	6	Suphatharapratee; Cheirsilp; Jongjareonrak, 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. SUK	7,19	N.I.	N.I	N.I.	Bhagwat; Jhample; Dandge, 2015
<i>Streptomyces</i> sp. C-51	3.780,00	100,00	35-40	8-9	Endo et al, 1987
<i>Streptomyces exfoliatus</i> CFS 1068	54,85	14,50	70	7	Jain; Jain, 2010
<i>Microbispora</i> sp. (A-35)	16,69	N.I.	N.I.	N.I.	Goshev et al, 2005

<i>Thermoactinomyces</i> sp. (E-15)	19,44	N.I.	N.I.	N.I.	Goshev et al, 2005
-------------------------------------	-------	------	------	------	--------------------

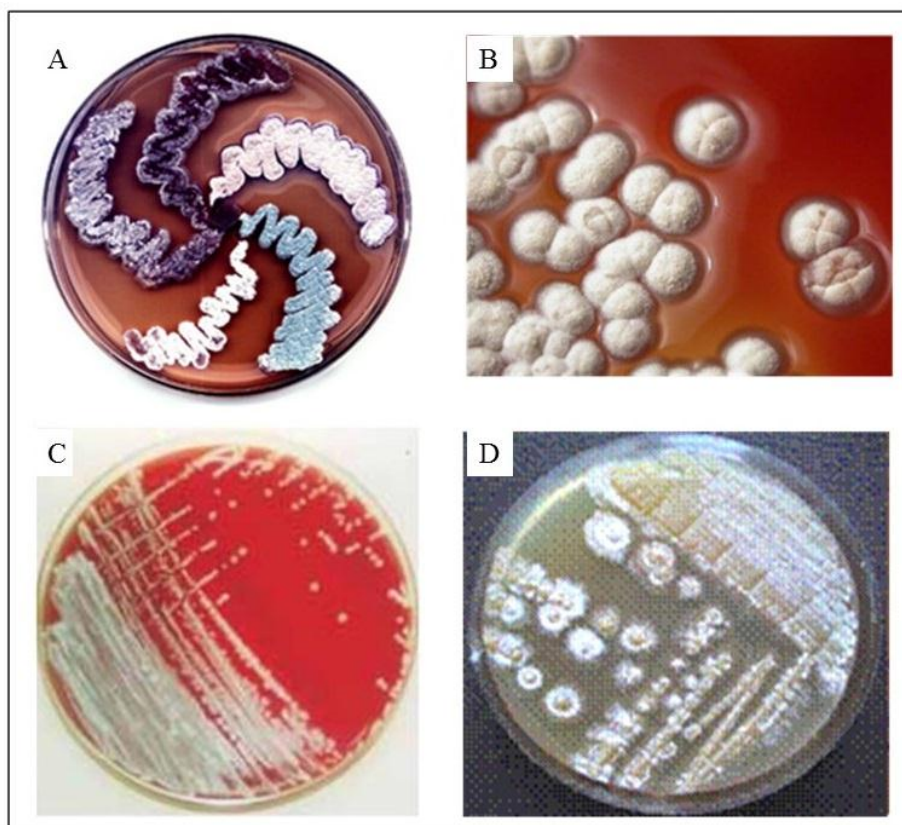
PM = peso molecular
N.I. = Não informado

Embora existam muitos estudos objetivando a descoberta de novas fontes microbianas para obtenção de collagenases, apresenta-se uma escassez de informações recentes sobre actinobactérias produtoras dessas enzimas.

3.5 Actinobactérias

Actinobactérias formam sua própria subdivisão no grupo das bactérias Gram-positivas. Suas principais características são o desenvolvimento de micélios durante seu crescimento e presença de cadeias de esporos, que são utilizadas para a identificação das diversas espécies (Figura 3). Por seu aspecto macro- e micro- morfológico, esses micro-organismos foram, por muito tempo, catalogados como fungos (MADIGAN et al, 2012).

Figura 3 – Diversidade de macromorfologia de actinobactérias. [A] *Streptomyces* sp.; [B] *Actinomadura meyeræ*; [C] *Nocardia asteroides*, e; [D] *Nocardiopsis iraniensis*.



Fonte: [A] <http://scienceblogs.com/digitalbio/2007/12/24/whats-that-smell/>. [B] Bonnet et al, (2011). [C] Rodrigues et al (2009). [D] Hamed et al (2007)

Estas bactérias são conhecidas por seu grande potencial na produção de metabólitos e para melhor explorar seu potencial biotecnológico, novas tecnologias e a prospecção de diferentes ambientes para isolamento de novas espécies de actinobactérias estão sendo empregadas (GENILLOUD et al, 2011; VALLI et al, 2012, ABDELMOHSEN et al, 2015).

Embora diversos gêneros de actinobactérias tenham importância na área da ecologia (*Arthrobacter*), alimentos (*Propionibacterium*) e na saúde, no papel de patógenos (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*) e como produtores de antibióticos (*Micromonosporaceae*, *Actinoplanes*), o principal gênero é o *Streptomyces*, responsável pela maioria dos metabólitos produzidos pelas actinobactérias e utilizados biotecnologicamente (MADIGAN et al, 2012; TIWARI; GUPTA, 2012).

3.5.1 *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertence à ordem Streptomycetales, família Streptomycetaceae. O Bergey's Manual of Systematic Bacteriology lista mais de 550 espécies de *Streptomyces*, sendo o mais numeroso gênero no grupo das actinobactérias (LUDWIG et al, 2012). Os representantes desse gênero são bactérias aeróbias, Gram-positivas formadores de micélio que raramente se fragmenta e podem produzir pigmentos solúveis. Seu crescimento ocorre entre 25-35 °C, embora haja espécies psicrófilas e termófilas. Seu crescimento é favorecido em pH entre 6,5 e 8,0 e apresentam poucas espécies patogênicas a animais e ao homem (KÄMPFER, 2012).

O isolamento de espécies do gênero *Streptomyces* é uma técnica bastante utilizada para obtenção de espécies com potencial biotecnológico, podendo ser obtidos de amostra de solo marinho, água do mar, camarões, amostra de solo florestais, tubérculos de batata, fontes termais e rizosfera, entre outros (KHATTAB; BABIKER; SAEED, 2016; RASHAD et al, 2015; EVANGELISTA-MARTÍNEZ, 2013; FYANS; BOWN; BIGNELL, 2013; YAMAMURA et al, 2014)

A produção de diversas moléculas com aplicação biotecnológica é uma característica do gênero *Streptomyces*. Sua principal utilização é na produção de compostos antimicrobianos,

entretanto há relatos linhagens utilizadas na produção de enzimas para aplicação em biorremediação de efluentes, biocontrole de pragas, fabricação de papel e fabricação de alimentos (PILLAI; GIRISH; AGSAR, 2014; AWAD et al, 2014; CHENG et al, 2014; XU et al, 2016).

Embora na literatura haja relato de algumas espécies de *Streptomyces* como produtoras de collagenase, podendo citar *S. parvulus*, *S. omiyaensis*, *S. exfoliatus*, *S. phaeopurpureus* e *Streptomyces* sp. (PETROVA; DEREKOVA; VLAHOV, 2006; UESUGI et al, 2008; SAKURAI et al, 2009; JAIN; JAIN, 2010; PALANIYANDI et al, 2013), a quantidade de espécies analisadas é muito inferior à quantidade de espécies existentes relatadas, evidenciando a necessidade de maiores estudos para prospecção de linhagens de *Streptomyces* produtoras de collagenases.

3.6 Purificação de Collagenase Microbianas

Para que as enzimas produzidas por micro-organismos sejam utilizadas em diversos setores biotecnológicos, elas precisam passar por um processo de purificação para retirada de moléculas contaminantes provenientes do metabolismo microbiano que se apresentam em maior quantidade que a molécula alvo. Na purificação de proteínas a amostra pode submetida a vários processos os quais visam a separação das moléculas presentes no extrato bruto de acordo com suas características físico-químicas (LEE, 2017).

Uma grande diversidade de técnicas e etapas de purificação de collagenases microbianas são listadas na tabela 3 e 4. Essa variedade de processos de purificação sugere a existência de várias moléculas com características diferentes, entretanto, como discutido por Pal e Suresh (2016) esse grande número de procedimentos diferentes dificulta a determinação da quantidade de collagenases microbianas existentes atualmente. Quanto mais etapas necessárias para a purificação, mais dispendioso torna-se o processo, no entanto, collagenases utilizadas em processamento de alimentos e na indústria de couro não necessitam enzimas altamente purificadas (PAL; SURESH, 2016).

Um dos primeiros passos realizados na purificação de collagenases é a concentração das proteínas através de precipitação, fracionamento e centrifugação da amostra para separação das moléculas contaminantes e da enzima alvo, como demonstrado nas tabelas 3 e 4.

A solubilidade da molécula é um importante fator na escolha do método de separação das enzimas, sendo influenciada pela distribuição de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na superfície

das proteínas (que determina sua solubilidade em diferentes solventes), e pela carga elétrica da proteína e seus outros grupos polares (SCOPES, 1994).

Tabela 3 – Métodos de purificação de collagenases bacterianas.

Micro-organismo	TC	Etapas de purificação	F	Referência
BACTÉRIAS				
<i>Bacillus subtilis</i> FS-2	S	Ultrafiltração DEAE Sepharose-CL-6B CM-Cellulose butyl-Toyopearl 650M Sephadex-G75	16,5	Nagano & To, 1999
<i>α-proteobacterium</i> NW4327	N.I	Ultrafiltração (50kDa) Superdex G200 Resource Q Superdex 200 HR	21	Mukherjee; Webster; Llewellyn, 2009
<i>Bacillus licheniformis</i> F11.4	M	Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ 50% DEAE-Sephadex A-50	26,3	Baehaki et al, 2012
ACTINOBACTÉRIAS				
<i>Streptomyces</i> sp. 3B	M	Ultrafiltração (10, 30, 50 kDa) (NH ₄) ₂ SO ₄ 70% DEAE-Sephadex G-25 MonoQ PolyanionSi TM Superose 12	43,1	Petrova; Derekova; Vlahov, 2006
<i>Streptomyces parvulus</i> subsp. <i>citrinus</i>	M	(NH ₄) ₂ SO ₄ Q-Sepharose Sephacryl S-200 butyl-Toyopearl	95,7	Sakurai et al, 2009

<i>Streptomyces omiyaensis</i>	S	(NH ₄) ₂ SO ₄ 70% Vivapure S Mono S HR5/5	99,3	Uesugi et al, 2008
------------------------------------	---	---	------	--------------------

TC = Tipo de Colagenase; F = Fator de purificação ao final das etapas; N.I = Não informado; M = metaloprotease;
S = Serinoprotease

Tabela 4 – Métodos de purificação de colagenases fúngicas.

Micro-organismo	TC	Etapas de purificação	F	Referência
FUNGOS FILAMENTOSOS				
<i>Rhizoctonia solani</i>	M	(NH ₄) ₂ SO ₄ 40% Sephadex G25 DEAE-Cellulose Sephadex G150	18,7	Hamdy, 2008
<i>Penicillium</i>				
<i>aurantiogriseum</i> URM4622	N.I	SDFA – PEG-fosfato	5,23	Lima et al, 2013
<i>Penicillium</i>				
<i>aurantiogriseum</i> URM4622	N.I	SDFA – PEG-fosfato	23,5	Rosso et al, 2012
LEVEDURA				
<i>Candida parapsilosis</i>	S	(NH ₄) ₂ SO ₄ 80%	5,5	Sayed et al, 2012
<i>Candida</i>	S	DEAE-Cellulose	5,2	
<i>krusei</i>		Sephadex G100		

TC = Tipo de Colagenase; F = Fator de purificação ao final das etapas; N.I = Não informado; M = metaloprotease;
S = Serinoprotease; SDFA = Sistema de Duas Fases Aquosas

Dependendo das propriedades químicas da proteína a ser purificada, pode ser aplicada a metodologia de precipitação salina ou com solventes orgânicos, sendo escolhida a metodologia que é mais adequada à proteína alvo (SOARES et al, 2011; CROWELL; WALL; DOUCETTE, 2013).

A maioria das enzimas é solúvel em baixas concentrações de sal (como observado no meio fisiológico) e o aumento da concentração de sais “sequestra” moléculas de água, pela ligação de seus íons com a água, expondo os grupos hidrofóbicos da proteína e permitindo-lhes formar agregados com outras proteínas e, assim, serem separadas após centrifugação (SCOPES, 1994). Por outro lado, etanol e acetona são amplamente utilizados para precipitação proteica, entretanto, através de análises estruturais observa-se que as moléculas sofrem mudança na conformação de sua estrutura secundária e terciária (YOSHIKAWA et al, 2012).

Passos adicionais são normalmente utilizados para a purificação enzimática, sendo um dos mais importantes a cromatografia. Existem diversas técnicas cromatográficas que podem ser aplicadas na purificação de moléculas, e em todas elas a amostra a ser purificada é solubilizada num fluido líquido ou gasoso conhecido como “fase móvel” e é percolada através de uma “fase estacionária”, composta de material poroso responsável pela separação. A forma que cada um dos solutos reage com a fase estacionária retarda seu fluxo e permite a separação dos componentes da amostra (VOET; VOET, 2013).

A cromatografia de troca iônica utiliza resinas eletricamente carregadas (aniônicas ou catiônicas) e tampões de diferentes forças iônicas competem com as moléculas adsorvidas pela interação com a fase estacionária (WALLS; COONEY; LOUGHRAN, 2017). Modificação da composição e/ou concentração da fase móvel, proporciona a separação de diferentes moléculas de acordo com suas diversas características químicas (SCOPES, 1994).

Já a cromatografia líquida de rápida performance - FPLC (ou cromatografia líquida rápida de proteínas) usa um sistema completamente automatizado e o material da coluna é feito de superfícies inertes que suportam pressão acima de 700psi. As resinas usadas na cromatografia líquida rápida de proteínas possuem diferentes características, permitindo separar as amostras por tamanho, carga, hidrofobicidade, dessalinização, fase reversa e afinidade. Ao contrário da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC – as colunas usadas em FPLC suportam uma maior quantidade de proteína, além de ser uma metodologia de menor custo e possuir biocompatibilidade, por não usar solventes orgânicos na eluição (MANDADLOU; O’SULLIVAN; SHEEHAN, 2011; BISEN; SHARMA, 2012).

A cromatografia por FPLC é um processo bastante desenvolvido na purificação de proteínas e outras moléculas por ser totalmente automatizado, extremamente sensível e fornecer análise informatizada dos dados obtidos através de sistema de computador acoplado ao equipamento,

sendo, junto à cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC, a etapa mais utilizada para obter proteínas puras para análises e comercialização.

**4 ARTIGO 1 - ENZYMATIC PROSPECTION OF THE STRAIN *Streptomyces antibioticus*
UFPEDA3421 ISOLATED FROM CAATINGA SOIL USING AGROINDUSTRIAL
RESIDUES**

Possível publicação: Archives of Microbiology

Fator de impacto: 1,760

Qualis: B2

ENZYMATIC PROSPECTION OF THE STRAIN *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 ISOLATED FROM CAATINGA SOIL USING AGROINDUSTRIAL RESIDUES.

Elizianne Pereira Costa¹; Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa²; Gláucia Manoella de Souza Lima³; Amanda Emanuelle Sales²; Janete Magali de Araújo³; Ana Lúcia Figueiredo Porto²

1 Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

2 Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil

3 Department of Antibiotics, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

*Author for correspondence:

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife, PE, Brazil.

Tel: +55.81.3320.6345

Fax: +55.81. 3320.6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

ABSTRACT

Hydrolases are enzymes participating in biotechnological processes including pharmaceutical, textile and food sectors, and obtained from microorganisms. The prospection of new microbial sources of enzymes enables the discovery of more potent and stable molecules for industrial use. The aim of this study was identify the strain *Streptomyces* sp. isolated from *Licania rigida* Benth rhizosphere in Caatinga soil and to analyze the production of proteases in different substrates. The strain was identified by morphological, biochemical and molecular techniques, followed by culture

in liquid culture media containing soybean meal, wheat bran, gelatin, coffee powder residue or chicken feather, for the production of proteases, keratinases, milk-clotting proteases and fibrinolytic proteases, followed by ion-exchange chromatography analysis of the crude enzymatic extracts. The strain was identified as *Streptomyces antibioticus* showing the highest enzymatic activities for protease (46.62 U/mL), collagenase (377.50 U/mL) and keratinase (32.96 U/mL), in media formulated with soybean flour, coffee powder residue and chicken feather, respectively. The chromatographic analysis showed an enzymatic pool obtained in the non-adsorbed fraction, with presence of all proteases analyzed, regardless the substrate used in fermentation. The results show *S. antibioticus* UFPEDA3421 strain as a potential producer of enzymes for biotechnological purposes.

Keywords: Polyphase identification; Enzymes; *Streptomyces antibioticus*; Caatinga soil

INTRODUCTION

Enzymes are molecules produced by living organisms that catalyze biochemical reactions, participating in about 150 industrial processes (GURUNG et al, 2013; ADRIO; DEMAINE, 2014). The most of these molecules are hydrolases, a group that include enzymes used in biofuel production, food processing and medicine, such as cellulases, tannases and collagenases (DUTTA; WU, 2014; MADEIRA JR et al, 2015; ALIPOUR et al, 2016). Among the hydrolases enzymes, proteases are the most important group and cleave peptide bonds resulting in the release of amino acids or peptides. These enzymes are present in almost all organisms and are related to the maintenance of normal metabolic pathways (RAWLINGS, 2013). In industry, several proteases are used in different sectors. Proteases are used in the production of detergents (HAMMAMI et al, 2017), milk-clotting proteases are applied in food processing (LEMES et al, 2016), keratinases are used in leather industry (ZHANG et al, 2015) and collagenases are used in medicine (WARWICK et al, 2016).

One of the main sources in the search for new enzymes with industrial application are the microorganisms due to metabolic factors that allow them a fast growth, possibility of genetic manipulation and high rate of metabolite recovery with low costs for maintenance and nutrition, when compared to the maintenance of plants and animals (SAXENA, 2015). Most of the industrial enzymes used are produced by bacteria (NIGAM, 2013), however, many studies are performed with filamentous fungi, yeast and actinobacteria.

Among these microorganisms, actinobacteria can be isolated from diverse aquatic and terrestrial environments, where their isolation of rhizospheric soils is highlighted. The interaction with plants provides a diverse environment for the growth of different microorganisms adapted to soil characteristics and to the diversity of metabolites secreted by plants (TEWARI; ARORA, 2013). The Caatinga, an exclusively Brazilian biome, has characteristics such as semi-arid climate, low precipitation and acid soil with low organic matter (GOTO et al, 2009). The species of plant influences the biochemical properties and microbiota of soil (BOUDIAF et al, 2013; van der PUTTEN, et al, 2013), thus the existence of endemic plant species in Caatinga biome is a source of microorganisms with potential for the production of biocomposites, such as antimicrobials and enzymes.

The prospection of biodiversity and different environments has attracted the attention of scientists because of their importance in maintaining the environment and as a source of new biomolecules that can participate in industrial processes (VOGET et al, 2003; SWAMINATHAN, 2003; LI et al, 2012; LIMA et al, 2014). Therefore, the objective of this work was to identify the strain *Streptomyces* sp. isolated from the rhizospheric Caatinga soil and to evaluate its potential as a source of enzymes of biotechnological importance.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

The *Streptomyces* sp. strain was previously isolated from *Licania rigida* (Benth) rhizosphere and stored in mineral oil. After identification the isolate was kept in the Culture Collection of the Department of Antibiotics (UFPEDA) of Federal University of Pernambuco, Brazil. For the analyzes the lineage was maintained under refrigeration with periodic cultures in modified Czapek medium (MC) as described by Nonomura and Ohara (1971).

Polyphase Identification of actinomycete strain

Morphological and physiological characterization

The characteristics of the strain were analyzed according to morphological and physiological characteristics described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KÄMPFER, 2012). The determination of macromorphological phenotypic characteristics (aerial and vegetative mycelium

growth, aerial mycelium coloration, colony coloration, melanin production) and micromorphological characteristics (spore chain arrangement) was carried out in Yeast Extract-Malt Extract Agar (ISP-2), Oatmeal Agar (ISP-3), Inorganic Salts-Starch Agar (ISP-4), Glycerol Asparagine Agar (ISP-5), Peptone Yeast Extract Iron Agar (ISP-6), Tyrosine Agar (ISP-7) and modified Czapek Medium (MC). The cultivation was carried out for 7 days at 37 °C. Visualization of the microscopic structures uses the methodology described by Shirling and Gottlieb (1966).

The influence of different carbon sources was analyzed by growth in solid medium containing D-Glucose, D-Fructose, L-Arabinose, Raffinose, L-Rhamnose, Sucrose, D-Xylose or D-Mannitol. All sugars were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ISP-2 medium was used as the medium base for growth for 8 days at 37 °C.

Molecular identification by 16S rRNA gene analysis

Streptomyces sp. was grown in liquid ISP-2 medium under constant stirring in orbital shaker at 150rpm for 48 h at 37 °C, followed by centrifugation for separation of the cells and washed twice in saline solution (0.9% NaCl). The bacterial DNA was extracted through the HiPurA™ Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Himedia), following the manufacturer's instructions. Agarose gel electrophoresis was performed to confirm the extraction of the genetic material. The polymerase chain reaction technique was used to amplify the 16S rRNA gene by mixing 50ng of DNA, 5 pmol of the primers for Eubacteria fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3') described by Weisburg et al. (1991), 200 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X buffer, 1 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies) to perform 25 µl of final solution. The reactions occurred for 5 min with denaturation at 94 °C; followed by 25 cycles of 1 min at 94 °C, 30s at 52 °C and 2 min at 72 °C, final extension of 10 min at 72 °C. The amplified product was subjected to agarose gel electrophoresis (1.2%), visualized by transillumination and subsequently sequenced by Macrogen (Seoul, Korea). The sequence obtained was analyzed with Blast software from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) and aligned with Clustal software. The phylogenetic tree was constructed using Mega 7.0 software.

Enzyme production

The enzymes were obtained by submerged fermentation of the isolate *Streptomyces* sp. in modified soybean meal medium – MS-2 – described by Porto (1996) composed by protein extract of soybean flour (1,0%), NH₄Cl (0.1%), MgSO₄·7H₂O (0.06%), K₂HPO₄ (0.475%), glucose (1,0%),

e mineral solution (0,1%). The protein extract used in the composition of the MS2 medium was obtained by prior autoclaving of the soybean meal in distilled water and filtration in Whatman n.1 filter. The influence of the substrate on the production of enzymes was analyzed by replacing the soybean meal with coffee powder residue extract (1% w/v), soybean meal extract (1% w/v), wheat bran extract (1% w/v), gelatin (1% w/v), and chicken feathers (0.5% w/v).

The strain was grown in MC medium for 120 h at 37 °C to obtain the spores. A cell suspension was performed in Tween 80 solution (0.1% v/v) and a 1 mL aliquot ($OD_{625\text{ nm}} \approx 0.100$) was inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of modified MS2 medium with the different substrates. Growth occurred on an orbital shaker at 150 rpm at 37 °C for 120 h followed by filtration of the fermented liquid in Whatman n.1 filter and the cell free liquid was considered as an enzymatic extract and used for protein quantification and different enzymatic activities.

Partial purification of the crude extract enzymatic

Initially, 30 mL of each enzyme extract was precipitated with ammonium sulfate (80% saturation) for 4 h under refrigeration and centrifuged for 10 min at 14,000 x g. The pellet was suspended in 2 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and dialyzed three times against the same buffer.

The dialyzed sample was then applied in DEAE-Sephadex HiTrap QFF ion exchange chromatography (1 mL) previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a 1 mL/min flow rate and eluted in the same buffer at different concentrations of NaCl (0, 0.3 and 0.6 M) at the same flow rate and monitored at 215 nm and 280 nm. The fractions corresponding to the protein peaks were dialyzed, pooled and analyzed for the enzymatic activity described below.

Protein quantification

The proteins present in the enzyme extract were quantified according to the methodology of Smith et al. (1985) using a protein determination kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) with different concentrations (100 – 2000 µg/ml) of bovine albumin as standard.

Enzymatic assays

Protease activity was determined as described by Ginther (1979) using azocasein (1% w/v) as substrate. For the enzymatic reaction 0,15 mL crude extract was mixed to 0,25 mL azocasein solution and incubated at room temperature for 1 h. The reaction was stopped by addition of 1 mL of Trichloroacetic Acid (TCA, 10% w/v), and centrifuged at 15.130 x g for 20 min. An aliquot of 0.2 mL of the supernatant was added to 0.8 mL of 1.8 N NaOH and measured at 420 nm. The blank tube was prepared with distilled water under same conditions. One unit of enzyme activity (U) is the amount of enzyme required to produce an increase of 0.1 in the absorbance.

Collagenolytic activity was determined using azo dye-impregnated (azocoll) as substrate according to Chavira et al (1984) with some modifications. The reaction mixture contained 0.05 mL of the crude extract, 5 mg of azocoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 0.95 mL of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) added by 1 mM CaCl_2 . The reaction was carried out during 1 h at 37 °C under constant agitation and was stopped by cooling in ice bath. Tubes were centrifuged at 15,130 x g for 15 min and had their absorbance measured at 520 nm. The blank tube was prepared with distilled water under same conditions. One unit of enzyme activity (U) is the amount of enzyme required to produce an increase of 0.1 in the absorbance.

Fibrinolytic activity was measured using a fibrin degradation assay according to Wang et al (2011). Initially, the reaction occurred incubating 0.4 mL of fibrinogen solution (0.72% w/v) and 0.1 mL of 245 mM phosphate buffer (pH 7.0) for 5 min at 37 °C followed by adding 0.1 mL of thrombin (20 U/mL) for 10 min at 37 °C. Then 0.1 mL of the sample was added, and incubation continued at 37 °C. At 60 min, 0.7 mL of 0.2 M TCA (Trichloroacetic Acid) was added, and mixed. The mixture was centrifuged at 15,000 x g for 10 min and supernatant was measured at 275 nm. One unit of fibrin degradation activity (U) was defined as the amount of enzyme increasing 0.01 per minute at the optical density at 275nm.

The keratinolytic activity was described by Anbu et al. (2007), mixing 20 mg of chicken feathers (previously washed in distilled water and dried) with 3.8 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.2) and 0.2 mL of sample. The reaction occurred for 1 h at 37 °C in a water bath and stopped with ice bath, followed by quantification at 280 nm. A unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that increases 0.01 in optical density in 1 hour of reaction.

The production of milk coagulant protease was performed according to Arima et al (1970) in reconstituted skim milk solution (10% w/v) added of CaCl_2 (0.01M). The reaction mixture was composed of 5 mL of milk and 0.5 mL of the sample, incubated at 37 °C with gentle manual shaking. Coagulation time, in seconds, was defined visually by the appearance of the first clots. A

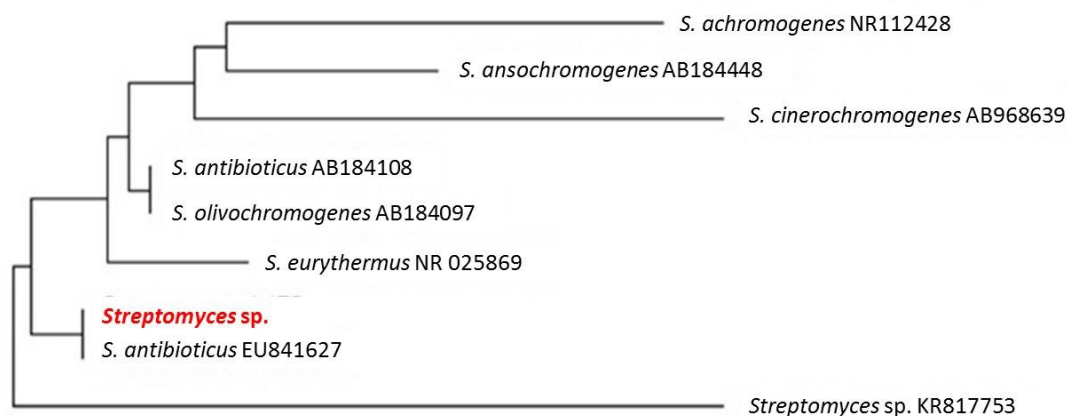
unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that coagulates 1 mL of the skim milk solution under the conditions of the enzymatic reaction. For the calculation of the enzymatic activity was used the formula $1U = 2400 \times t \times 0,5$ where t is the coagulation time of the sample, in seconds.

RESULTS AND DISCUSSION

The morphological and physiological analysis of the characteristics is the basis for the identification of most bacterial species. However, the actinobacteria group has peculiar characteristics that separate them from other bacteria, such as the production of aerial mycelium and spores (MADIGAN et al, 2012). The *Streptomyces* sp. strain has morphological characteristics of actinobacteria group, with vegetative mycelium growth adhering to the substrate and beginning of sporulation after 3 days of cultivation. The growth of these colonies revealed white vegetative mycelium and spores with gray coloration including presence of melanoid pigments when cultured in ISP-7 medium. Microscopic analysis showed the presence of smooth surface spores, organized into straight-flexible chains composed by 6 to 10 spores.

The physiological characterization indicated that the strain has the ability to use all sugars analyzed, presenting strong growth with spore production. Although the morphological and physiological characteristics are important in understanding the biology of the species, the genetic analysis of 16S rRNA gene allows the analysis of the natural evolutionary relationships of these organisms (GOODFELLOW, 2012). The sequencing of the strain allowed its identification as belonging to the specie *Streptomyces antibioticus*, as demonstrated in the taxonomic tree showed in Figure 1. *S. antibioticus* was incorporated at the Culture Collection of the Department of Antibiotics (UFPEDA) of Federal University of Pernambuco, with UFPEDA3421 numeration.

Figure 1 – Taxonomy of the *Streptomyces* sp. strain based on the sequencing of 16S rRNA gene within the genus *Streptomyces*.



The strain *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 showed good growth, adapting to the culture media, regardless of substrate used, including the substrates with nitrogen source is difficult to degradation, as the chicken feather. Variations in the growth conditions and in the nutrients availability induce the use of different metabolic pathways by microorganisms, with possible activation or inactivation of genes responsible for produce several interesting molecules (ZARINS-TUTT et al, 2016). Actinomycetes, especially the genus *Streptomyces*, is known to have the ability to degrade various substrates and agroindustrial residues for growth and production of enzymes with biotechnological interest (AOYAMA et al., 2014; MANDER et al., 2014; FRANCO-CIRIGLIANO et al., 2013). As shown in Table 1, all the substrates were favorable to protease production. The proteases and collagenolytic enzymes showed the highest production, especially in culture media containing soy bean flour and coffee powder residue, respectively. On the other hand, the clotting milk proteases has the lowest production between the enzymes analyzed. Collagen and keratin, present in gelatin and chicken feathers, respectively, are proteins that are not degraded by most common proteases, requiring specific groups of enzymes (collagenases and keratinases) for their degradation (LANGE et al, 2016; ZHANG et al., 2015).

Table 1 – Enzymatic activities of the crude extracts of *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 grown in MS2 medium modified with different substrates.

Substrates	Protein (mg/ml)	A _{Pro} (U/ml)	A _{Col} (U/ml)	A _{Fib} (U/ml)	A _{Ker} (U/ml)	A _{Clo} (U/ml)
Gelatin	4.28 (0.60)	5.25 (0.96)	1.40 (0.89)	7.12 (0.12)	-	-
Coffee powder residue	3.09 (0.08)	44.83 (0.52)	377.50 (1.7)	7.10 (0.11)	-	2.79 (0.85)
Soybean flour	2.32 (0.31)	46.62 (3.37)	344.55 (2.34)	9.30 (0.36)	-	2.11 (0.67)
Wheat bran	3.47 (0.15)	44.60 (7.30)	328.80 (2.73)	8.87 (2.26)	-	1.06 (0.59)
Chicken feather	2.36 (0.94)	31.25 (4.74)	245.10 (2.69)	6.87 (0.72)	32.96 (4.80)	-

A_{Pro} = Protease activity; A_{Col} = Collagenolytic activity; A_{Fib} = Fibrinolytic activity; A_{Ker} = Keratinolytic activity; A_{Clo} = Clotting-milk activity

Enzymatic assay was performed in triplicate

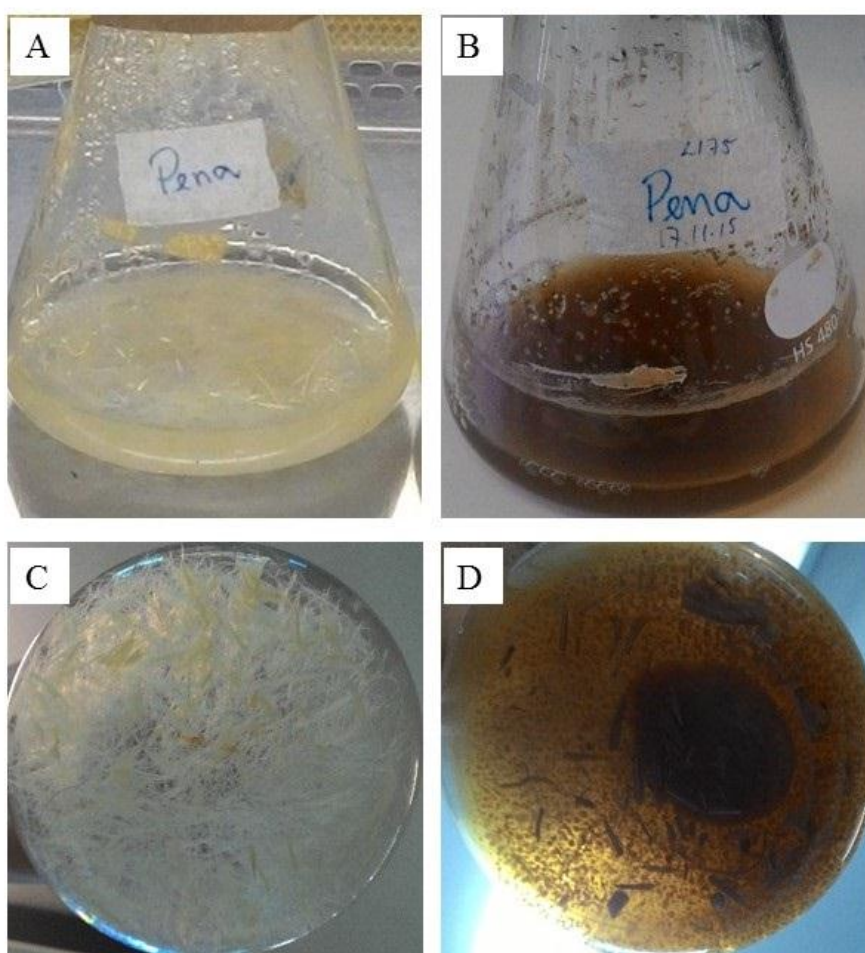
Standard deviations are shown in parentheses

The proteases produced by *S. antibioticus* UFPEDA3421 presents high activity in the media containing soybean meal, wheat bran, coffee powder residue and chicken feathers. Nascimento et al (2015) reported protease production through solid state fermentation of *Mucor* and *Rhizopus* strains with values of 38.08 and 30.77 U/ml, respectively, using wheat bran as a substrate. Additionally, Moreira et al. (2003) used the MS2 medium to produce a protease by *Nocardia* sp. isolated from the soil of the northeast of Brazil, achieve values of 30 U/ml in the crude extract. These enzymes have potential for being widely applied for detergent production, food processing, waste treatment and leather industry (COELHO et al, 2016; VELOORVALAPPIL et al, 2013).

As shown in Figure 2, the keratinase produced by *S. antibioticus* UFPEDA3421 degrade the chicken feathers present in the culture medium obtaining 32.96 U/ml of enzymatic activity after 120 h of fermentation. Studies carried out by Wang et al (2015) and Ningthoujam et al. (2016) demonstrate the potential of keratinase produced by strains of *Thermoactinomyces* and *Amycolatopsis* yielding 400 and 165.66 U/mL, respectively. Enzymes produced by *Streptomyces*

strains are reported to degrade whole chicken feather when incubated for long periods (JANI et al, 2014) these ability is favorable for use in poultry waste treatment (VERMA et al, 2016). Nutrients available in culture media such organic nitrogen sources, and mono- and disaccharides are responsible for catabolic repression of keratinase production, however, culture media formulated with minerals and keratinous materials are known to induce the production of extracellular keratinases (DAROIT; BRANDELLI, 2013).

Figure 2 – *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 grown on modified MS-2 medium containing chicken feathers. [A] Culture medium without inoculum; [B] Culture medium after 120 h of growth; [C] Bottom view of culture medium without inoculum; [D] Bottom view of culture medium after 120 h of fermentation.



The best conditions for collagenase production (377.5 U/mL) by *S. antibioticus* UFPEDA3421 was obtained by using coffee powder residue as substrate at 1% (w/v) concentration. The other substrates were also favorable for collagenase production, providing activity levels above 200 U/mL for the crude extract, except the medium containing gelatin. Although gelatin is commonly used as substrate for collagenase production, Jain & Jain (2010) studied the influence of nitrogen source on collagenase production by *Streptomyces exfoliatus* and a high enzyme production was reported for the culture media containing soybean meal and chicken feather meal.

The production of milk-clotting proteases was observed in the culture media composed of coffee powder residue, soybean flour and wheat bran crude extracts, reaching values of 2.79, 2.11 and 1.06 U/mL, respectively, while the other enzymatic extracts did not show clot-milk formation. The highest fibrinolytic activity values obtained were measured in the culture media containing soybean flour and wheat bran reaching 9.3 and 8.87 U/mL, respectively. The availability of nutrients in the culture medium directly influences the production of enzymes, resulting in a positive feedback loop or catabolic repression of these molecules regulating the metabolic pathways of the microorganism (ZARINS-TUTT et al., 2016; CHUBUKOV et al., 2014).

The chromatographic analysis presented in Figure 3 shows a profile obtained from the crude enzymatic extract fermentation of *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 growing in different substrates and submitted to ion-exchange chromatography. The chromatograms confirm the production of biomolecules with different characteristics, where the proteases analyzed in this work did not bind to the resin under the determined conditions and were detected in the fractions eluted without NaCl. Although the fractions eluted with different NaCl concentrations not show enzymatic activity for the proteases aimed in this work, the potential for enzyme production by *S. antibioticus* UFPEDA3421 allows to infer that other biomolecules of industrial interest may be present in the crude extracts.

Figure 3 – Ion-exchange chromatography of *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 enzymatic crude extract produced on MS-2 medium modified with [A] coffee powder residue, [B] gelatin, [C] chicken feather, [D] soybean flour, and [E] wheat bran. The solid line represents the detection of proteins by FPLC while dashed lines represent the different concentrations of NaCl in the sample elution.

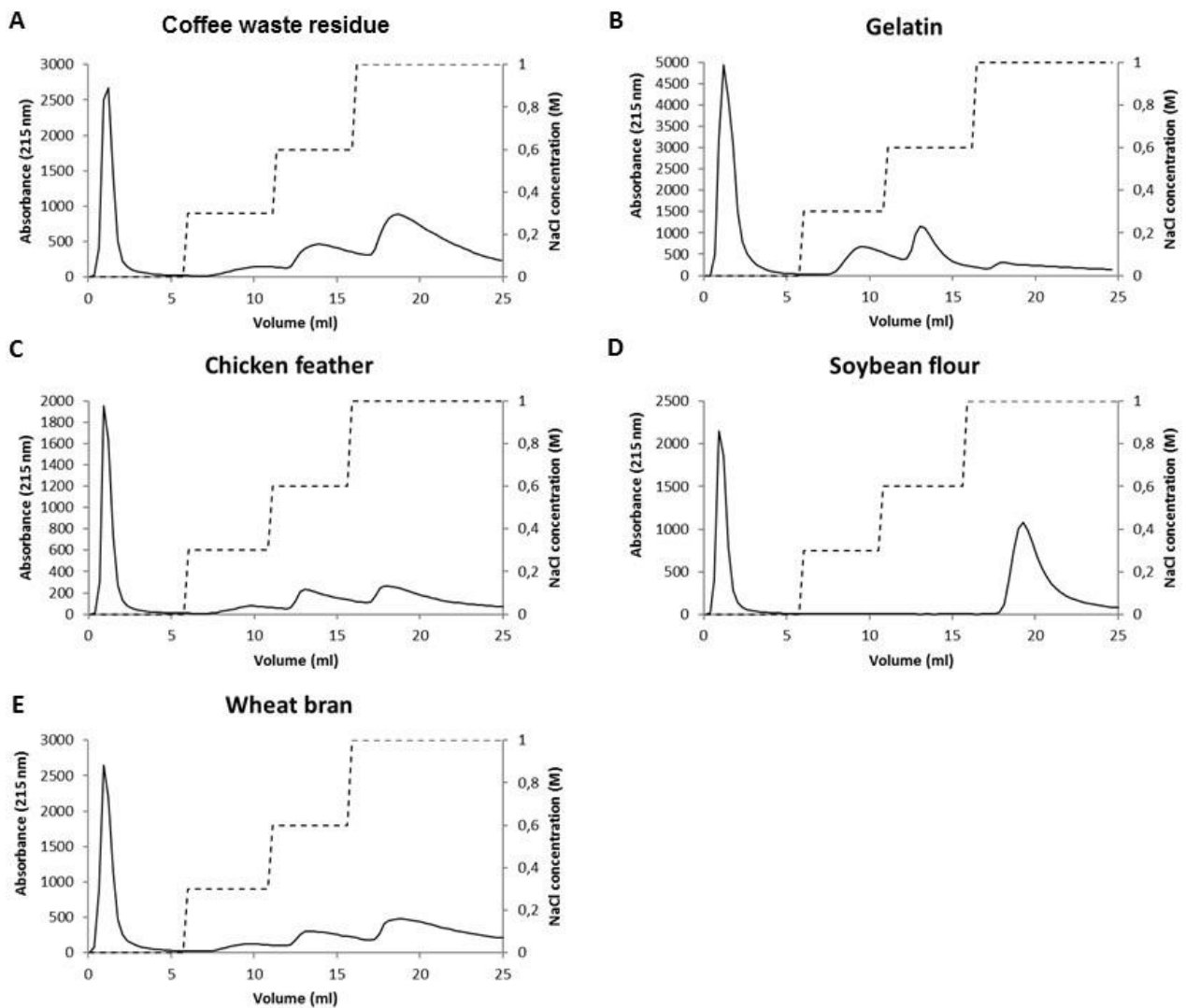


Table 2 – Enzymatic activities of the crude enzymatic extracts from *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 submitted to ion-exchange chromatography.

Substrate	A _{Pro} (U/mL)	A _{Fib} (U/mL)	A _{Ker} (U/mL)
Coffee poder residue	15.73 (2.51)	5.08 (0.59)	-
Gelatin	5.27 (0.95)	0.25 (0.11)	-
Wheat bran	67.47 (1.56)	1.84 (0.13)	-
Soybean flour	9.90 (1.02)	4.92 (0.87)	-
Chicken feather	61.00 (3.72)	7.01 (0.89)	26.00 (3.48)

A_{Pro} = Protease activity; A_{Fib} = Fibrinolytic activity; A_{Ker} = Keratinolytic activity.

Enzymatic assay was performed in triplicate.

Standard deviations are shown in parentheses

The results of enzymatic activities are shown in Table 2, with the highest activity detected for protease in wheat bran crude enzymatic extract, achieving 67.47 U/ml. Although studies have been carried out aiming purify and characterize the fibrinolytic proteases, keratinases and milk-clotting proteases produced by actinomycetes (MOSTAFA et al, 2013; GONG et al, 2015; SUN et al, 2016), the *Streptomyces antibioticus* species has no reports of studies in the prospection of these proteases. Thus, from the data obtained in the present work it is concluded that the strain *S. antibioticus* UFPEDA3421 has potential for utilization in the production of enzymes with medicinal, food and textile application, besides helping to determine some characteristics of the biology of this species and provide information for future analysis in the production of biomolecules. Further studies to optimize the production of these enzymes, especially keratinase and collagenase, and to enhance their purification are in progress to explore the biotechnological potential of this strain.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco – FACEPE – the National Council for Scientific and Technological Development – CNPQ – and Financier of Studies and Projects – FINEP.

REFERENCES

- ADRIO, J.; DEMAIN, A. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, 2014. v. 4, n. 1, p. 117–139.
- ALIPOUR, H. *et al.* Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): a review. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, 2016. v. 6, n. 11, p. 975–981.
- ANBU, P. *et al.* Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource technology**, 2007. v. 98, n. 6, p. 1298–1303.
- AOYAMA, A. *et al.* Newly-isolated laccase high productivity *Streptomyces* sp. grown in cedar powder as the sole carbon source. **International journal of waste resources**, 2014. v. 4, n. 2.
- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **Methods in Enzymology**, 1970. v. 19, p. 446-459.
- BOUDIAF, I. *et al.* The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species, *Quercus suber*, in North Africa. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 65, p. 172-179, 2013.
- CHAVIRA, R.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical biochemistry**, 1984. v. 136, n. 2, p. 446–450.
- CHUBUKOV, V. *et al.* Coordination of microbial metabolism. **Nature reviews microbiology**, 2014. v. 12, n. 5, p. 327–340.
- COÊLHO, D. F., *et al.* Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. **BioMed Research International**, 2016. v. 2016, 6 pages.
- DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2013. v. 34, n. 4, p. 372-384.
- DUTTA, S.; WU, C.-W. Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, 2014. v. 16, p. 4615-4626.
- FRANCO-CIRIGLIANO, M. N. *et al.* *Streptomyces misionensis* pesb-25 produces a thermoacidophilic endoglucanase using sugarcane bagasse and corn steep liquor as the sole organic substrates. **Biomed research international**, 2013. v. 2013, p. 1–9.

GINTHER, C. L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1979.v. 15, n. 4, p. 522–526.

GONG, J.-S. *et al.* Biochemical characterization of an extreme alkaline and surfactant-stable keratinase derived from a newly isolated actinomycete *Streptomyces aureofaciens* k13. **Rsc advances**, 2015. v. 5, n. 31, p. 24691–24699.

GOODFELLOW, M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: GOODFELLOW, M. et al (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Actinobacteria. 2. Ed. Editora Springer. 2012. v. 5. p. 33-34.

GOTO, B.T. *et al.* *Racocetra intraornata*, a new species in the Glomeromycetes with a unique spore wall structure. **Mycotaxon**, 2009. v. 109 p. 483–491

GURUNG, N. *et al.* A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **Biomed research international**, 2013. v. 2013, p. 1–18.

HAMMAMI, A. *et al.* Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*: Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 96, p. 272-281, 2017.

HUANG, L. *et al.* Biochemical Characterization of a Novel L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity from *Rhizomucor miehei* and Its Application in Food Safety and Leukemia Treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014. v. 80, n. 5, p. 1561–1569.

JAIN, R.; JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 174-178, 2010.

JANI, S. A. *et al.* Screening , isolation and characterization of keratin degrading actinomycetes: *Streptomyces* sp. and *Saccharothrix xinjiangensi* and analyzing their significance for production of keratinolytic protease and feed grade aminoacids. **International journal of current microbiology and applied sciences**, 2014. v. 3, n. 9, p. 940–955.

KÄMPFER, P. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In: GOODFELLOW, M. et al (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Actinobacteria. 2. Ed. Editora Springer. v.5. p.1455-1767. 2012.

LANGE, L.; HUANG, Y.; BUSK, P. K. Microbial decomposition of keratin in nature: a new hypothesis of industrial relevance. **Applied microbiology and biotechnology**, 2016. v. 100, n. 5, p. 2083–2096.

LEMES, A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**. v. 66, p. 217-224, 2016.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2012. v. 2, n. 3. e201209017

LIMA, L. A., Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta Amazonica**, 2014. v. 44, n. 4, p. 403-410.

MADEIRA JR, J. V. et al. Efficient tannase production using Brazilian citrus residues and potential application for orange juice valorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2015. v. 4, p. 91-97.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. USA: Editora Benjamin Cummings. 2012. 1043p.

MANDER, P. et al. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. cs624 using an agro residue substrate. **Process biochemistry**, mar. 2014. v. 49, n. 3, p. 451–456.

MOREIRA, K.A. et al. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization. **Process Biochemistry**, 2003. v. 39, p. 67-72.

MOSTAFA, E.-S.; SAAD, M. Isolation of clt genes encoding milk clotting enzyme and characterization of milk clotting enzyme from new isolate *Streptomyces pseudogriseo* lusnrc-15. **American journal of biotechnology and molecular sciences**, jun. 2013. v. 3, n. 1, p. 8–23.

NASCIMENTO, T.P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, 2015. v. 3, p. 81-91.

NINGTHOUJAM, D. S. et al. Optimization of keratinase production by *Amycolatopsis* sp. strain mbrl 40 from a limestone habitat. **Journal of bioprocessing & biotechniques**, 2016. v. 6, n. 4, p. 2–6.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VIII. Green spore group of *Microtetraspora*, its preferential isolation and taxonomic Characteristics. **Journal of Fermentation Technology**, 49, p.1-7. 1971.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied biochemistry and biotechnology**, ago. 1996. v. 60, n. 2, p. 115–122.

RAWLINGS, N. D. Protease Families, Evolution and Mechanism of action. In: BRIX, K.; STÖCKER, W. (ed.) **Proteases: Structure and Function**. Editora Springer Science & Business Media, 2013. p.1-36.

SAXENA, S. **Microbial enzymes and their industrial applications**. [S.l.]: Applied Microbiology, 2015.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International journal of systematic bacteriology**, 1966. v. 16, n. 3, p. 313–340.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, out. 1985. v. 150, n. 1, p. 76–85.

SUN, Z. *et al.* A fibrinolytic protease afee from *Streptomyces* sp. cc5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International journal of biological macromolecules**, abr. 2016. v. 85, p. 346–354.

SWAMINATHAN, M. S., Bio-diversity: an effective safety net against environmental pollution. **Environmental Pollution**, 2003. v. 126 p. 287–291

TEWARI, S.; ARORA, N.K. Transactions Among Microorganismsand Plant in the Composite Rhizosphere Habitat. In ARORA (ed). **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Editora Spronger India, 2013. p. 1-50.

VAN DER PUTTEN, W. H. *et al.* Plant–soil feedbacks: the past, the present and future challenges. **Journal of Ecology**. v. 101, p. 265-276, 2013.

VELOORVALAPPIL, N. J. *et al.* Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, 2013. v. 1, n. 3, p. 39-51.

VERMA, A. *et al.* Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 37, n. 4, p. 476-491. 2016.

VOGET, S. *et al.* Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003. v. 69, n. 10, p. 6235–6242

WANG, L. *et al.* Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. cdf and characterization of its keratinolytic protease. **Applied microbiology and biotechnology**, 21 maio. 2015. v. 99, n. 9, p. 3949–3959.

WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* tku007. **New biotechnology**, 2011. v. 28, n. 2, p. 196–202.

WARWICK, D. *et al.* Collagenase *Clostridium histolyticum*: emerging practice patterns and treatment advances. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**. v. 50, n. 5, 251-261, 2016.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, 1991. v. 173, n. 2, p. 697–703.

ZARINS-TUTT, J. S. *et al.* Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. **Nat. prod. rep.**, 2016. v. 33, n. 1, p. 54–72.

ZHANG, Y.-Z. *et al.* Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015. v. 81, n. 18, p. 6098–6107.

**5 ARTIGO 2 - NEW COLLAGENASE FROM *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 TO
OBTAIN BIOACTIVE PEPTIDES WITH ANTICOAGULANT ACTIVITY**

Possível publicação: Applied and Environmental Microbiology

Fator de impacto: 3,668

Qualis: A2

NEW COLLAGENASE FROM *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 TO OBTAIN BIOACTIVE PEPTIDES WITH ANTICOAGULANT ACTIVITY

Elizianne Pereira Costa¹; Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa²; Wendell Wagner Campos Albuquerque²; Janete Magali de Araújo³; Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹ Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego avenue 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

² Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Dom Manoel de Medeiros street, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil

³ Department of Antibiotics, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego avenue 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brazil

*Author for correspondence:

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Dom Manoel de Medeiros street, s/n, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife, PE, Brazil.

Tel: +55.81.3320.6345

Fax: +55.81. 3320.6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

ABSTRACT

Collagenases are proteases able to degrade native and denatured collagen, with relevant applications in leather, food, pharmaceutical and cosmetic industries, as well as in medical practice in the treatment of burns and wounds. The present work aims to purify a collagenase produced by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421, followed by biochemical characterizations and to produce bioactive peptides from collagen degradation. For this purpose, *S. antibioticus* UFPEDA3421 strain was grown in liquid culture media containing coffee powder residue. The collagenase was further purified by different chromatographic methods and subsequently biochemically characterized. Bioactive peptides were produced by degradation of type I and type V collagen from Achilles tendon and analyzed for their anticoagulant properties. The strain achieved 377.5 U/mL collagenase activity at 120h of fermentation, presenting a purification factor of 136.7 after chromatographic isolation and was characterized as a 41.28 kDa neutral metallocollagenase with an optimum activity at pH 7.0 and 60 °C. Type V collagen degradation in absence and presence of calcium ions produces bioactive peptides that delay the coagulation time in 49s and 88s, respectively. The methods described presents an efficient protocol for obtaining and isolating a collagenase with potential applications in production of bioactive peptides with anticoagulant activity.

Keywords: *Streptomyces antibioticus*; coffee powder residue; collagenases; bioactive peptide; anticoagulant.

INTRODUCTION

Collagenases [E.C. 3.4.24.3] are peptidases responsible for degrading the triple-helix structure of native collagen, found in various connective tissues. Microbial collagenases are less specific than animal collagenases and cleave several types of collagen, including insoluble collagen (native protein) and soluble collagen (denatured protein) (DUARTE; CORREIA; ESTEVES, 2014). These enzymes are widely used in industry processes as meat softening, leather tanning, and multiple non-invasive therapeutical procedures as transplants, treatment of glaucoma, Dupuytren's disease and treatment of scars and burns (DABOOR et al, 2010; FUJIO et al, 2014; ALIPOUR et al, 2016). Additionally, collagen degradation produces fragments of peptides with several biological properties as antimicrobial and antioxidant activities, increases in skin firmness and osteoblasts proliferation (LIMA et al, 2014; PROKSCH et al, 2014; LIU et al, 2014).

Collagenolytic enzymes isolated from various bacterial species as *Clostridium histolyticum*, *Leptospira* sp., *Bacillus stearothermophilus* and *B. licheniformis* and also some fungi species, for example, *Penicillium aurantiogriseum*, *Rhizoctonia solani* and *Candida albicans* are well reported (HAMDY, 2008; LIMA et al, 2009; JANWITTHAYANANA, et al, 2013; LIMA et al, 2014; ISRAEL-ROMING et al, 2015; GASTON et al, 2015). However, there is a lack of studies exploring the potential of actinomycetes species as collagenases producers (GOSHEV et al, 2005; SAKURAI et al, 2009; PALANIYANDI et al, 2013; HATANAKA; KAWAKAMI; URAJI, 2014) and although *Streptomyces* species is generally reported as enzyme producers, *Streptomyces antibioticus*, particularly, is not mentioned producing collagenase.

The efficiency of microbial enzyme production is dependent on which nutrients are available for cellular growth. Currently, the use of waste residues to obtain products is an alternative to reduce costs and treat environmental pollutants (CASTRO et al, 2015; SINGH; BAJAJ, 2014; EL-BAKRY et al, 2015). According to United States Department of Agriculture - USDA (2016), between 2015 and 2016, the world coffee industry produced the equivalent to 153.3 million bags of coffee, and Brazil, as the largest producer, is responsible for 32% of this amount. For this reason, studies have focused in the use of such resources for obtaining profitable products as biodiesel, ethanol, and dye removal (MUSSATTO et al, 2011). The aim of the present work is to purify and characterize a collagenase produced by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 by submerged fermentation using coffee powder residue as substrate and obtain bioactive peptides by collagen hydrolysis.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and Substrate

The actinomycete strain *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 was obtained from the Culture Collection of the Department of Antibiotics (UFPEDA) of Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil and was isolated from *Licania rigida* (Benth) rhizosphere. The strain was stored in modified Czapek medium (MC) as described by (NONOMURA; OHARA, 1971) and kept at 4 °C.

The coffee powder residue was gently given by University Restaurant from Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE). The residue was used without further processing.

Collagenase production

Streptomyces antibioticus UFPEDA3421 was grown on MC medium (for 5 days at 37 °C) and cells were subsequently suspended in Tween 80 solution (0.1% v/v). A volume of 1 mL of the cell suspension, standardized to an absorbance equal to 0.1 (at 625 nm), was used to inoculate 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the MS2 medium (PORTO et al, 1996) with some modifications, composed by coffee powder residue (1.0%), NH₄Cl (0.1%), MgSO₄·7H₂O (0.06%), K₂HPO₄ (0.475%), glucose (1.0%) and mineral solution (0.1%).

At each 24h, the content of one of the flask was collected, filtered in Whatman n.1 filter, and used for determination of cell growth and enzyme production. Dry cell mass content was measured based on the methods of Olsson & Nielsen (1997), after microwave exposure for 15 min.

Enzyme assay and protein quantification

Collagenolytic activity was determined according to Chavira et al (1984) with some modifications, using azo dye-impregnated (azocoll) as substrate. The reaction mixture contained 0.05 mL of the crude extract, 5 mg of azocoll (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 0.95 mL of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) added by 1 mM CaCl₂. The reaction was carried out during 1 h at 37 °C under constant agitation and was stopped by cooling in ice bath. Tubes were centrifuged at 15,130 x *g* for 15 min and had their absorbance measured at 520 nm. The blank tube was prepared with distilled water under same conditions. One unit of enzyme activity (U) is the amount of enzyme required to produce an increase of 0.1 in the absorbance.

Protein content of the samples was measured according to Smith et al (1985), using a protein determination kit (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), and with bovine serum albumin as standard.

Enzyme Purification

Proteins presents in crude extract were precipitated with 80% ammonium sulphate saturation under constant agitation for 4 h at 4°C. After centrifugation at 14,000 x *g* for 10 min the pellet was suspended in 5 mL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8,0) and the suspension was dialyzed three times against the same buffer.

Enzyme was isolated by a combination of ion-exchange and gel filtration chromatography. A volume of 1 mL of the desalinated sample was applied to anion-exchange chromatography on a DEAE-Sephadex A50 column previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 1mL/min. Protein fractions were eluted with different concentrations of NaCl (0, 0.3 and 0.6M) in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at the same flow rate and monitored at 280 nm. In sequence, the enzyme fractions were pooled, concentrated by acetone precipitation (70% saturation), suspended in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and were assayed for collagenase activity.

The fraction with collagenase activity was further subjected to gel filtration chromatography, by using a Fast Protein Liquid Chromatography system (ÄKTA Avant 25, GE-healthcare, Uppsala, SE) on a Superdex G75 HR10/300 GL size exclusion column, previously equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) added by 0.15 M NaCl. The sample was eluted at a flow rate of 0.5 mL/min in the same buffer and monitored at 280 nm and 215 nm. The fraction corresponding to the collagenase was pooled and used in the subsequent studies.

Molecular weight determination

The molecular weight of the purified fraction was estimated by correlating the retention time in the size exclusion chromatography. Protein molecular weight standards were albumin (65.0 kDa), egg albumin (45 kDa), trypsin inhibitor (21.7 kDa) and lysozyme (14.3 kDa).

Gelatin zymography

Gelatin zymography was performed according to Laemmli (1970) with some modifications. Separating gel (10%) was prepared containing 1mg/mL of gelatin and 20% SDS. The purified enzyme samples were applied to the polyacrylamide gel and the electrophoresis was carried out at 4 °C. The gel was then washed in Triton X-100 (2.5% v/v) for 30 min to remove SDS and was incubated overnight in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 1 mM CaCl_2 at 37 °C. The gel was stained by silver nitrate.

Characterization of collagenase

Optimum temperature was determined by assaying collagenase activity at temperatures in the range of 30 °C to 90 °C. The enzyme stability was investigated by incubating the enzyme at

temperatures of 30 °C to 90 °C for 1 h, followed by the collagenase assay (as described in the section 2.3).

Optimum pH and enzyme stability were investigated at different pHs, using 0.05 M sodium citrate buffer (pH 3.0 – 6.0), 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.0 – 7.0), 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0 – 9.0), and 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.0 – 11.0). The enzyme stability was tested by incubating the enzyme at the different pHs for 4 h at 4 °C, followed by the collagenase assay.

The effect of metals ions, inhibitors and surfactants were investigated according to Nascimento et al (2015), mixing equal volumes of the enzyme solution and the metal ions or inhibitors or surfactants for 1 h at 37 °C followed by the activity determination.

For investigate the effect of metal ions on collagenase, the methods described in the section 2.3 were applied, modified by using 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) without CaCl_2 . The metal ions (at 10 mM concentration) used in the experiments were prepared from chloride salts of: Iron (Fe^{3+}), Zinc (Zn^{2+}), Calcium (Ca^{2+}), Sodium (Na^+) e Potassium (K^+); and sulphate salts of: Iron (Fe^{2+}), Zinc (Zn^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) e Cooper (Cu^{2+}).

Enzymatic inhibitor assay was performed using PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, $\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$), 2-mercaptoethanol (2-hydroxy-1-ethanethiol- $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA-acetic- $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), Pepstatin A and Iodoacetic Acid at final concentration of 10 mM concentration. The surfactants used were Tween 20, Tween 80, Triton X-100 e SDS, at a final concentration of 1%.

Production of bioactive peptides

The collagen degradation was performed with 5 mg/mL of type I and type V collagen from bovine Achilles tendon incubated in reaction mixture containing 0.1 mL of the enzyme sample, for 2 h at 37 °C. Samples separated at intervals of 30 minutes were used for anticoagulant assay and subjected to SDS-PAGE electrophoresis according to Laemmli (1970), using 12,5% separating gel and 5% stacking gel.

Anticoagulant activity assay

Venous blood from healthy volunteers was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate, and platelet poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation at $3,000 \times g$ at 25

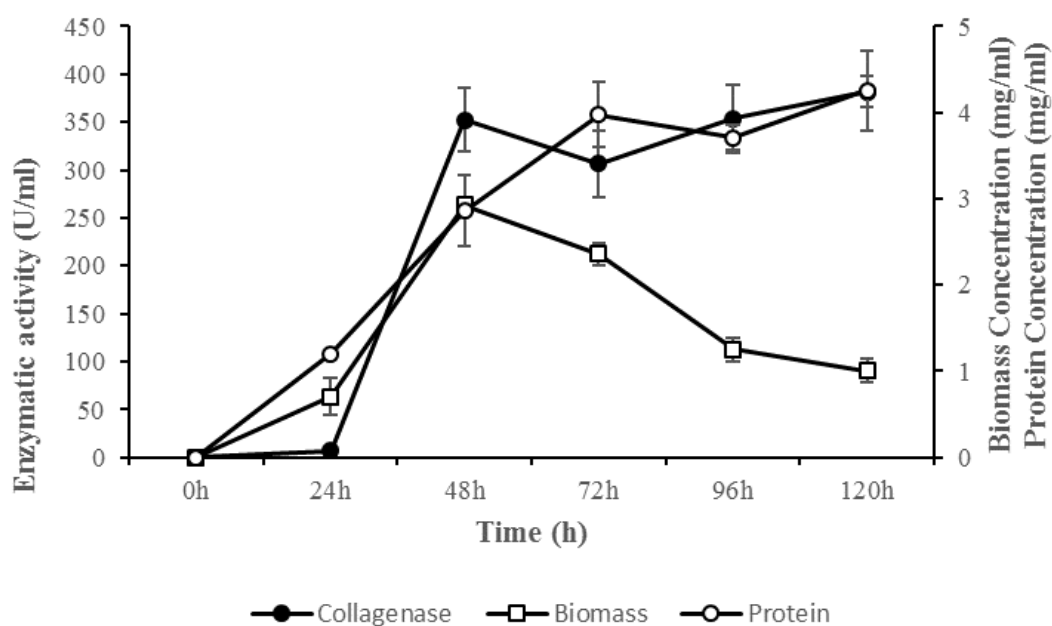
°C. The anticoagulant effect was measured using a coagulometer BFT II (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) by analysis of the activated partial thromboplastin time (APTT). Bioactive peptides obtained at different times of hydrolysis of type I and type V collagen from bovine Achilles tendon (30, 60, 90 and 120 min) were used in the tests. The reaction mixture contained 50 µL of PPP, 50 µL of peptide solution and 50 µL of Dade actin activated cephaloplastin reagent (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA), incubated at 37 °C for 2 min and followed by the addition of 50 µL of 0.025 M CaCl₂. Negative controls were prepared with 0.15 M NaCl instead the peptide solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbial growth and enzymatic production using coffee powder residue

The curve of enzyme production and cell growth are shown in the Figure 1, with maximum biomass achieved at 48 h of fermentation. The protein content was continuously increasing even during the decline phase (after 96 h of fermentation), suggesting a continuation of the microbial metabolism.

Figure 1 – Comparison of the cell growth, protein content and enzyme production by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 in fermentation using MS2 medium containing coffee powder residue.



The enzyme production showed a pronounced increase during the log phase (between 24 and 48 hours), being, however, almost constant in later stages. That fact indicates a relation between enzyme production and cell growth, probably to promote the degradation of nutrients present in the culture medium (ISHIDA et al, 2016), or to facilitate the cell invasion and colonization (HARRINTON, 1996; KASSESEGNE et al, 2014).

Coffee by-products are used for obtaining enzymes by submerged fermentation and solid state fermentation from microorganisms. These agro-industrial residues are composed by proteins, sugars, carbohydrates, fat and fibers used by microorganisms for their growth. Additionally, spent coffee wastes presents fatty acids, lignin, cellulose, hemicellulose, and other polysaccharides in its constitution which were used as nutrients for microbial growth (MURTHY; NAIDU, 2012; PUJOL et al, 2013).

Collagenases obtained from microbial source have been widely reported using a variety of substrates. Lima et al (2009) studied the production of collagenase by *Candida albicans* and found 7.06 U/mL of activity, when a medium supplemented with gelatin (2% w/v) was used. Ohbayashi et al (2012) found a collagenase activity of 0.016 U/mL, from a recombinant *E. coli* grown in LB broth (obtained from a gene encoding *Clostridium histolyticum* collagenase). At the same time, Ishida et al (2016) reported a production of collagenase of approximately 7.5 U/mL, through submerged fermentation by *Vibrio* sp. Pr21 in casein medium.

Regarding actinomycetes, Palaniyandi et al (2013) found a collagenase activity of 0.24 U/mL by *Streptomyces phaeopurpureus* grown in medium containing gelatin (0.5% w/v) and Sakurai et al (2009) verified a collagenolytic activity of 488 U/mL for the crude extract of fermentations by *Streptomyces parvulus* subsp *citrinus*. Those values highlight the potential of *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 to produce collagenase since the values obtained in this work are larger than most of the values described in literature using azocoll methodology. Different methodologies for collagenase quantification are described using *in natura* collagen degradation, fluorescent and colorimetric methods, and synthetic peptide substrates, according to the type of collagenase studied. This variety of assays difficult comparisons between results obtained by various authors using different methodologies (DUARTE et al, 2014; WANDERLEY et al, 2016).

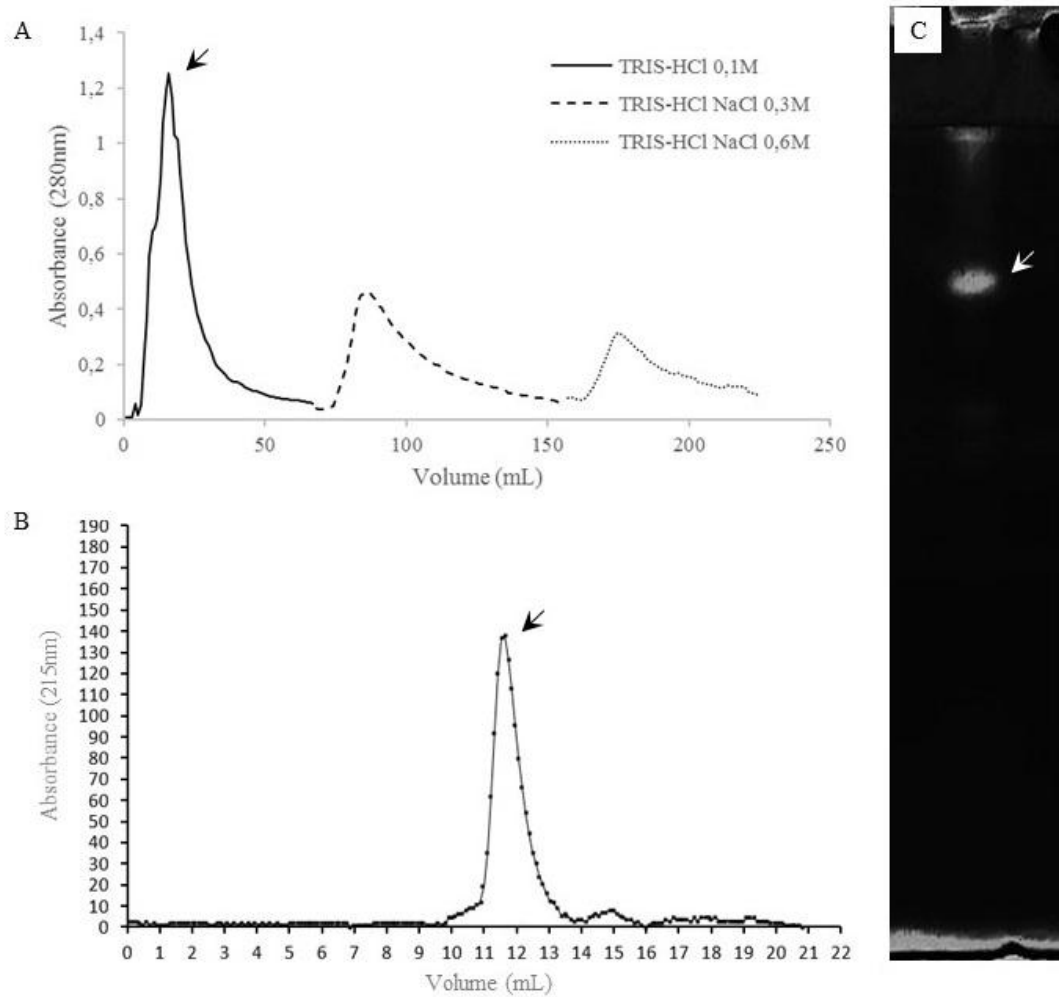
Collagenase purification

As the first step, the fraction of ammonium sulphate protein precipitation provided a collagenolytic activity of 360.4 U/mL. Several studies report this initial purification step as an effective method of concentration and fractionation of collagenases (PETROVA; SHISHKOV; VLAHOV, 2006; UESUGI et al, 2008; HAMDY, 2008; SAYED et al, 2012; BAEHAKI et al, 2012; ABDEL-FATTAH, 2013).

The subsequent purification step consisted of chromatography techniques. Figure 2A shows the chromatogram profile of the precipitated extract subjected to ion-exchange chromatography. The collagenase fraction was not bound to the resin (non-adsorbed fraction), flowing straight through the column and presenting activity of 170.7 U/mL. Adsorbed fractions eluted with different concentrations of NaCl did not show collagenolytic activity. The collagenase fraction was subsequently applied on a Superdex G75 HR10/300 GL column, which provided a single chromatogram peak (shown in the Figure 2B), corresponding to a collagenolytic activity of 150.5 U/mL.

Zymogram analysis (Figure 2C) show a clear zone of degradation in the gel containing gelatin, corresponding to the purified collagenase. The molecular weight from purified enzyme was estimated by gel filtration chromatography as 41,3 kDa. Collagenases exhibit wide variety of molecular weights, ranging from small molecules of 37 kDa to large complex proteins of 210 kDa (OKAMOTO et al, 2001; WATANABE, 2004; RASKOVIC et al, 2014; NAKAYAMA et al, 2015; SINGH; BHATTACHARYYA, 2014). According to Daboor et al (2010) collagenolytic enzymes that range in size from 24 to 36 kDa are typically serine proteases, while the enzymes that range from 30 to 150 kDa are metallocollagenases.

Figure 2 – [A] Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A50 column; [B] Size exclusion chromatography on Superdex G75 HR10/300 GL column and; [C] Gelatin zymogram of the purified collagenase. Arrowheads indicate the positions of collagenase.



Each step of purification is summarized in the Table 2 and the degree of purity (expressed as yield and recovery) obtained for the collagenase from *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421. The purification factor of 136.7 proved the efficiency of the method applied, showing a higher value than others previously reported in the literature (which range from 3.81 to 99.3), regarding particularly the purification of collagenases produced by actinomycetes (PETROVA et al, 2006; SAKURAI et al, 2009; UESUGI et al, 2008; ABDEL-FATTAH, 2013).

Table 2 – Purification steps of collagenase produced by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 in MS2 medium containing coffee powder residue.

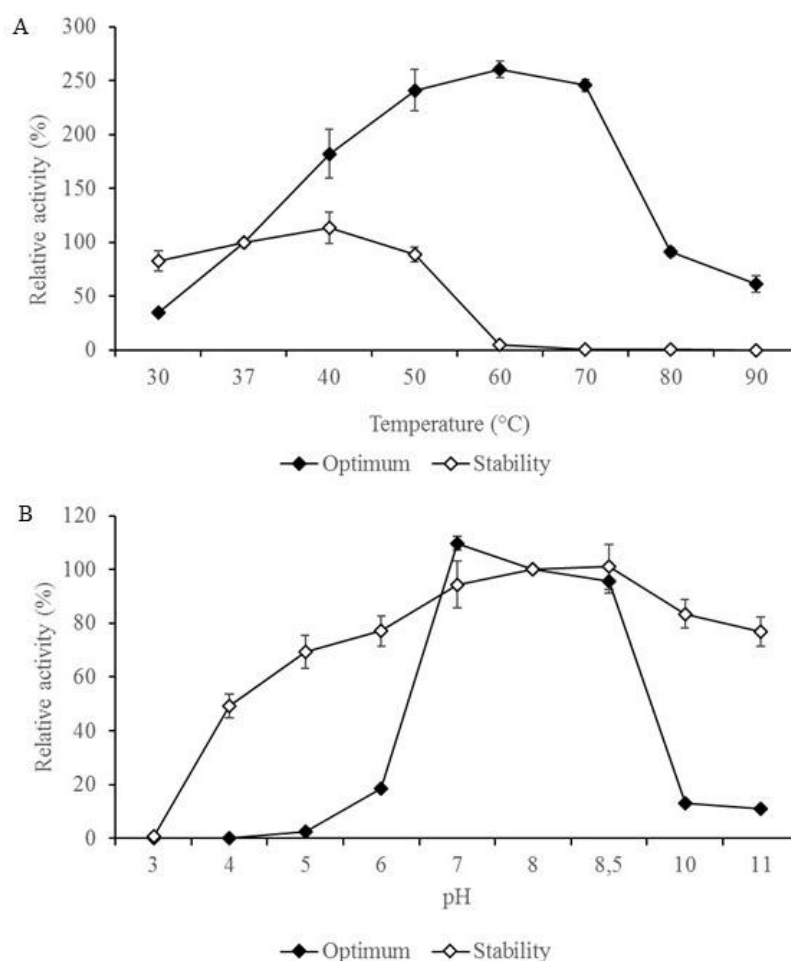
Purification Steps	<i>Acol</i> (U)	P (mg/mL)	V (mL)	<i>Asp</i> (U/mg)	F	Y (%)
Crude extract	377.50	3.09	100	122.33	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-80%	360.40	1.63	2	221.10	1.81	54.37
DEAE-Sephadex A-50	233.40	0.10	2	2.398.77	19.61	3.24
Superdex G75 HR10/300 GL	150.50	0.009	1	16.723.00	136.7	0.29

Acol = Collagenolytic activity; P = Protein content; V = Volume; *Asp* = Specific activity; F = Purification factor; Y = Yield.

Effect of temperature and pH on activity and enzymatic stability

The collagenolytic activity was improved when exposed to temperatures between 30 °C and 60 °C, achieving a maximum value of 472.8 U/mL, followed by a subsequent decay to minimum levels at 90 °C (Fig. 3A). The enzyme was stable up to 50 °C for 1h, but an increase in temperature to 60°C completely abolished its activity. Hamin Neto et al (2013) verified that a protease from *Eupenicillium javanicum* was able to maintain a residual activity of 35% when incubated at 60 °C for 15 min, but the extension of the exposure time to 1 h led to an activity of 10% of its initial level.

Figure 3 – Collagenolytic activity profile of the protease produced by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 in different temperatures [A] and pH [B].



The optimal collagenolytic activity was observed within the pH range of 7.0 to 8.5 (Fig.3B). Studies regarding collagenases from actinomycetes have reported their neutral and alkaline character, with optimum pH between 7.0 and 9.0 (BARROS, 2011; ABDEL-FATTAH et al, 2013; JAIN & JAIN, 2010; SAKURAI et al, 2009). Collagenases from other microbial sources presents similar characteristics, with optimum pH ranging from 6.0 to 8.0 in bacterial collagenases (HAMDY et al, 2008; BAEHAKI et al, 2012; ROCHIMA et al, 2016) and optimum pH between 5.0 and 8.0 from fungal collagenases (LIMA et al, 2013; WANDERLEY et al, 2016).

Neutral and alkaline pHs were also beneficial to the stability of the collagenase, which was completely lost in very acid conditions. Those results are similar to the ones reported by Jain & Jain (2010) when studied a serine protease from *Streptomyces exfoliatus* stable in pH between 5.0 and

10.0; and to Ishida et al. (2016) when isolated a metalloprotease from *Vibrio* sp. Pr21 stable in the range of pH 6.0 to 10.0.

Effect of metal ions, surfactants and inhibitors on collagenolytic activity

The collagenase was inhibited by EDTA (Table 3), suggesting that it belongs to the class of metalloproteases. Collagenolytic enzymes produced by microorganisms are usually reported as serine proteases or metalloproteases, which are able to degrade both native collagen and denatured collagen (ZHANG et al, 2015).

The influence of metal ions on the enzyme activity is summarized in Table 3. The collagenase was inhibited by tri and divalent ions, but not affected by monovalent ions. Although collagenolytic metalloproteases are commonly reported as zinc-dependent proteins, they are also discussed for their dependence on metal cofactors as Ca^{2+} , Mg^{2+} and Ba^{2+} , and to be inhibited by a variety of tri and divalent ions (JOVANOVIC et al, 2012; WEN et al, 2016). Matrix metalloproteinases were inhibited by zinc and copper ions by a study performed by Souza and coworkers (2000), evidencing the different biochemical characteristics presenting by the metalloproteases. On the other hand, the use of chloride and sulphate salts in metal ions inhibition assay show different inhibition/increase degrees demonstrating the inhibitory effect is exerted by the metal ions and not by the dissociated salts.

Table 3 – Effects of metal ions, surfactants and inhibitors on the collagenase by *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421.

Relative activity (%)*	
Control	100
Metals [10 mM]	
FeCl ₃	1.31 ± 0,01
FeSO ₄	42.15 ± 0,10
ZnCl ₂	18.52 ± 3,68
ZnSO ₄	8.06 ± 2,29
CaCl ₂	131.27 ± 3,32
MgSO ₄	99.33 ± 6,92

CuSO ₄	30.28 ± 4,60
NaCl	136.08 ± 3,50
KCl	119.85 ± 1,64
Enzyme inhibitor [10 mM]	
PMSF	100.06 ± 2,93
2-mercaptoethanol	100.00 ± 3,21
EDTA	31.30 ± 4,01
Pepstatin A	100.37 ± 2,78
Iodoacetic Acid	64.50 ± 3,02
Surfactants [1%]	
Tween 20	138.10 ± 4,62
Tween 80	157.37 ± 1,87
Triton X-100	156.15 ± 1,33
SDS	8.30 ± 2,20

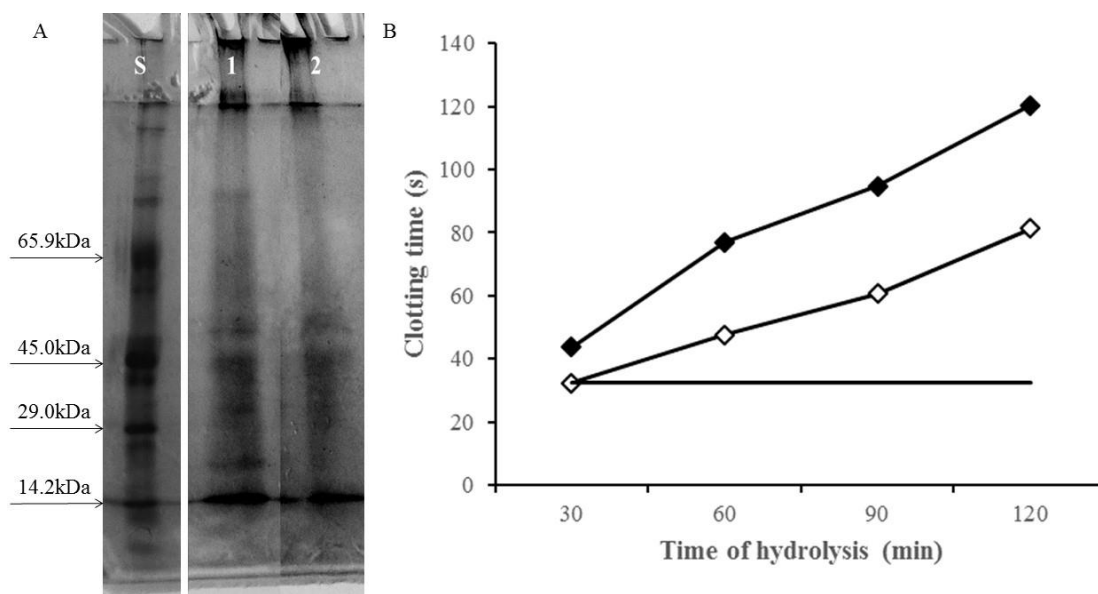
* Triplicates average ± standard deviations.

The non-ionic surfactants Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 improved the enzyme activity by 38%, 57% and 56%, respectively, while SDS, a strong anionic surfactant, produced an inhibitory effect, leading to a reduction of 92% of the initial activity (Table 3). That can be explained by the fact that surfactants are amphiphilic substances that react with the hydrophobic protein regions and lead to conformational modifications in the enzymes, altering their structure and consequently their catalytic potential (NAEEM et al, 2006; ALAM et al, 2015).

Bioactive peptides production and anticoagulant activity

The agarose gel electrophoresis in Figure 4A confirms the production of peptides from the collagen hydrolysis. The high number of bands is discussed as a characteristic of the microbial enzymatic hydrolysis, which has a great diversity of cleavage sites when compared to collagenases isolated from plants and animals (PAL; SURESH, 2016).

Figure 4 – [A] Electrophoretic profile of peptides obtained from the collagen degradation. Lane S shows the molecular weight markers; The lane 1 presents the degradation of type I collagen, and; The lane 2 corresponds to the degradation of type V collagen. [B] Activated partial thromboplastin time (APTT) assay by using bioactive peptides from type V collagen degradation. Straight line indicates coagulation time of control; Open label indicates enzyme with CaCl_2 ; and closed label indicates enzyme without CaCl_2 .



The peptides obtained from type V collagen degradation (Figure 4B) showed activity in the anticoagulant assay with maximum activity reached after 120 min of collagen hydrolysis. The clotting time was 32.4 s for the control and delayed by 81.3 s for the native enzyme, and by 120.3 s for the enzyme added of CaCl_2 . The improvement in the anticoagulant activity in presence of CaCl_2 is plausible since calcium ion was previously verified as a collagenase inducer.

Molecules with anticoagulant activity are reported from several organisms, such as mosquitoes, leeches, snakes, sea cucumbers, among others, however there is a lack of studies on bioactive peptides with anticoagulant activity derived from collagen hydrolysis (YU et al, 2012; REN et al, 2014; CHEN et al, 2015; INDUMATHI; MEHTA, 2016), what highlights the results obtained in the present study.

CONCLUSION

Present work shows the first relate to a collagenase produced by *Streptomyces antibioticus*. The strain *S. antibioticus* UFPEDA3421 showed to be a promising producer of collagenase and, at the same time, coffee powder residue provided great conditions to the cell growth and enzyme production, proving to be an alternative substrate that may recover raw material and avoid waste. The collagenase showed stability in several pH and temperature ranges highlighting the potential for use in several industry processes. The enzyme was able to produce bioactive collagen peptides, what evidencing its potential use in pharmaceutical, food and cosmetic industries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco – FACEPE – and National Council for Scientific and Technological Development – CNPQ – and Financier of Studies and Projects – FINEP.

REFERENCES

- ABDEL-FATTAH, A. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardiopsis dassonvillei* nrc2aza using chitin wastes. **Egyptian pharmaceutical journal**, 2013. v. 12, n. 2, p. 109
- ALAM, P. *et al.* The surfactant-induced conformational and activity alterations in *Rhizopus niveus* lipase. **Cell biochemistry and biophysics**, 26 mar. 2015. v. 71, n. 2, p. 1199–1206.
- ALIPOUR, H. *et al.* Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): a review. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, nov. 2016. v. 6, n. 11, p. 975–981.
- BAEHAKI, A. *et al.* Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* f11.4. **African journal of microbiology research**, 2012. v. 6, n. 10, p. 2373–2379.
- BARROS, M. C. Da S. **Produção, caracterização e purificação de colagenases a partir de cepas de *Streptomyces* spp. da região amazônica**. [S.l.]: Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
- CASTRO, R. J. S. De *et al.* A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, abr. 2015. v. 4, n. 2, p. 199–207

- CHAVIRA, R.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical biochemistry**, 1984. v. 136, n. 2, p. 446–450.
- CHEN, M. *et al.* A novel direct factor xa inhibitory peptide with anti-platelet aggregation activity from *Agkistrodon acutus venom* hydrolysates. **Scientific reports**, 2015. v. 5, p. 10846
- CHOI, J.-H.; KIM, S.-J.; KIM, S. A novel anticoagulant protein with antithrombotic properties from the mosquito *Culex pipiens pallens*. **International journal of biological macromolecules**, dez. 2016. v. 93, p. 156–166
- DABOOR, S. M. *et al.* Extraction and purification of collagenase enzymes: a critical review. **American journal of biochemistry and biotechnology**, 2010. v. 6, n. 4, p. 239–263.
- DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases – a review. **Critical reviews in microbiology**, 2014. v. 7828, p. 1–21
- EL-BAKRY, M. *et al.* From wastes to high value added products: novel aspects of ssf in the production of enzymes. **Critical reviews in environmental science and technology**, 17 set. 2015. v. 45, n. 18, p. 1999–2042.
- FUJIO, A. *et al.* Collagenase h is crucial for isolation of rat pancreatic islets. **Cell transplantation**, 2014. v. 23, n. 10, p. 1187–1198.
- GASTON, R. G. *et al.* The efficacy and safety of concurrent collagenase *Clostridium histolyticum* injections for 2 dupuytren contractures in the same hand: a prospective, multicenter study. **The journal of hand surgery**, 2015. v. 40, n. 10, p. 1963–1971.
- GOSHEV, I. *et al.* Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. **Process biochemistry**, 2005. v. 40, p. 1627–1631.
- HAMDY, H. S. Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*: production, purification and characterization. **Indian journal of biotechnology**, 2008. v. 7, p. 333–340.
- HAMIN NETO, Y. A. A.; MOTTA, M. C. De S.; CABRAL, H. Optimization of metalloprotease production by *Eupenicillium javanicum* in both solid state and submerged bioprocesses. **African journal of biochemistry research**, 2013. v. 7, n. 8, p. 146–157.
- HARRINGTON, D. J. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. **Infection and immunity**, 1996. v. 64, n. 6, p. 1885–91

- HATANAKA, T.; KAWAKAMI, K.; URAJI, M. Inhibitory effect of collagen-derived tripeptides on dipeptidylpeptidase-iv activity. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, 2014. v. 6366, p. 1–6.
- INDUMATHI, P.; MEHTA, A. A novel anticoagulant peptide from the nori hydrolysate. **Journal of functional foods**, 2016. v. 20, p. 606–617.
- ISHIDA, M. *et al.* Purification and enzymatic properties of a neutral metalloprotease produced from the cold-adapted *Vibrio* species pr21 isolated from deep seawater in sagami bay. **Fisheries science**, 2016. v. 82, n. 4, p. 675–683.
- ISRAEL-ROMING, F. *et al.* Time and temperature stability of collagenase produced by *Bacillus licheniformis*. **Agriculture and agricultural science procedia**, 2015. v. 6, p. 579–584.
- JAIN, R.; JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of streptomyces exfoliatus cfs 1068 using poultry feather. **Indian journal of experimental biology**, 2010. v. 48, n. 2, p. 174–178.
- JANWITTHAYANAN, W. *et al.* In vivo gene expression and immunoreactivity of leptospira collagenase. **Microbiological research**, 2013. v. 168, n. 5, p. 268–72.
- JOVANOVIC, A. *et al.* The influence of metal salts, surfactants, and wound care products on enzymatic activity of collagenase , the wound debriding enzyme. **Wounds**, 2012. v. 24, n. 9, p. 242–253.
- KASSEGNE, K. *et al.* Identification of collagenase as a critical virulence factor for invasiveness and transmission of pathogenic leptospira species. **Journal of infectious diseases**, 2014. v. 209, p. 1105–1115.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, 15 ago. 1970. v. 227, n. 5259, p. 680–685.
- LIMA, C. A. *et al.* Production of a collagenase from *Candida albicans* urm3622. **Biochemical engineering journal**, 2009. v. 43, n. 3, p. 315–320
- _____ *et al.* Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of food science and technology**, 2014. v. 52, n. 7, p. 4459–4466.
- LIMA, L. A. *et al.* Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta amazonica**, 2014. v. 44, n. 4, p. 403–410.

- LIU, J. *et al.* Bovine collagen peptides compounds promote the proliferation and differentiation of MC3T3-e1 pre-osteoblasts. **Plos one**, 2014. v. 9, n. 6, p. 1–6.
- MUSSATTO, S. I. *et al.* Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and bioprocess technology**, 2011. v. 4, n. 5, p. 661–672.
- MURTHY, P. S.; NAIDU, N. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 66, p. 45-58, 2012.
- NAEEM, A.; FATIMA, S.; KHAN, R. H. Characterization of partially folded intermediates of papain in presence of cationic, anionic, and nonionic detergents at low ph. **Biopolymers**, set. 2006. v. 83, n. 1, p. 1–10.
- NAKAYAMA, H. *et al.* Expression of collagenase in *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cold-water disease-affected ayu (*plecoglossus altivelis*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, 2015. n. September 2015, p. 1–10.
- NASCIMENTO, T. P. *et al.* Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subullissimus* ucp 1262 in solid-state fermentation. **Advances in enzyme research**, 2015. v. 3, p. 81–91.
- NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VIII. Green spore group of Microtetraspora, its preferential isolation and taxonomic characteristics. **Journal of Fermentation Technology**, 1971. v. 49, p. 1-7.
- OHBAYASHI, N. *et al.* Enhancement of the structural stability of full-length clostridial collagenase by calcium ions. **Applied and environmental microbiology**, 2012. v. 78, n. 16, p. 5839–5844.
- OKAMOTO, M. *et al.* A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by *Thermophilic bacillus* sp. strain mo-1. **Applied microbiology and biotechnology**, 2001. v. 57, n. 1–2, p. 103–108.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in biotechnology**, 1997. v. 15, n. 12, p. 517–522.
- PAL, G. K.; PV, S. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **Rsc advances**, 2016. v. 6, n. 40, p. 33763–33780.
- PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; SUH, J. W. Extracellular proteases from *Streptomyces phaeopurpureus* expro138 inhibit spore adhesion, germination and appressorium formation in *Colletotrichum coccodes*. **Journal of applied microbiology**, 2013. v. 115, n. 1, p. 207–217

- PETROVA, D.; DEREKOVA, A.; VLAHOV, S. Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp. strain 3b. **Folia microbiol (praha)**, 2006. v. 51, n. 2, p. 93–98.
- PETROVA, D. H.; SHISHKOV, S. A.; VLAHOV, S. S. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. **Journal of basic microbiology**, 2006. v. 46, n. 4, p. 275–285.
- PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied biochemistry and biotechnology**, ago. 1996. v. 60, n. 2, p. 115–122.
- PROKSCH, E. *et al.* Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. **Skin pharmacology and physiology**, 2013. v. 27, n. 1, p. 47–55.
- PUJOL, D. *et al.* The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**. v. 50, p. 423–429, 2013.
- RASKOVIC, B. *et al.* Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. brown turkey) latex. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2014. v. 118, n. 6, p. 622–7.
- REN, Y. *et al.* Isolation and identification of a novel anticoagulant peptide from enzymatic hydrolysates of scorpion (*Buthus martensii* karsch) protein. **Food research international**, 2014. v. 64, p. 931–938
- SAKURAI, Y. *et al.* Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, 2009. v. 73, n. 1, p. 21–28.
- SAYED, M. A.; RAHMAN, T. M. A.; ASSEM, M. M. Cytotoxicity of collagenases and elastases purified from candida species on some carcinoma cell lines. **Jordan j biol sci**, 2012. v. 5, n. 4, p. 321–330.
- SINGH, N.; BHATTACHARYYA, D. Collagenases in an ether extract of bacterial metabolites used as an immunostimulator induces tn α and ifn- γ . **International immunopharmacology**, 2014. v. 23, n. 1, p. 211–221.
- SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* k-1. **Chemical engineering communications**, 3 ago. 2015. v. 202, n. 8, p. 1051–1060.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, out. 1985. v. 150, n. 1, p. 76–85.

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**. v. 16, p. 103-108, 2000.

UESUGI, Y. *et al.* Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. **Biochimica et biophysica acta (bba) - proteins and proteomics**, 2008. v. 1784, n. 4, p. 716–726.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Coffee: world markets and trade. 2015. 2015. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf>>.

WANDERLEY, M. C. De A. *et al.* Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian journal of microbiology**, set. 2016.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, 2004. v. 63, n. 5, p. 520–6.

WEN, H. *et al.* Trivalent metal ions based on inorganic compounds with in vitro inhibitory activity of matrix metalloproteinase 13. **Enzyme and microbial technology**, out. 2016. v. 92, p. 9–17.

YU, Z. *et al.* Primary and secondary structure of novel ace-inhibitory peptides from egg white protein. **Food chemistry**, 2012. v. 133, n. 2, p. 315–322.

ZARINS-TUTT, J. S. *et al.* Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products. **Nat. prod. rep.**, 2016. v. 33, n. 1, p. 54–72.

ZHANG, Y.-Z. *et al.* Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. **Applied and environmental microbiology**, 2015. v. 81, n. 18, p. 6098–6107.

**6 ARTIGO 3 - ANÁLISE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE UMA COLAGENASE
ISOLADA DE *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421**

Possível publicação: World Journal of Microbiology & Biotechnology

Fator de impacto: 1,532

Qualis: B3

ANÁLISE CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE UMA COLAGENASE ISOLADA DE *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421

Elizianne Pereira Costa¹; Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa²; Osmar Soares da Silva⁴; Janete Magali de Araújo³; Ana Lúcia Figueiredo Porto²

1 Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego 1235, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

2 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

3 Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50.670-901, Recife, PE, Brasil.

4 Rede Nordeste de Biotecnologia, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns, PE, Brasil.

*Autor para correspondência:

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

Tel: +55.81.3320.6345

Fax: +55.81. 3320.6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

As colagenases, enzimas que degradam o colágeno, são utilizadas na indústria alimentícia, farmacêutica e como ferramentas biotecnológicas. Essas enzimas possuem diferentes características físico-químicas de acordo com o organismo que as sintetizou. O estudo das reações catalisadas por

enzimas auxilia na definição dos melhores parâmetros físico-químicos e na utilização dessas enzimas. O presente trabalho objetivou analisar parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} , K_{cat} e K_{cat}/K_m) e termodinâmicos de ativação (E_a , ΔG , ΔH , ΔS , ΔG_{E-T} e ΔG_{E-S}) da catálise do azocoll em diferentes temperaturas (25 °C a 60 °C) por uma collagenase isolada de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421. Os valores cinéticos obtidos foram: K_m de 27,14 mg/mol, V_{max} de 714,29 mg/mol/min, K_{cat} de 79,9 s⁻¹ e K_{cat}/K_m de 2,95 ml/mg.s. Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos (a 25°C) foram: E_a de 65,224 KJ/mol, ΔH de 62,75 KJ/mol, ΔS de 1,96 J/mol, ΔG de 62,16 KJ/mol, ΔG_{E-S} de 8,18 KJ/mol e ΔG_{E-T} de -2,64 KJ/mol. Embora a collagenase não tenha apresentado alta especificidade ao substrato, o alto valor da constante de catálise (K_{cat}) permite que a enzima degrade rapidamente o substrato, podendo ser aplicada em processos pouco específicos como o amaciamento de carnes e o curtimento de couros.

Palavras-chave: Collagenase; *Streptomyces antibioticus*; Entalpia; Entropia; Energia Livre de Gibbs.

INTRODUÇÃO

As collagenases (E.C. 3.4.24.3) são um grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar o colágeno. Elas podem ser obtidas de animais, plantas ou micro-organismos, entretanto as collagenases de origem microbiana, ao contrário das demais, clivam a molécula do colágeno em diversos sítios (DUARTE; CORREIA ESTEVES, 2014; ZHANG et al, 2015; PAL; SURESH, 2016). O colágeno está presente em todos metazoários e corresponde a aproximadamente 30% das proteínas em mamíferos, com 29 tipos diferentes de moléculas. É uma proteína formada pela repetição de aminoácidos Gly-X-Y, onde as diferentes combinações de aminoácidos na posição X e Y são responsáveis por sua diversidade. O colágeno constitui diversos tecidos, e é responsável pela firmeza da pele, resistência de ligamentos, adesão celular, regulação do crescimento celular, dentre outros (RICARD-BLUM, 2011). Entretanto, devido à estrutura em tripla-hélice poucas proteases possuem a capacidade de degradá-lo, restringindo-se ao grupo das metalocollagenases e algumas serinoproteases.

As collagenases, por não danificarem a membrana celular, são usadas biotecnologicamente para isolamento de células e cultivo celular (FUJIO et al, 2014; ALIPOUR et al, 2016), no tratamento de doenças fibrosas (GASTON et al, 2015; ZIEGELMANN et al 2016) e no estudo de

tecidos vegetais (LUCZAK et al 2015), além de serem usadas no amaciamento de carne e curtimento do couro (DABOOR et al, 2010).

As enzimas collagenolíticas produzidas por micro-organismos são moléculas diversificadas, com grande variedade de massa molecular, pertencentes aos grupos das metalocolagenases e serinocolagenases, possuindo zinco- ou cálcio- dependência (DABOOR et al, 2010). As collagenases microbianas mais bem estudadas são produzidas por *Clostridium hystolyticum*. Essa bactéria produz as collagenases ColG e ColH, que clivam locais diferentes da ligação Y-Gly no colágeno (ZHANG et al, 2015). Essas enzimas possuem massa molar semelhante, entretanto são decodificadas por genes distintos, resultando em moléculas com diferentes estruturas, afinidade, sítio de clivagem e eficiência catalítica (DUARTE; CORREIA; ESTEVES, 2014; WARWICK et al, 2016).

O estudo das características da enzima e de sua relação com o substrato ajuda a entender como ocorre o processo catalítico e os fatores determinantes para o sucesso da reação enzimática, podendo ser analisados através de fórmulas matemáticas. Para ocorrer uma reação entre a enzima e o substrato, é necessário haver uma mudança conformacional na enzima para que a ligação seja eficiente. Conhecendo os componentes do sistema (reagentes, produto, meio) e seus parâmetros físicos (pH, temperatura, pressão) essas mudanças conformacionais podem ser estudadas a partir de análise termodinâmica, mensurando a troca de energia no sistema durante esse processo, como a Energia livre de Gibbs (ΔG), Entropia (ΔS) e Entalpia (ΔH). Já os parâmetros cinéticos, como a constante de Michaelis (K_m), velocidade de reação (V_{max}) e a constante catalítica (K_{cat}), fornecem informações sobre a especificidade da enzima e a taxa de conversão do substrato em produto (van GELDEREN; MAYER; TESTA, 1994; HAMMES; HAMMES-SCHIFFER, 2015).

Assim, este trabalho objetivou determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação catalisada por uma collagenase isolada de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 na hidrólise do substrato azocoll.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e reagentes

A collagenase utilizada neste estudo foi produzida e purificada através dos parâmetros descritos em estudo prévio, por fermentação submersa da linhagem *Streptomyces antibioticus*

UFPEA3421. Albumina de soro bovino e azo dye-impregnated collagen (azocoll) utilizados nos ensaios foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Kit de determinação de proteínas foi adquirido de Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Espectrofotômetro modelo Ultrospec 7000 (GE healthcare) e leitor de microplacas iMark (Bio-Rad) foram utilizados para as leituras óticas. Todos os reagentes usados tinham grau analítico. A análise estatística foi realizada no software Microsoft Excel 2016.

Quantificação de proteínas e ensaio enzimático

A atividade colagenolítica foi realizada de acordo com metodologia de Chavira et al (1984) com modificações, empregando azo dye-impregnated collagen (azocoll). A reação conteve 0.05 mL de extrato enzimático bruto, 5 mg de azocoll e 0.95 mL de 0.05 M de tampão Tris-HCl (pH 7.8) acrescido de 1 mM de CaCl_2 . A reação ocorreu por 1 h a 37 °C sob constante agitação, e foi parada com uso de banho de gelo. Os tubos foram centrifugados a 15,130 x g por 15 min e suas absorbâncias foram mensuradas a 520 nm. O branco foi preparado com água destilada ao invés do extrato enzimático nas mesmas condições. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0.1 na absorbância. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

As proteínas foram quantificadas de acordo com Smith et al (1985), utilizando um kit de determinação de proteínas e diferentes concentrações de albumina de soro bovino foram usadas para confeccionar uma curva de calibração padrão.

Estudo dos parâmetros cinéticos

No estudo cinético a atividade colagenolítica foi mensurada com diferentes concentrações de azocoll (1, 2.5, 5, 7.5, e 10 mg/ml) nas condições descritas anteriormente. Foi estabelecida a curva de Lineweaver-Burk através do diagrama do duplo recíproco baseada na equação de Michaelis-Menten e então calculadas a velocidade da reação ($V_{\max}$) e a constante de Michaelis-Menten (K_m) a partir da equação 1, enquanto a constante catalítica (K_{cat}) foi calculada de acordo com a equação 2. Adicionalmente, a eficiência catalítica, foi calculada a partir da razão K_{cat}/K_m .

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (1)$$

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[Enzima]} \quad (2)$$

Onde a concentração de substrato [S] e de enzima [Enzima] foram expressas em mg/ml a partir da quantificação de proteínas descrita acima.

Análise termodinâmica da collagenase

A temperatura ótima da collagenase foi analisada no intervalo de temperatura de 25 °C a 90 °C. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a energia de ativação (E_a) a partir da inclinação ($-E_a/R$) do gráfico de Arrhenius.

Para cálculo da Energia livre de ativação (ΔG^*), Energia livre de formação do estado de transição (ΔG_{E-T}), Energia livre de ligação com substrato (ΔG_{E-S}), Entalpia (ΔH^*) e Entropia (ΔS^*) foram utilizadas as equações 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente, descritas por Javed et al (2009).

$$\Delta G^* = -RT \times \ln \frac{K_{cat}h}{K_bT} \quad (3)$$

$$\Delta G_{E-T} = -RT \times \ln \frac{K_{cat}}{K_m} \quad (4)$$

$$\Delta G_{E-S} = -RT \times \ln K_a \quad (5)$$

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (6)$$

$$\Delta S^* = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (7)$$

Onde, h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s); K_b é a constante de Boltzmann ($1,381 \times 10^{-23}$ JK⁻¹); K_a é igual a $1/K_m$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a partir do ensaio enzimático na temperatura de 37 °C e está graficamente demonstrado na Figura 1. As constantes cinéticas da collagenase de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 estão relacionadas na tabela 1, onde a enzima apresentou valores de K_m e K_{cat} de 27,14 mg/mL e $79,9 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo demonstram que a enzima não possui alta afinidade pelo substrato. Robinson (2015) indica que uma enzima produzida por diferentes organismos pode possuir diferentes K_m . Valores baixos de K_m foram obtidos por Fasciglione e colaboradores (2000) ao analisar metaloproteínases recombinantes da matriz (MMP). Baixos valores de K_m indicam que a enzima necessita de pouco substrato para atingir a saturação e a taxa de reação independe da concentração do substrato, todavia, enzimas com altos valores de K_m têm sua reação influenciada pela concentração do substrato, necessitando altas concentrações para atingir sua velocidade máxima de reação (Robinson, 2015). Uma vez que a afinidade entre a enzima e o substrato está relacionada à função da proteína, enzimas com múltiplos sítios catalíticos possuem K_m diferentes para cada substrato. Duarte e colaboradores (2014) evidenciam que as collagenases microbianas são menos específicas que as collagenases de animais, podendo degradar tanto o colágeno nativo (insolúvel) quanto o colágeno desnaturado (solúvel).

Figura 1 – Linearização da curva de Michaelis-Menten através do gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) da hidrólise de azocoll pela collagenase de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421.

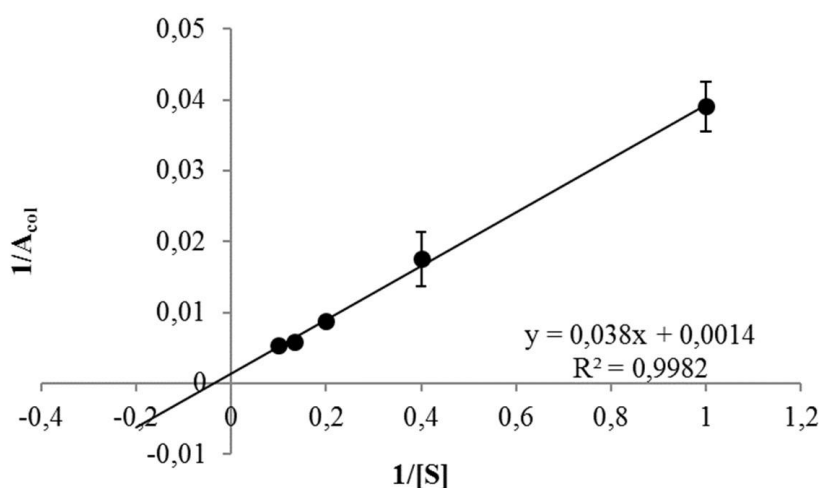


Tabela 1 – Parâmetros cinéticos da reação de hidrólise do azocoll por collagenase de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421.

Constantes cinéticas	
K_m (mg/mL)	27,14
K_{cat} (s^{-1})	79,90
K_{cat}/K_m (mL/mg.s)	2,95
V_{max} (mg/mL/min)	714,29

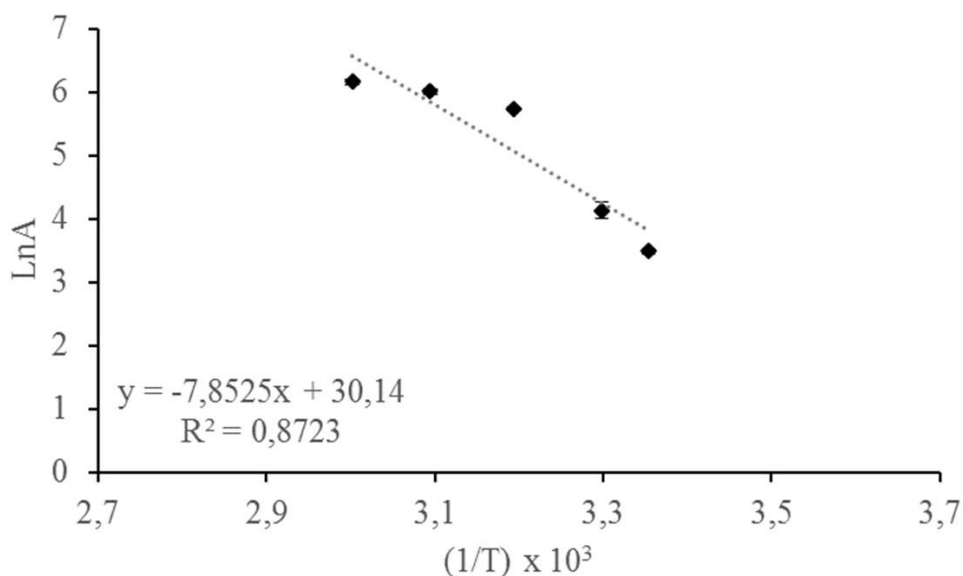
O valor da constante catalítica (K_{cat}), representa a taxa com que a enzima catalisa o substrato num determinado tempo (Bisswanger, 2002). Os valores obtidos neste trabalho indicam que uma molécula da collagenase converte 80 moléculas de substrato por segundo. Quanto maior a razão K_{cat}/K_m , maior a eficiência catalítica dessa enzima, neste estudo, a eficiência catalítica foi de 2,95. Mallya et al (1992) analisaram collagenases comerciais de *Clostridium histolyticum* e obtiveram valor máximo de K_{cat} de $0,58 \mu M s^{-1}$ e $0,3 \mu M s^{-1}$ para collagenase classe I e classe II, respectivamente, quando catalisando a hidrólise de colágeno tipo I. Segundo Xie (2013) um indicativo da efetividade da enzima é a obtenção de baixo K_m e alto K_{cat} , ou alto valor para a razão K_{cat}/K_m . A collagenase de *Streptomyces antibioticus* possui alta capacidade de catálise, como determinado pela constante K_{cat} , entretanto, a baixa especificidade pelo substrato reduz a eficiência dessa enzima.

Avaliação termodinâmica da collagenase

A energia de ativação (E_a), que é a barreira de energia que a enzima precisa superar para conseguir realizar a reação catalítica, influencia diretamente a taxa de reação enzimática, uma vez que quanto maior for E_a maior será a quantidade de energia necessária para a enzima efetuar a reação (SCHIPPER et al, 2014). A partir da inclinação do gráfico de Arrhenius (Figura 2) calculou-se a E_a da collagenase de *S. antibioticus* UFPEDA3421, obtendo-se 65,224 KJ/mol. Esse resultado significa que para a formação do complexo ativado Enzima-Substrato, é necessária energia de 65,224 KJ. Quanto maior a energia de ativação necessária, mais lenta será a reação. A comparação de resultados com outras enzimas relatadas na literatura é complicada devido aos diversos substratos utilizados para quantificação de collagenases. Lima et al (2011) mensurou a energia de ativação de uma collagenase produzida por *Penicillium aurantiogriseum*, obtendo 110,5 KJ/mol, usando azocoll como substrato. Assim, observa-se que a enzima produzida neste trabalho é mais

eficiente para realizar a reação, uma vez que a enzima de *P. aurantiogriseum* requer mais energia para catalisar a mesma reação.

Figura 2 – Gráfico de Arrhenius para a energia de ativação (E_a) da hidrólise do azocoll utilizando a inclinação da reta.



Estão descritos na tabela 2 os parâmetros termodinâmicos de ativação para a collagenase de *S. antibioticus* UFPEDA3421. A entalpia, por definição, é a soma da energia do sistema (E) com o produto do volume (V) e pressão (P), sendo calculada como $H = E + PV$. Uma vez que a maioria dos processos bioquímicos ocorre em pressão quase constante e a variação de volume em sistemas líquidos é mínima, a entalpia pode ser comparada à quantidade de energia presente no sistema (van HOLDE; JOHNSON; HO, 2006). O valor positivo para a entalpia (ΔH) demonstra que a reação catalisada pela enzima é endotérmica, onde a entalpia dos produtos é maior que a entalpia dos reagentes, resultando em absorção de energia do sistema para ocorrer a catálise. Pode-se observar que apesar da diminuição da entalpia da reação (ΔH), a enzima mostrou-se bastante estável, havendo pouca variação entre a entalpia dos reagentes e do produto com o aumento da temperatura.

Uma vez que a variação da entalpia também fornece uma medida das ligações covalentes quebradas para formar o estado de transição, e que a força necessária para quebrar uma ligação hidrofóbica em grupamentos $-CH_2$ é cerca de 5.4 KJ/mol (PACE, 1992), estima-se que a collagenase quebre, em média, aproximadamente 11 ligações durante a formação de seu estado de

transição. Quando comparamos com outras enzimas, Lima et al (2011) também apresentaram um alto valor para ΔH 108,0 KJ/mol de collagenase de *P. aurantiogriseum* na degradação de azocoll. Por outro lado, encontramos nosso resultado superior ao reportado por Abdel-Naby et al (2017), que apresentaram valor de ΔH para protease de *Bacillus stearothermophilus* de 14.626 KJ/mol na degradação de caseína, um valor baixo de entalpia, entretanto condizente com o baixo valor de E_a para essa enzima (17.31 KJ/mol).

Tabela 2 – Parâmetros termodinâmicos de ativação para a collagenase de *S. antibioticus* UFPEDA3421 em várias temperaturas.

Temperatura (°C)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (J/mol)	ΔG (KJ/mol)	ΔG_{E-S} (KJ/mol)	ΔG_{E-T} (KJ/mol)
25 °C	62,75	1,96	62,16	8,18	-2,64
30 °C	62,70	-1,78	63,24	8,32	-2,68
40 °C	62,62	-8,92	65,41	8,59	-2,77
50 °C	62,54	-15,63	67,59	8,87	-2,86
60 °C	62,45	-21,94	69,76	9,14	-2,95

ΔH = Variação de entalpia; ΔS = Variação de entropia; ΔG = Variação da energia livre de Gibbs; ΔG_{E-S} = Variação da energia livre de ligação com o substrato; ΔG_{E-T} = Variação da energia livre de formação do estado de transição

Nas enzimas, a mudança na entropia (ΔS) está relacionada a um conjunto de estados que a proteína, o substrato e o solvente podem ocupar, bem como às mudanças estruturais da proteína durante a reação (WAND; MOORMAN; HARPOLE, 2013). Nos resultados obtidos a partir do presente estudo (tabela 2), observa-se o aumento no módulo da entropia em temperaturas mais elevadas, evidenciando o aumento da desordem no sistema. A existência de ligações estabilizando a enzima e seu estado de transição diminui a orientação randômica das moléculas, consequentemente diminuindo o valor de ΔS (van GELDEREN; MAYER; TESTA, 1994), então o aumento na entropia mostra que há uma mudança conformacional da enzima na ligação ao substrato, enquanto que o sinal negativo desse parâmetro indica que a reação apresenta característica exotérmica, liberando energia no sistema (von STOCKAR; LIU, 1999).

A energia livre de Gibbs (ΔG) determina a viabilidade e extensão da reação catalítica (RIAZ et al, 2007). A magnitude do módulo de ΔG e o sinal (positivo/negativo) da energia, indicam a

espontaneidade da reação. Alto valor de ΔG negativo, indica uma reação espontânea essencialmente irreversível, com perda de energia livre (reação exergônica), enquanto que o alto valor de ΔG positivo indica um sistema equilibrado em que a reação ocorrerá somente se houver absorção de energia do sistema (reação endergônica) (BOTHAN; MAYES, 2016). Assim, a collagenase de *S. antibioticus* UFPEDA3421 apresenta pouca espontaneidade na reação, necessitando absorver energia livre do sistema para catalisar a hidrólise do azocoll. O aumento desse parâmetro de 62,16 KJ/mol (a 25 °C) para 69,76 KJ/mol (a 60 °C) indica a diminuição da probabilidade de acontecer uma reação espontânea com o aumento da temperatura. Isso pode estar relacionado à inativação enzimática irreversível que a maioria das proteases sofre em temperaturas elevadas.

Resultados semelhantes para Energia livre de Gibbs foram reportados em diferentes enzimas microbianas, com valores de 64,57 KJ/mol em endoglucanase isolada de *Aspergillus oryzae* (JAVED et al, 2009), 69,06 KJ/mol para glucoamilase obtida de *Humicola* sp. (RIAZ et al, 2007) e 91,71 KJ/mol para protease isolada de *Bacillus stearothermophilus* (ABDEL-NABY et al, 2017), demonstrando que os valores obtidos no presente trabalho são condizentes com valores de reações enzimáticas catalisadas por outras proteases.

Adicionalmente, a energia livre na ligação com o substrato (ΔG_{E-S}) e no estado de transição (ΔG_{E-T}) apresentaram valores de 8,18 e -2,64 KJ/mol na temperatura de 25°C, respectivamente. Com aumento da temperatura para 60°C, esses valores apresentaram leve aumento, com 9,14 KJ/mol (ΔG_{E-S}) e -2,95 KJ/mol (ΔG_{E-T}). Esses dados revelam que a formação do complexo ativado enzima-substrato e a formação do estado de transição são espontâneos, com a necessidade de pouca energia absorvida (ΔG_{E-S}) ou dissipada (ΔG_{E-T}) para o sistema.

CONCLUSÃO

A collagenase de *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 apresenta-se promissora na degradação de colágeno para processos que não exijam alta especificidade, como o amaciamento de carnes, o curtimento de couro ou a formação de colágeno hidrolisado para ser usado na formulação de nutracêuticos. A utilização de azocoll como substrato para a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos mostrou ser uma metodologia rápida para obtenção de resultados e, por se tratar de uma molécula de colágeno, pode fornecer um indicativo da interação da collagenase com o colágeno nativo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-NABY, M. A. et al. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 96, p. 265-271, 2017.
- ALIPOUR, H. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p. 975–981, 2016.
- BISSWANGER, H. **Enzymes kinetics**: Principles and Methods. Germany: Ed. WILEY-VCH. p. 51-160, 2002.
- BOTHAN, K. M.; MAYES, P. A. Bioenergética: a função do ATP. In: Rodwell, V.W.; Bender, D. A.; Bothan, K. M.; Kennelly, P. J.; Weil, P.A. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30. ed. Brasil: ed. McGraw Hill Brasil. p. 113-118, 2016.
- CHAVIRA, R.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 446–450, 1984.
- DABOOR, S. M. et al. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 6, n. 4, p. 239-263, 2010.
- DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases – A review. **Critical Reviews in Microbiology**. p. 1-21, 2014.
- FASCIGLIONE, G. F. et al. pH- and Temperature-Dependence of Functional Modulation in Metalloproteinases. A Comparison between Neutrophil Collagenase and Gelatinases A and B. **Biophysical Journal**. v. 79, p. 2138-2149, 2000.
- FUJIO, A. et al. Collagenase H Is Crucial for Isolation of Rat Pancreatic Islets. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 10, p. 1187–1198, 2014.
- GASTON, R. G. et al. The Efficacy and Safety of Concurrent Collagenase *Clostridium histolyticum* Injections for 2 Dupuytren Contractures in the Same Hand: A Prospective, Multicenter Study. **The Journal of Hand Surgery**. v. 40, n. 10, p. 1963-1971, 2015.
- HAMMES, G. G.; HAMMES-SCHIFFER, S. Applications of Thermodynamics to Biological Systems. In: _____. **Physical Chemistry for the Biological Sciences**. New Jersey: Ed. John Wiley & Sons, p.43-75, 2015.

- JAVED, M. R. et al. Catalytic and Thermodynamic Characterization of Endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 157, p. 483-497. 2009.
- LIMA, C. A. et al. Production and Characterization of a Collagenolytic Serine Proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial Study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 16, p. 549-560, 2011.
- LUCZAK, M. et al. Collagenase as a useful tool for the analysis of plant cellular peripheries. **Phytochemistry**. v. 112, n. 195-209, 2015.
- MALLYA, S. K.; MOOKHTIAR, K. A.; van WART, H. E. Kinetics of Hydrolysis of Type I, II, and III Collagens by the Class I and II *Clostridium histolyticum* Collagenases. **Journal of Protein Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 99-107, 1992.
- PACE, C. N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. **Journal of Molecular Biology**. v. 226, n. 1, p. 29–35, 1992.
- PAL, G. K.; PV, SURESH. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33763–33780, 2016.
- RIAZ, M. et al. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, 558-564, 2007.
- RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. v. 3, n. 1, p. a004978, 2011.
- ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**. v. 59, p. 1-41, 2015.
- SCHIPPER, L. A. et al. Thermodynamic theory explains the temperature optima of soil microbial processes and high Q10 values at low temperatures. **Global Change Biology**. v. 20, p. 3578-3586, 2014.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85. 1985.
- van GELDEREN, H.; MAYER, J. M.; TESTA, B. Thermodynamic studies of enzyme catalysis: What can we learn about specificity and mechanism? **Biochemical Pharmacology**. v. 47, n. 5, 753-756, 1994.

van HOLDE, K. E.; JOHNSON, W. C.; HO, P. S. **Principles of Physical Biochemistry**. 2. ed. New Jersey: Ed. Pearson Prentice Hall, 2005.

von STOCKAR, U.; LIU, J. –S. Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1412, p. 191-211, 1999.

WAND, A. J.; MORRMAN, V. R.; HARPOLE, K. W. A Surprising Role for Conformational Entropy in Protein Function. **Topics in Current Chemistry**. v. 337, p. 69-94, 2013.

WARWICK, D. et al. Collagenase *Clostridium histolyticum*: emerging practice patterns and treatment advances. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**. v. 50, n. 5, 251-261, 2016.

XIE, X. S. Enzyme Kinetics, Past and Present. **Science**. v. 342, p. 1457-1459, 2013.

ZHANG et al, Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81, n. 18, p. 6098-6107, 2015.

ZIEGELMANN, M. J. et al. Restoration of Penile Function and Patient Satisfaction with Intralesional Collagenase *Clostridium Histolyticum* Injection for Peyronie's Disease. **The Journal of Urology**. v. 195, n. 4, p. 1051-1056, 2016.

CONCLUSÕES

- I. A linhagem analisada foi identificada como *Streptomyces antibioticus*;
- II. Houve produção de proteases nos cinco substratos analisados (resíduo de café, gelatina, farinha de soja, farelo de trigo e penas de galinha);
- III. As principais enzimas produzidas foram: protease, collagenase e queratinase nos meios de cultura contendo farinha de soja, resíduo de café e penas de galinha, respectivamente;
- IV. O meio de cultura contendo resíduo de café mostrou-se favorável à produção de collagenase por *S. antibioticus* UFPEDA3421, obtendo 377.5 U/mL no extrato bruto;
- V. A purificação da enzima por cromatografia de troca iônica, seguida de cromatografia de exclusão molecular, forneceu uma collagenase com alto fator de purificação;
- VI. A collagenase de *S. antibioticus* UFPEDA3421 apresenta atividade máxima a em pH 7,0 e a 60 °C, mostrando estabilidade entre os pHs 5.0 e 11.0, e na faixa de temperatura entre 30 °C e 50 °C;
- VII. A inibição da atividade collagenolítica por EDTA sugere que a collagenase pertence ao grupo das metaloproteases;
- VIII. A collagenase purificada apresenta massa molar estimada por cromatografia de exclusão molecular em 41,3 kDa;
- IX. A degradação de colágeno tipo I e colágeno tipo V produziu peptídeos com atividade anticoagulante, retardando o tempo de coagulação sanguínea em até 88s;
- X. A análise dos parâmetros cinéticos da collagenase purificada indicou que a enzima possui baixa especificidade e alta taxa de catálise;
- XI. Os parâmetros termodinâmicos apresentaram os valores (a 25°C): E_a de 65,224 KJ/mol, ΔH de 62,75 KJ/mol, ΔS de 1,96 J/mol, ΔG de 62,16 KJ/mol, ΔG_{E-S} de 8,18 KJ/mol e ΔG_{E-T} de -2,64 KJ/mol;
- XII. *Streptomyces antibioticus* UFPEDA3421 é uma fonte de proteases importantes nos setores farmacêutico, alimentício e têxtil, podendo utilizar diversos substratos para produção destas enzimas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. M. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardiosis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. **Egyptian Pharmaceutical Journal**. v. 12, p. 109-114, 2013.
- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 798-811, 2015.
- ADRIO, J.; DEMAINE, A. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- ALIPOUR, H. et al. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6 n. 11, p. 975–981, 2016.
- AWAD, H. M. et al. A new chitinase-producer strain *Streptomyces glauciniger* WICCA03: isolation and identification as a biocontrol agent for plants phytopathogenic fungi. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 28, n. 24, p. 2273-2277, 2014.
- BAEHAKI, A. et al. Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, n. 10, p. 2373-2379, 2012.
- BALAN, D. et al. Novel Fungal Collagenase from *Aspergillus oryzae*. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 18, p. 160-163, 2013.
- BARRET, A. J. Peptidases: a view of classification and nomenclature. In: TURK, V (Ed.) **Proteases: New Perspectives**. Ed. Springer Basel AG. p.1-12, 1999.
- BATISTA, J. M. S. et al. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 69, n. 1, 2017.
- BCC RESEARCH. Report BIO030 J **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. BCC Research: Wellesley, MA, USA, 2017.
- BELGASEM, F. F. B.; SALLEH, H. M. Characterization of Recombinant Enzymes. In: AMID, A. (Ed.) **Recombinant Enzymes - From Basic Science to Commercialization**. Ed. Springer International Publishing. p.41-60, 2015.

BHAGWAT, P. K.; JHAMPLE, S. B.; DANDGE, P. B. Statistical Medium Optimization for the Production of Collagenolytic Protease by *Pseudomonas* sp. SUK Using Response Surface Methodology. **Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 520-530, 2015.

BISEN, P. S.; SHARMA, A. **Introduction to Instrumentation in Life Sciences**. Ed. CRC Press. 383p. 2012.

BONNET, E. et al *Actinomadura meyeriae* osteitis following wound contamination with hay in a woman in France: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v. 5, n. 32, p. 1-4, 2011.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**. v. 73, p. 3-12, 2015.

CAMARGO, A. C. M. et al. **Bioactive Peptides Produced by Limited Proteolysis**. Ed. Morgan & Claypool Life Sciences. 92p. 2012.

CAMPBELL, M.; FARREL, S. **Biochemistry**. 7. ed. Canadá: Ed. Cengage Learning, 864p. 2011.

CHAKRABARTI, S.; PATEL, K. D. Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. **Experimental Lung Research**. v. 31, p. 599-621, 2005.

CHENG, X. et al. The Biobleaching Effects of Xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 on Bagasse Pulp. **Applied Mechanics and Materials**. v. 535, p. 772-775, 2014.

COPELAND, R. A. **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanisms, and data analysis**. 2. ed. New York, USA: Ed. John Wiley & Sons. 416p. 2004.

CROWELL, A. M. J.; WALL, M. J.; DOUCETTE, A. A. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**. v. 796, p. 48-54, 2013.

CUÉLLAR, V. G. et al. Correlation of Synovial Fluid Biomarkers With Cartilage Pathology and Associated Outcomes in Knee Arthroscopy. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**. v. 32, n. 3, p. 475-485, 2016.

DABOOR, S. M. et al. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 6, n. 4, p. 239-263, 2010.

_____. et al Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. v. 3, n. 3, p. 191-203, 2012.

DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases – A review. **Critical Reviews in Microbiology**. p. 1-21. 2014.

ENDO, A. et al. Purification and Properties of Collagenase from a *Streptomyces* Species. **Journal of Biochemistry**. v. 102, p. 163-170, 1987.

ENGEL, J.; BÄCHINGER, H. P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. **Topics in Current Chemistry**. v. 247, p. 7-33, 2005.

EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Z. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 30, n. 5, p. 1639-1647, 2014.

FERRARO, V. et al., Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 97, p. 55-66, 2017.

FONSECA, M. I. et al., Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispora* BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 90, p. 29-35, 2014.

FUJIO, A. et al. Collagenase H Is Crucial for Isolation of Rat Pancreatic Islets. **Cell Transplantation**, v. 23, n. 10, p. 1187–1198, 2014.

FYANS, J. K.; BOWN, L.; BIGNELL, D. R. D. Isolation and Characterization of Plant-Pathogenic *Streptomyces* species Associated with common Scab-Infected Potato Tubers in Newfoundland. **Plant Pathology**. v. 62, n. 1, p. 217-225, 2013.

GASTON, R. G. et al. The Efficacy and Safety of Concurrent Collagenase *Clostridium histolyticum* Injections for 2 Dupuytren Contractures in the Same Hand: A Prospective, Multicenter Study. **The Journal of Hand Surgery**. v. 40, n. 10, p. 1963-1971, 2015.

GENILLOUD, O. et al. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 375-389, 2011.

GOSHEV, I. et al. Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 1627-1631, 2005.

HAMDY, H. S. Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*: Production, purification and characterization. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 7, p. 333-340, 2008.

HAMEDI, J. et al, Isolation of a new moderately halophilic broad spectrum antibiotic producing *Actinobacter*. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**. v. 2, n. 2, p. 94-104, 2007.

HARRINGTON, D. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. **Infection and Disease**. v. 64, n. 6, p. 1885-1891, 1996.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed. 528p. 2012.

HATANAKA, T.; KAWAKAMI, K.; URAJI, M. Inhibitory effect of collagen-derived tripeptides on dipeptidylpeptidase-IV activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 6366, p. 1-6, 2014.

ISRAEL-ROMING, F. et al. Time and Temperature Stability of Collagenase Produced by *Bacillus licheniformis*. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. v. 6, p. 579-584, 2015.

JABALIA, N.; MISHRA, P. C.; CHAUDHARY, N. Applications, Challenges and Future Prospects of Proteases: An Overview. **Journal of Agroecology and Natural Resource Management**. v. 1, n. 3, p. 179-183, 2014.

JAIN, R.; JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, p. 174-178, 2010.

JANWITTHAYANANA, W. et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of *Leptospira* collagenase. **Microbiological Research**, v. 168, p. 268-272, 2013.

KÄMPFER, P. Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In. GOODFELLOW, M. et al (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Actinobacteria. 2. Ed. Editora Springer. v. 5. p. 1455-1767. 2012.

KASSENE et al. Identification of Collagenase as a Critical Virulence Factor for Invasiveness and Transmission of Pathogenic *Leptospira* Species. **Journal of Infectious Diseases Advance**. v. 209, n. 7, p. 1105-1115, 2014.

KHATTAB, A. I.; BABIKER, E. H.; SAEED, H. A. *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. **International Current Pharmaceutical Journal**. v. 5, n. 3, p. 27-32, 2016.

LEBEAU, A. M.; CRAIK, C. S. Molecular Recognition Properties of Kallikrein-related Peptidases on Synthetic and Endogenous Substrates. In: MAGDOLEN, V. et al (Ed.). **Kallikrein-related peptidases**: Characterization, regulation, and interactions within the protease web. Alemanha: Editora De Gruyter. 426p. 2012.

LIMA, C. A. et al. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, n. 7, p. 4459-4466, 2014.

_____ et al Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**. v. 75, p. 64-71, 2013.

_____ et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. **Biochemical Engineering Journal**. v. 43, n. 3, p. 315-320, 2009.

LIU, J. et al. Bovine Collagen Peptides Compounds Promote the Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts. **PLoS ONE** v. 9, n. 6, p. e99920, 2014.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

LUCZAK, M. et al. Collagenase as a useful tool for the analysis of plant cellular peripheries. **Phytochemistry**. v. 112, p. 195-209, 2015.

LUDWIG, W. et al. Road map of the phylum Actinobacteria. In. GOODFELLOW, M. et al (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Actinobacteria. 2. Ed. Editora Springer. v. 5. p. 1-28. 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 13. ed. USA: Editora Benjamin Cummings. 2012. 1043p.

MAHDY, A. et al. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semi-continuous anaerobic digestion. **Fuel**. v. 158, n. 15, p. 35-41, 2015.

MALAGÓN, D. et al. Collagenolytic activity related to metalloproteases (and serine proteases) in the fish parasite *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae). **Diseases of Aquatic Organisms**. v. 90, n. 2, p. 129-134, 2010.

MANDADLOU, A.; O'SULLIVAN, S.; SHEEHAN, D. Fast Protein Liquid Chromatography. In: WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. (Ed.) **Protein Chromatography**: Methods and Protocols. Editora Humana Press. 439-448. 2011.

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. **The Histochemical Journal**. v. 17, n. 7, p. 773-785, 1985.

MDIC - Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior. **AliceWeb2**. Disponível em <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>> Acesso em 15 nov de 2015.

MUKHERJEE, J.; WEBSTER, N.; LLEWELLYN, L. E. Purification and characterization of a collagenolytic enzyme from a pathogen of the great barrier reef sponge, *Rhopaloeides odorabile*. **PLoS ONE**. v. 4, n. 9, p. 8-12, 2009.

NAGANO, H; TO, K. A. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 63, n. 7, p. 181-183, 1999.

OKAMOTO, M. et al. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. strain MO-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 57, p. 103-108, 2001.

ONESTI, M. G. et al. Effect of enzymatic debridement with two different collagenases versus mechanical debridement on chronic hard-to-heal wounds. **International Wound Journal**. 2015.

ORFEI, C. P. et al. Dose-Related and Time-Dependent Development of Collagenase-Induced Tendinopathy in Rats. **Plos One**. v. 11, n. 8, p. e0161590, 2016.

PAIVA, K. B. S.; GRANJEIRO, J. M. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 561, n. 1, p. 74 – 87, 2014.

PAL, G. K.; PV, SURESH. Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33763–33780, 2016.

PAUL, T. et al., An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with detergent: towards industrial viewpoint. **Journal of Cleaner Production**. v. 66, p. 672-684, 2014.

PETROVA, D.; DEREKOVA, A.; VLAHOV, S. Purification and Properties of Individual Collagenases from *Streptomyces* sp. Strain 3B. **Folia Microbiol**. v. 51, n. 2, p. 93–98, 2006.

PILLAI, H. P. J. S.; GIRISH, K.; AGSAR, D. Isolation, characterization and screening of actinomycetes from textile industry effluent for dye degradation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 3, n. 11, p. 105-115, 2014.

POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Flórida, USA: Editora CRC Press. 232p. 1989.

PROKSCH, E. et al. Oral Supplementation of Specific Collagen Peptides Has Beneficial Effects on Human Skin Physiology: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 27, p. 47–55, 2014.

QUILLARD, T. et al. Matrix metalloproteinase-13 predominates over matrix metalloproteinase-8 as the functional interstitial collagenase in mouse atheromata. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 34, n. 6, p. 1179-1186, 2014

RASHAD, F. M. et al. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. **Microbiological Research**. v. 175, p. 34-47, 2015.

RASKOVIC, B. et al. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 118, n. 6, p. 622-627, 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. In. RAWLINGS, N. D.; SALVESEN, G. (Ed). **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. Editora Academic Press., v. 1, p.3-19, 2013a.

_____. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. In. _____ (Ed). **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. Editora Academic Press. v. 1, p. 325-370, 2013b.

_____. Introduction: The Clans and Families of Cysteine Peptidases. In. _____ (Ed). **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. Editora Academic Press. v. 2, p. 1743-1773, 2013c.

_____. Introduction: Serine Peptidases and Their Clans. In. _____ (Ed). **Handbook of proteolytic enzymes**. 3. ed. Editora Academic Press. v. 3, p. 2491-2523, 2013d.

REMACLE, A. G. et al. Selective function-blocking monoclonal human antibody highlights the important role of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in metastasis. **Oncotarget**. v. 8, n. 2, p. 2781-2799, 2017.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. v. 3, n. 1, p. a004978, 2011.

RIPPON, J. W.; PECK, G. L. Experimental Infection with *Streptomyces madurae* as a Function of Collagenase. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 49, n. 4, p. 371-378, 1967.

RODRIGUES, C. et al. Nocardiose torácica. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. v. 15, n. 6, p. 1199-1204, 2009.

ROSSO, B. U. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**. v. 335, p. 20-25, 2012.

SAKURAI, Y. et al. Purification and Characterization of a Major Collagenase from *Streptomyces parvulus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 73, n. 1, p. 21-28, 2009.

SALEM, R. B. et al. Thermophilic *Bacillus licheniformis* rbs 5 isolated from hot tunisian spring co-producing alkaline and thermostable α -amylase and protease enzymes. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**. v. 5, n. 6, p. 557-562, 2016.

SANDRI, I. G. et al., Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Science and Technology**. v. 51, p. 469-475, 2013.

SAXENA, S. Microbial enzyme and their industrial applications. In: _____. **Applied Microbiology**. India: Ed. Springer India. p. 121-154. 2015.

SAYED, M. A. et al, Cytotoxicity of Collagenases and Elastases Purified from *Candida* Species on Some Carcinoma Cell Lines. **Jordan Journal of Biological Sciences**. v. 5, n. 4, p. 321-330, 2012.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3.ed. New York. New York: Springer-Verlag. 380p, 1994.

SHARKOVA, T. S. et al. Screening of Producers of Proteinases with Fibrinolytic and Collagenolytic Activities among Micromycetes. **Mikrobiologiya**. v. 84, n. 3, p. 316-322, 2015.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annu Rev Biochem**. v. 78, p. 929-958, 2009.

SINGH, N.; BHATTACHARYYA, D. Collagenases in an ether extract of bacterial metabolites used as an immunostimulator induces TNF- α and IFN- γ . **International Immunopharmacology**. v. 23, p. 211-221, 2014.

SOARES, P. et al. Studies on bromelain precipitation by Ethanol, poly (Ethylene Glycol) and Ammonium Sulphate. **Chemical Engineering Transactions**. v. 24, p. 979-984, 2011.

SORSA, T. et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. **Periodontology** 2000. v. 70, p. 142-163, 2016.

STRAUCH, L. Collagenases from Lower Organisms. In: PEETERS, H. (Ed.) **Protides of the Biological Fluids: Proceedings of the Twenty-Second Colloquium**. Brugge, p. 379-388. 1974.

SUPHATHARAPRATEEP, W.; CHEIRSILP, B.; JONGJAREONRAK, A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. **New Biotechnology**. v. 28, n. 6, p. 649-655, 2011.

TERAMURA, N. et al. Cloning of a Novel Collagenase Gene from the Gram-Negative Bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and Its Efficient Expression in *Brevibacillus choshinensis*. **Journal of Bacteriology**. v. 193, n. 12, p. 3049-3056, 2011.

TIWARI, K.; GUPTA, R. K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 32, n. 2, p. 108-132, 2012.

UESUGI, Y. et al. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1784, p. 716-726, 2008.

USHARANI, N. et al., Stabilization of Collagen Through Bioconversion: An Insight in Protein-Protein Interaction. **Biopolymers**. v. 101, n. 8, p. 903-911, 2014.

VALLI, S. et al. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, n. 6, p. 469-473, 2012.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4.ed. Artmed Editora, 1504p. 2013.

WAHLGREN, J. et al, Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. **Journal of Pathology**. v. 194, p. 217-224, 2001.

WALLS, D.; COONEY, G.; LOUGHRAN, S. T. A synopsis of protein and their purification. In. WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. (Ed) **Protein Chromatography: Methods and Protocols**. 2. Ed. Editora Humana Press. 2017. p. 3-14.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 63, n. 5, p. 520-526, 2004.

WOESSNER JR, J. F. Matrix metalloproteinase and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, 1991.

WOODE, D.; SHIOMI, T.; D'ARMIENTO, J. Collagenolytic Matrix Metalloproteinases in Chronic Obstructive Lung Disease and Cancer. **Cancers**. v. 7, p. 329-341, 2015.

XU, Y. et al. A xylanase from *Streptomyces* sp. FA1: heterologous expression, characterization, and its application in Chinese steamed bread. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 43, n. 5, p. 663-670, 2016.

YADAV, A. N. et al. Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. **Journal of Basic Microbiology**. v. 55, p. 1-14, 2015.

YAMAMURA, H. et al. *Streptomyces hokutonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the strawberry root rhizosphere. **The Journal of Antibiotics**. v. 67, p. 465-470, 2014.

YOSHIKAWA, H. et al. Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 50, p. 865-871, 2012.

ZHANG et al, Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 81, n. 18, p. 6098-6107, 2015.

ZHANG, R.; WANG, A. Modification of wool by air plasma and enzymes as a cleaner and environmentally friendly process. **Journal of Cleaner Production**. v. 87, p. 961-965, 2015.

ZIEGELMANN, M. J. et al. Restoration of Penile Function and Patient Satisfaction with Intralesional Collagenase *Clostridium Histolyticum* Injection for Peyronie's Disease. **The Journal of Urology**. v. 195, n. 4, p. 1051-1056, 2016.

ANEXO

Trabalhos apresentados em congresso

Potencial proteolítico de *Actinomadura* sp. L175 utilizando diferentes substratos

E. P. COSTA¹, R. M. P. BRANDÃO COSTA², J. M. de ARAÚJO³ e A. L. F. PORTO²

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

³ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos

E-mail para contato: elizianne@gmail.com

RESUMO – *Proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e somam um total de 60% do mercado mundial de enzimas. O objetivo deste trabalho foi produzir proteases em diferentes substratos pela linhagem Actinomadura sp. L175. A linhagem foi cultivada em meios de cultura líquidos contendo diferentes substratos como farinha de soja, farelo de trigo, gelatina, resíduo de café e pena de galinha para produção de enzimas caseinolíticas, colagenolíticas, queratinolíticas, coagulantes de leite e fibrinolíticas. As maiores atividades obtidas foram colagenolítica e coagulante de leite (377,5 U/mL e 2,79 U/mL, respectivamente) em resíduo de café; caseinolítica e fibrinolítica (466,17 U/mL e 9,3 U/mL, respectivamente) em farinha de soja, e; queratinolítica (32,96 U/mL) em pena de galinha. Os resultados demonstram que a linhagem de Actinomadura sp. L175 apresenta potencial para produção de proteases com fins biotecnológicos.*

Palavras-chave: *Proteases; Actinomadura; Produção enzimática; Substratos*

1. INTRODUÇÃO

As proteases são o grupo mais importante de enzimas industriais, responsáveis por 60% do mercado mundial de enzimas (Merheb *et al*, 2007). Estas enzimas pertencem ao grupo das hidrolases e clivam ligações peptídicas resultando na liberação de aminoácidos ou peptídeos de uma proteína ou peptídeo maior. Além de estarem presentes em quase todos os organismos suas funções estão relacionadas à manutenção das vias metabólicas normais (ativando proteínas e hormônios), manutenção do sistema imunológico (destruindo proteínas tóxicas de patógenos) e na alimentação (na obtenção de aminoácidos de alimentos proteicos). Entretanto, as enzimas proteolíticas também estão conectadas a processos patológicos como o câncer, artrite reumatoide e doença de Alzheimer, bem como à capacidade de infecção e reprodução de patógenos, e na sua habilidade em obter nutrientes para o seu crescimento (Rawlings, 2013).

Diversos estudos são realizados anualmente em busca de enzimas mais potentes e eficazes nas mais distintas áreas industriais. Isto é impulsionado pela importância dessas enzimas na biotecnologia, como, por exemplo, o papel de proteases fibrinolíticas no setor farmacêutico com o tratamento de doenças cardiovasculares, a capacidade de queratinases no tratamento do couro, na indústria têxtil, a utilização de proteases coagulantes do leite na produção de queijos, dentre outros

(Peng *et al*, 2005; Lemes *et al*, 2016; Merheb-Dini *et al*, 2012; Chaturvedi *et al*, 2014).

As melhores fontes para obtenção de enzimas com aplicação industrial são os micro-organismos. Isso ocorre devido a fatores metabólicos que permitem um rápido crescimento, possibilidade de manipulação genética e alta taxa de recuperação do produto com baixos custos para manutenção e nutrição dos micro-organismos, quando comparado à manutenção de plantas e animais (Saxena, 2015). Os micro-organismos mais utilizados para obtenção de metabólitos biotecnologicamente importantes são as bactérias, entretanto, muitos estudos são realizados com fungos filamentosos, leveduras e actinobactérias como fontes alternativas de biocompostos.

Assim sendo, o presente estudo visa à avaliação da produção de proteases pela actinobactéria *Actinomadura* sp L175 em cultivo submerso utilizando farinha de soja, farelo de trigo, resíduo de café, gelatina e penas de galinha como substrato.

2. METODOLOGIA

2.1. Micro-organismo e meios de cultura

A actinobactéria *Actinomadura* sp L175 foi isolada de rizosfera de *Licania rigida* (Benth.) do Bioma Caatinga e é pertencente ao acervo da Coleção de Culturas da Universidade Federal de Pernambuco. A manutenção da linhagem foi realizada através de repicagens periódicas e mantida sob refrigeração.

O meio de cultivo sólido utilizado para crescimento e manutenção da actinobactéria foi o meio Czapek modificado – MC – composto de glicose (0,3%), NaNO₃ (0,05%), K₂HPO₄ (0,03%), MgSO₄·7H₂O (0,03%), KCl (0,03%), solução mineral (0,1%) e Agar (1,7%) como descrito por Nonomura & Ohara (1971).

O meio de cultura líquido utilizado para obtenção do extrato enzimático foi o meio de farinha de soja modificado – MS2 – composto por extrato proteico de farinha de soja (1,0%), NH₄Cl (0,1%), MgSO₄·7H₂O (0,06%), K₂HPO₄ (0,475%), glicose (1,0%), e solução mineral (0,1%) descrito por Porto *et al* (1996). A farinha de soja foi previamente autoclavada em água para obtenção do extrato proteico que compõe o meio de cultura. Para análise da influência do substrato na produção enzimática a farinha de soja foi substituída por diferentes substratos (gelatina, pena de galinha e extratos proteicos de resíduo de café, farinha de soja e farelo de trigo) na concentração de 1%, exceto as penas de galinha, cuja concentração foi 0,5% devido a sua baixa densidade.

2.2. Cultivo submerso

A linhagem foi cultivada em meio MC por 120h a 37°C em estufa biológica para obtenção de esporos jovens. Após esse período foi realizada a suspensão das células bacterianas em solução de Tween 80 (0,1% v/v), com agitação em vortex para obtenção de uma solução homogênea. Volume de 1mL desta solução (D.O.625nm ≈ 0,100) foi inoculado em frascos Erlenmeyer de

250mL contendo 50 mL do meio MS2 modificado com os diferentes substratos (gelatina, pena de galinha, farinha de soja, resíduo de café e farelo de trigo) e incubados por 72h em agitador orbital 150rpm a 37°C. Após o período de crescimento o líquido fermentado foi filtrado utilizando papel de filtro Whatman n.1 e o líquido metabólico livre de células foi considerado como extrato bruto e utilizado para a quantificação proteica e diferentes atividades enzimáticas.

2.3. Quantificação de proteínas

As proteínas presentes no extrato bruto foram quantificadas segundo metodologia de Smith *et al* (1985) através de kit de determinação de proteínas, utilizando diferentes concentrações de albumina bovina como padrão.

2.4. Ensaios enzimáticos

As proteases foram quantificadas através da atividade caseinolítica descrita por Ginther (1979) com azocaseína (1%) como substrato e mensurada por espectrofotometria ($\lambda_{420\text{nm}}$). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que aumenta 0,01 na densidade ótica em 1h de reação.

A atividade colagenolítica foi determinada através da metodologia de Chavira *et al* (1984) modificado, usando azocoll como substrato e dosado em espectrofotômetro ($\lambda_{520\text{nm}}$). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que aumenta 0,1 na densidade ótica em 1h de reação.

A capacidade fibrinolítica foi determinada de acordo com Wang *et al* (2011) e quantificado por espectrofotometria ($\lambda_{275\text{nm}}$). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que aumenta 0,01 na densidade ótica em 1h de reação.

A atividade queratinolítica foi realizada de acordo com a metodologia de Anbu *et al* (2007) modificado e mensurado em espectrofotômetro ($\lambda_{280\text{nm}}$). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que aumenta 0,01 na densidade ótica em 1h de reação.

A produção de protease coagulante de leite foi realizada segundo Arima *et al* (1970) em solução de leite desnatado reconstituído (10%) acrescido de CaCl_2 (0,01M). O tempo de coagulação, em segundos, foi definido visualmente pelo aparecimento dos primeiros coágulos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que coagula 1mL da solução de leite desnatado acrescido de CaCl_2 nas condições da reação enzimática. Para o cálculo da atividade enzimática foi utilizada a seguinte fórmula:

$$IU = 2400 \times 5 \times t \times 0,5 \quad (1)$$

onde t é o tempo de coagulação da amostra, em segundos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo em meio líquido com diferentes substratos foi favorável ao crescimento microbiano, com formação de pellet visível a olho nu. A mudança das fontes de nitrogênio do meio de cultura revelou que a actinobactéria se adapta ao crescimento em diversos substratos, inclusive aqueles com menor quantidade de nitrogênio livre no cultivo submerso, como no meio de cultura contendo pena de galinha.

Os valores das atividades enzimáticas estão descritos na Tabela 1. Foi evidenciada a produção de todas as proteases analisadas, com atividades enzimáticas variando entre 1,06 U/mL (protease coagulante de leite) e 466,17 U/mL (protease caseinolítica). Há evidências na literatura de detecção de atividades proteolíticas em diversas linhagens do gênero *Actinomadura*, com capacidade de hidrolisar caseína, elastina, gelatina e queratina, dentre outros compostos, sendo este gênero estudado por sua capacidade de produzir enzimas com potencial para serem usadas em diversas áreas da indústria (Harrington, 1996; Madigan *et al*, 2012; Taibi *et al*, 2012; Trujillo; Goodfellow, 2012; Brandeli *et al*, 2015).

Tabela 1 – Atividades enzimáticas de *Actinomadura* sp. L175 cultivado em meio MS2 modificado com diferentes substratos

	Proteína (mg/mL)	A _{Cas} (U/mL)	A _{Col} (U/mL)	A _{Fib} (U/mL)	A _{Que} (U/mL)	A _{Cog} (U/mL)
Gelatina	4,28	52,50	1,40	7,12	***	***
Resíduo de café	3,09	448,33	377,50	7,10	***	2,79
Farinha de Soja	2,32	466,17	344,55	9,30	***	2,11
Farelo de Trigo	3,47	446,00	328,80	8,87	***	1,06
Pena de galinha	2,36	312,50	245,10	6,36	32,96	***

A_{Cas} = Atividade Caseinolítica; A_{Col} = Atividade Colagenolítica; A_{Fib} = Atividade Fibrinolítica; A_{Que} = Atividade Queratinolítica; A_{Cog} = Atividade Coagulante do Leite.

A atividade caseinolítica, é um indicativo da presença de proteases e mostrou que a linhagem *Actinomadura* sp. L175 produz mais proteases quando o nitrogênio disponível se encontra de fácil acesso ao micro-organismo, como no caso dos meios de cultura compostos de extratos proteicos de farinha de soja, resíduo de café e farelo de trigo, com valor máximo obtido no cultivo com farinha de soja, enquanto que o cultivo em meio contendo gelatina é o menos favorável à produção de proteases, apresentando apenas 52,5 U/mL.

Foi evidenciada também alta produção de proteases collagenolíticas em quase todos os substratos utilizados para crescimento, com valores acima de 200 U/mL, destacando-se o potencial de produção em cultivo com resíduo de café, atingindo valores de 377,5 U/mL, ilustrado na figura 1. Apenas o cultivo usando gelatina apresentou baixa produção de collagenases (1,4 U/mL). A ausência de produção de proteases collagenolíticas utilizando a gelatina induz a especular que a enzima produzida por *Actinomadura* sp. L175 possa ser uma collagenase verdadeira, uma vez que diversos estudos apontam que apenas collagenases verdadeiras conseguem hidrolisar o colágeno natural, enquanto que as demais proteases com atividade collagenolítica limitam-se a clivar o colágeno desnaturado, como a gelatina (Zhang *et al*, 2015; Duarte *et al*, 2014; Daboor, 2010).

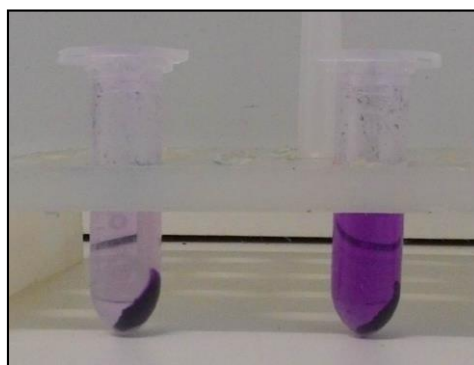


Figura 1 – Liberação de pigmento pela degradação do substrato azocoll, evidenciando a atividade collagenolítica de *Actinomadura* sp. L175. À esquerda observa-se o branco da atividade com água, enquanto que à direita vê-se a atividade collagenolítica do extrato bruto no cultivo com resíduo de café.

Embora a atividade queratinolítica tenha sido observada apenas no meio de cultura contendo pena de galinha, foi obtido 32,96 U/mL de enzimas queratinolíticas, apresentando alta degradação das penas, como mostrado na figura 2. Estudos realizados por Habbeche e colaboradores (2014) e Jani e colaboradores (2014) evidenciam a degradação de penas por linhagens de *Streptomyces*, *Actinomadura* e *Saccharothrix* com alta produção de enzimas queratinolíticas, corroborando os resultados obtidos neste trabalho que demonstram que a linhagem de *Actinomadura* sp. L175 possui potencial para obtenção de queratinases a partir de penas de galinha.

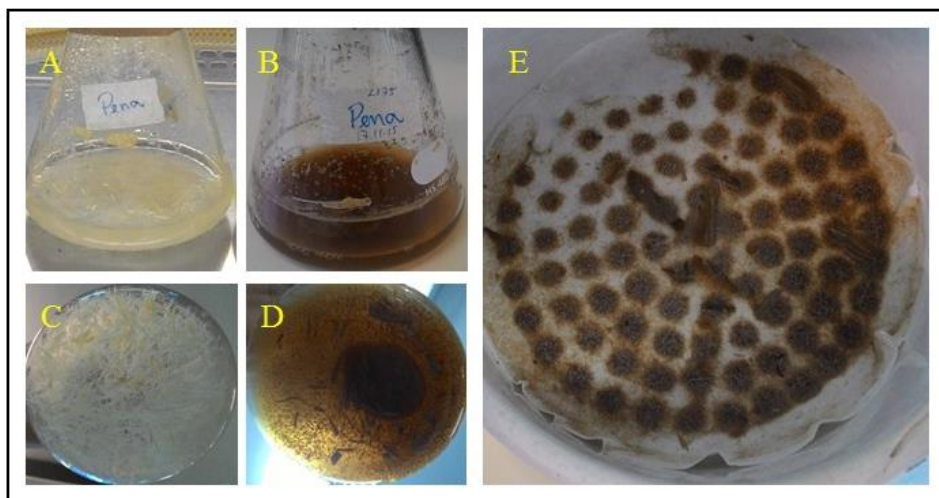


Figura 2 – Cultivo de *Actinomadura* sp. L175 em meio MS2 modificado contendo penas de galinha. [A] Meio de cultura sem inóculo; [B] Meio de cultura após 120h de crescimento; [C] Visão inferior do meio de cultura sem inóculo; [D] Visão inferior do meio de cultura após 120h de crescimento; [E] Filtrado das penas no líquido fermentado após 120h de crescimento.

As menores atividades enzimáticas observadas foram a coagulante do leite e a fibrinolítica. As proteases coagulantes de leite tiveram valor máximo de 2,79 U/mL no cultivo com resíduo de café e quantificadas apenas nos meios de cultura compostos por extratos proteicos, os demais meios de cultura não apresentaram formação de coágulos. Para atividade fibrinolítica, os meios de cultura contendo farinha de soja e farelo de trigo foram mais propícios à produção enzimática, com valores de 9,3 e 8,87 U/mL, respectivamente. Enquanto isso, o meio contendo pena de galinha como substrato apresentou o menor valor em atividade fibrinolítica (6,36 U/mL).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes atividades enzimáticas mensuradas mostram produção de diversas enzimas proteolíticas pela linhagem *Actinomadura* sp L175, com potencial utilização industrial, onde observou-se atividade para todas as enzimas analisadas, com maior destaque para a produção de proteases collagenolíticas e caseinolíticas. Os valores enzimáticos observados poderão ser aumentados após posterior otimização do meio de cultivo, embora os resultados prévios aqui descritos confirmem a habilidade de utilização de diversas fontes de nutrientes para obtenção de enzimas de interesse industrial a partir do cultivo submerso de *Actinomadura* sp. L175.

5. REFERÊNCIAS

ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. *Methods in Enzymology*. In: PERLMANN, G.;



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

LORAND, L. (ed.). Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. Editora Academy Press, NY, USA. 1970. p. 446-459.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Res Int.* v.73, p.3-12, 2015.

CHATURVEDI, V.; BHANGE, K.; BHATT, R.; VERMA, P. Production of kertinasas using chicken feathers as substrate by a novel multifunctional strain of *Pseudomonas stutzeri* and its dehairing application. *Biocatal Agric Biotechnol.* v.3, n.2, p.167-174, 2014.

CHAVIRA, R.; BURNET, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying Proteinases with Azocoll. *Anal. Biochem.* 136, 446-450. 1984.

DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S. L.; DAVE, D. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *Am J Biochem Biotechnol* v.6, n.4, p.239-263, 2010.

DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases – A review. *Cr Rev Microbiol.* p.1-21, 2014.

GINTHER, C.L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamadurans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 15, 522-526. 1979.

HABBECHÉ, A.; SAOUDI, B.; JAOUADI, B.; HABERRA, S.; KEROUAZ, B.; BOUDELA, M.; BADIS, A.; LADJAMA, A. Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomyces keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *J Biosci Bioeng.* v.117, n. 4, p. 413-421, 2014.

HARRINGTON, D. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. *Infect Immun.* v.64, n.6, p.1885-1891, 1996.

JANI, S. A.; SONI, R.; PATEL, H.; PRAJAPATI, B.; PATEL, G. Screening, isolation and characterization of keratin degrading actinomycetes: *Streptomyces* sp. and *Saccharothrix xinjiangensis* and analyzing their significance for production of keratinolytic protease and feed grade aminoacids. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* v.3, n.9, p.940-955, 2014.

LEMES, A. C.; PAVÓN, Y.; LAZZARONI, S.; ROZYCKI, S.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. *LWT-Food sci technol.* v.66, p.217-224, 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARCK, D. P. *Brock Biology of Microorganisms*. 13. ed. USA: Editora Benjamin Cummings. 2012. 1043p.

MERHEB, C.W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem.* 104:127-131. 2007.

MERHEB-DINI, C.; GARCIA, G. A. C.; PENNA, A. L. B.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indica-seudaticae* N31 as coagulant and

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

changes during ripening of Prato cheese. *Food Chem.* v. 130, p.859-865, 2012.

NONOMURA, H.; OHARA, Y. Distribution of actinomycetes in soil. VIII. Green spore group of *Microtetraspora*, its preferential isolation and taxonomic Characteristics. *J Ferment Technol* 49, p.1-7. 1971.

PENG, Y. YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.69, n.2, p.126-132, 2005.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA-FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60, 115-122. 1996.

RAWLINGS, N. D. Protease Families, Evolution and Mechanism of action. In: BRIX, K.; STÖCKER, W. (ed.) *Proteases: Structure and Function*. Editora Springer Science & Business Media, 2013. p.1-36.

SAXENA, S. Microbial enzyme and their industrial applications. In: _____. *Applied Microbiology*. Editora Springer India. 2015. p. 121-154.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85. 1985.

TAIBI, Z.; SAOUDI, B.; BOUDELAA, M.; TRIGUI, H.; BELGHITH, H.; GARGOURI, A.; LADJAMA, A. Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 Isolated from Poultry Compost. *Appl Biochem Biotechnol.* v.166, p.663-679, 2012.

TRUJILLO, M. E.; GOODFELLOW, M. Genus iii. *Actinomadura* lechevalier and lechevalier 1970a, 400al emend. Kroppenstedt, stackebrandt and Goodfellow 1990, 156. In: GOODFELLOW, M. et al (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Actinobacteria*. 2. Ed. Editora Springer. 2012. v.5. p.1940-1959.

WANG, S.L.; WU, Y.Y.; LIANG, T.W. Purification and Biochemical Characterization of a Nattokinase by Conversion of Shrimp Shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnol*, 28, 196-202. 2011.

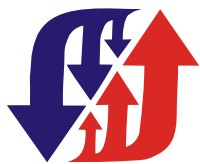
ZHANG, YZ.; RAN, L.Y.; LI, CY.; CHEN, XL. Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. *Appl Environ Microbiol.* v.81, n.18, p.6098-6107, 2015.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação das condições de detecção de atividade colagenolítica de *Actinomadura* sp.

Elizianne Pereira Costa¹, Felype Thomaz de Brito Rocha², Wendell Wagner Campos Albuquerque², Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa², Janete Magali de Araújo¹ e Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas
– 50670-901 Recife – PE

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal
52171-900 Recife – PE

RESUMO

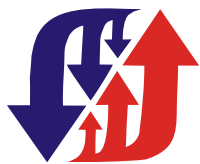
Ensaio de detecção de atividade proteolítica utilizam, normalmente, substratos cromogênicos, sendo um dos mais empregados o ensaio colagenolítico com azocoll. O objetivo deste trabalho foi analisar a interferência da velocidade na reação enzimática de extrato bruto de Actinomadura sp. L175 com azocoll a 37°C com e sem incubação em banho-maria. O extrato bruto obtido após 120h de cultivo submerso da actinobactéria foi submetido à avaliação da atividade colagenolítica com azocoll sob agitação constante de 100, 200, 250, 300 e 400 rpm com agitador magnético a 37°C. A atividade enzimática mostrou-se proporcional ao índice de rotação. Os picos de atividade foram observados a 300 rpm sem banho-maria (314,6 U/mL) e 400 rpm com banho-maria (295,1 U/mL). Esses resultados demonstram que tanto a frequência de agitação quanto a incubação em banho-maria influenciam a atividade colagenolítica e o rendimento da reação depende do controle dessas condições.

Palavras-chave: rendimento de reação; *Actinomadura*; atividade colagenolítica; agitação

INTRODUÇÃO

Enzimas proteolíticas são hidrolases que clivam ligações peptídicas liberando aminoácidos ou peptídeos. Elas estão relacionadas à manutenção das vias metabólicas normais, manutenção do sistema imunológico e na alimentação. Entretanto, também estão ligadas a processos patológicos como o câncer, artrite reumatoide e doença de Alzheimer, bem como à capacidade de infecção e reprodução de patógenos e na sua habilidade em obter nutrientes para crescimento (Rawlings, 2013).

A especificidade das enzimas está relacionada à ligação entre a enzima e o substrato, entretanto a reação enzimática também depende da concentração da enzima e concentração do substrato (Pandey & Ramachandran, 2006; Furlan & Pant, 2006). A detecção de proteases produzidas por animais, plantas e micro-organismos é feita a partir de hidrólise de substratos específicos para análise de extratos enzimáticos ou enzimas puras. Esses substratos são, normalmente, substâncias protéicas ligadas a moléculas cromogênicas que, a partir da clivagem das ligações peptídicas, liberam o corante que é detectado espectrofotometricamente (Komsa-Penkova et al, 1997; Arnaut et al, 2006; Karn & Karn, 2014).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Azocoll é um substrato insolúvel composto de colágeno desnaturado ligado covalentemente a um corante vermelho que é liberado após a hidrólise das ligações peptídicas. A atividade collagenolítica com azocoll é largamente utilizada nos estudos para produção de proteases com capacidade de degradar componentes da pele, sendo um dos métodos mais fáceis para sua detecção (Arnout et al, 2006; Dettmer et al, 2012; Thekkiniath et al, 2013; Wang et al, 2015).

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da agitação na detecção da atividade collagenolítica de extrato enzimático obtido por fermentação submersa de *Actinomadura* sp. L175 utilizando azocoll incubado ou não em banho-maria.

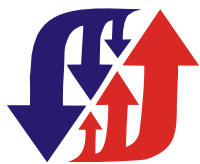
MATERIAL E MÉTODOS

O extrato enzimático utilizado nas análises foi obtido através do cultivo submerso da linhagem de actinobactéria *Actinomadura* sp L175 em meio de farinha de soja modificado – MS2 – descrito por Porto et al (1996) e composto por extrato proteico de resíduo de café (1,0%), NH_4Cl (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.06%), K_2HPO_4 (0.475%), glicose (1,0%), e solução mineral (0,1%). O resíduo de café foi previamente autoclavado em água (121°C / 20min) para obtenção do extrato proteico que compõe o meio de cultura. O cultivo ocorreu em agitador orbital utilizando como inóculo 1mL de suspensão de esporos e células bacterianas em solução de Tween 80 (0,1% v/v), com concentração de 10^6 células/mL ($\text{D.O.}_{625\text{nm}} \approx 0,100$) em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura durante 120h com velocidade de 150 rpm a 37°C. Após esse período, o líquido fermentado foi filtrado em filtro Whatman n.1 e o líquido livre de células foi considerado como extrato enzimático e utilizado para a quantificação proteica e atividade enzimática.

A quantificação de proteases collagenolíticas foi realizado segundo metodologia de Chavira et al (1984) modificado, utilizando o substrato azocoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) previamente lavado em tampão TRIS-HCl 0,05M pH 8,0 acrescido de CaCl_2 1mM. A reação ocorreu em microtubos polipropileno de 2mL durante 1h em estufa biológica na temperatura de 37°C com agitação constante fornecida por agitador magnético em diferentes velocidades (100, 200, 250, 300 e 400 rpm) incubados com ou sem banho-maria. A atividade enzimática foi dosada em espectrofotômetro ($\lambda_{520\text{nm}}$) e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que proporciona a variação 0,1 na densidade ótica em 1h de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ensaio realizado com a enzima obtida do cultivo submerso de *Actinomadura* sp. L175 mostrou alta atividade enzimática, com valor mínimo de atividade collagenolítica de 71,8 U/mL quando realizado na velocidade de 100 rpm incubado em banho-maria. Entretanto, o maior valor detectado foi de 314,6 U/mL na velocidade de 300 rpm sem incubação em banho-maria (Figura 1).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

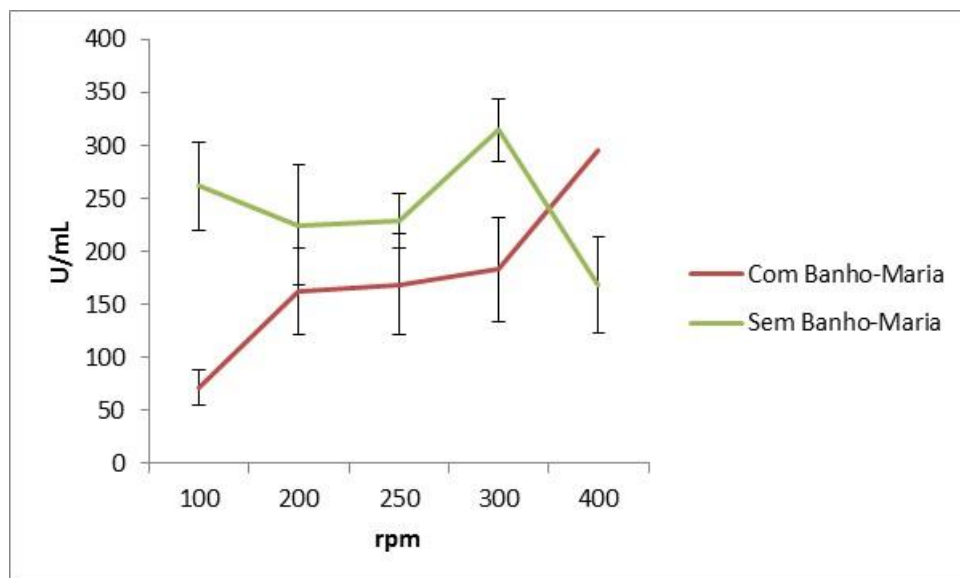


Figura 1 O efeito da agitação na detecção da atividade enzimática de protease collagenolítica de *Actinomadura* sp. L175 utilizando azocoll como substrato.

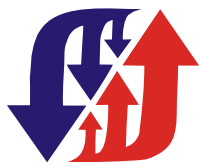
Chavira et al (1984) fizeram diversas análises para determinar a melhor metodologia para quantificação com azocoll, encontrando como melhor resultado a reação enzimática ocorrida em velocidade de 330 rpm. Embora no presente estudo a velocidade de 300rpm foi a mais favorável para detecção de atividade collagenolítica sem incubação em banho-maria, a análise desenvolvida em banho-maria, como no estudo realizado por Chavira et al (1984) demonstra que há um aumento na atividade enzimática com o incremento da velocidade de 300 rpm para 400 rpm, com valores de 183,4 U/mL e 295,1 U/mL, respectivamente (Figura 1). Isto se deve, provavelmente, pela homogeneização do meio de reação, uma vez que o azocoll é insolúvel e sedimenta com o tempo. Essa sedimentação impossibilita a interação entre a enzima dissolvida no meio e o substrato.

Adicionalmente, Ha e colaboradores (2012) demonstram que o aumento no tempo de incubação de proteases comerciais não interfere significativamente na atividade collagenolítica mensurada com azocoll, evidenciando que o tempo de incubação de 1h utilizado no presente trabalho foi suficiente para a detecção da atividade collagenolítica.

Houve diferença na detecção da atividade enzimática com e sem incubação em banho-maria, com melhor atividade na reação em sua ausência. O aquecimento por banho-maria dá-se de forma lenta e homogênea até atingir o equilíbrio térmico entre a água e o material a ser aquecido (Peruzzo, 2013). Dessa forma, as análises realizadas na ausência de banho-maria podem ter mostrado valores maiores pelo rápido aquecimento de forma homogênea por causa da agitação, do meio no qual a reação ocorre, favorecendo a atividade da enzima.

CONCLUSÕES

A agitação foi um fator importante na detecção da atividade collagenolítica, uma vez que o aumento da agitação promoveu um aumento na atividade enzimática. Adicionalmente, a



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

realização dos ensaios enzimáticos sem incubação em banho-maria forneceu maiores valores de atividade enzimática do que os ensaios realizados em banho-maria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnaut LG, Formosinho SJ, Burrows H. 2006. Chemical Kinetics: From Molecular Structure to Chemical Reactivity. Elsevier. pp. 33-76.
- Chavira R, Burnet TJ, Hageman JH. 1984. Assaying Proteinases with Azocoll. Anal. Biochem, 136:446-450.
- Dettmer A, Cavalli E, Ayub MAZ, Gutierrez M. 2012. Optimization of the unhairing leather processing with enzymes and the evaluation of inter-fibrillary proteins removal: an environment-friendly alternative Bioprocess Biosyst Eng. 35:1317–1324.
- Furlan SA, Pant HK 2006 General Properties of enzymes. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Editors. Enzyme Technology. New Delhi: Springer. pp 11-36.
- Ha M, Bekhit AE-DA, Carne A, Hopkins DL. 2012. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. Food Chem. 134:95-105.
- Karn N, Karn SK. 2014. Evaluation and Characterization of Protease Production by *Bacillus* sp. Induced By UV-Mutagenesis. Enz Eng 3:1-5.
- Komsa-Penkova RS, Rashap RK, Yomtova VM. 1997. Advantages of orange-labelled collagen and gelatin as substrates for rapid collagenase activity measurement. J. Biochem. Biophys. Methods 3: 237–249.
- Pandey A, Ramachandran S. 2006 General Introduction. In: Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. Editors. Enzyme Technology. New Delhi: Springer. pp 1-10.
- Peruzzo J. 2013. A Física Através de Experimentos: Termodinâmica, Ondulatória e Óptica. Irani (SC).
- Porto ALF, Campos-Takaki GM, Lima-Filho JL. 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. Appl. Biochem. Biotechnol. 60:115-122.
- Rawlings N D. 2013. Protease Families, Evolution and Mechanism of action. In: Brix K, Stöcker W. Editors. Proteases: Structure and Function. Springer Science & Business Media, pp.1-36.
- Thekkiniath JC, Zabet-Moghaddam M, San Francisco SK, San Francisco MJ. 2013. A novel subtilisin-like serine protease of *Batrachochytrium dendrobatidis* is induced by thyroid hormone and degrades antimicrobial peptides. Fungal Biol. 117:451-461.
- Wang L, Cheng G, Ren Y, Dai Z, Zhao Z-S, Liu F, Li S, Wei Y, Xiong , Tang X-F, Tang B. 2015. Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease. Appl Microbiol Biotechnol. 99:3949-3959.