



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

KESSIA PORFÍRIO DA SILVA SOUZA

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEASES DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262
CULTIVADO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA E SUBMERSA

RECIFE
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGCB

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEASES DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262
CULTIVADO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA E SUBMERSA

Aluna: Kessia Porfírio da Silva Souza.
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Souza Porto.

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Kessia Porfírio da Silva

Produção e extração das proteases de *Mucorsubtilissimus* UCP 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa/Kessia Porfírio da Silva Souza– Recife: O Autor, 2016.

66folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Camila Souza Porto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2016.

Inclui referência e anexo

1. Enzimas proteolíticas 2. Fermentação 3. Fungos I.Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orientadora) II. Porto, Camila Souza (coorientadora) III. Título

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-164

KESSIA PORFÍRIO DA SILVA SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biotecnologia.

Data da aprovação: 23 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

Dr.^a Marcia Nieves Carneiro da Cunha
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

Dr. Vagne de Melo Oliveira
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

*Dedico a Deus que me deu forças para
prosseguir, a toda minha família em especial
aos meus pais e avós que me apoiaram, aos
meus amigos e meu noivo que me
incentivaram a não desistir dos meus
objetivos.*

Tu porém vai até o fim

Daniel 12:13a

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter me desamparado;

As Professoras Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto e Dr^a Camila Souza Porto pela orientação, disponibilidade, pelo apoio e confiança depositados em mim;

A todos que compõe a Pós-graduação em Ciências Biológicas;

Agradeço imensamente a toda minha família, em especial a minha mãe Roseni, meu pai Murilo, meus avós João, Dalva e Dora e ao meu noivo Ibson, pelo amor e apoio incondicional;

Ao meu irmão, tias, primos, cunhada, sogra e sogro pela paciência, compreensão e amizade;

Aos meus amigos da igreja, Hemope, Rural, Liceu, Colégio 2001 e do Laboratório de Tecnologia de Bioativos, obrigada pela força, orações, companheirismo, auxílio e bons momentos compartilhados;

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão desse trabalho;

Muito Obrigada!

RESUMO

As proteases são enzimas com a capacidade de hidrolisar proteínas em peptídeos menores ou aminoácidos livres, sendo essenciais para animais, plantas e micro-organismos devido à sua atuação na regulação metabólica. As proteases são utilizadas com diversas finalidades, no processo industrial da fabricação de detergentes, na indústria farmacêutica e de alimentos, além de ser utilizada na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos. Em virtude da grande importância das proteases este trabalho teve como objetivo comparar a produção de proteases produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS), bem como extrair em Sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Fosfato, as colagenases oriundas de ambas as fermentações. O meio de produção da FES e FS no qual o micro-organismo foi cultivado era constituído principalmente de farelo de soja e farinha de soja. As determinações enzimáticas e dosagem proteica foram realizadas após 72h de fermentação. Para montagem do SDFA foram realizados dois planejamentos fatoriais 2^3 , o primeiro planejamento foi realizado com amostras da FES e o segundo com amostras da FS. Neste sistema foi analisada a influência de três variáveis no processo de extração: massa molar do PEG (200, 550 e 1000 g/mol), concentração do PEG (17,5; 20 e 22,5%) e concentração do sal fosfato de sódio (15; 17,5 e 20%). A maior produção de proteases (362,66 U/ml) ocorreu na FES, enquanto que na FS obteve-se apenas 26,33 U/ml. Dentre as atividades proteicas específicas: colagenolítica, fibrinolítica e queratinolítica, os melhores resultados foram obtidos para a atividade colagenolítica, sendo esta de: 179,81 U/ml, em FES. A colagenase presente no extrato bruto obtida nos processos fermentativos foram particionadas para fase rica em PEG do SDFA. O maior valor para a variável resposta Fator de purificação (FP=3,49) foi obtido no sistema que utilizou o extrato obtido por FES. Com base nas condições estudadas, os dois sistemas mostraram-se viáveis para a extração de colagenase, pois além de ser um processo que pode ser utilizado em larga escala é constituído por componentes de baixo custo e as condições utilizadas no SDFA favoreceram a extração desta enzima. Todavia, a extração da colagenase oriunda da FES foi mais promissora em virtude da maior concentração da enzima de interesse encontrada nesse tipo de fermentação.

Palavras-chave: *Mucor subtilissimus*, proteases, colagenases, Fermentação em estado sólido, Fermentação submersa, Sistemas de duas fases aquosas.

ABSTRACT

Proteases are enzymes with the ability to hydrolyze proteins into smaller peptides and free amino acids. They are vital for animals, plants and micro-organisms due to their role in metabolic regulation. Proteases have been used in various purposes, in the industrial process of detergents, pharmaceutical and food industry, as well as being used in the recovery and utilization of waste and by-products. Due to their economic feasibility and great medical and pharmaceutical importance this study aimed to compare the production of proteases produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) as well as extract collagenolytic proteases using Aqueous two-phase system (ATPS) -PEG/Phosphate from both fermentations. The medium composition for the fungal fermentation in SSF and SF was based in soybean flour. Enzymatic determinations and protein levels were performed after 72 hours of fermentation. To mount the ATPS were two 2^3 factorial design, the first planning was carried out with samples of SSF and the second with samples of SF. In this system was analyzed the influence of three variables in the extraction process: PEG molar mass (200, 550 and 1000), the PEG concentration (17,5; 22,5 and 20%) and sodium phosphate salt concentration (15; 17,5 and 20%). The higher proteolytic activity (362,66 U/ml) was produced using SSF, while in the FS was obtained 26,33 U/ml. Among the specific proteolytic activities: collagenolytic, fibrinolytic and keratinolytic, the best results were obtained for the collagenolytic activity, this being: 179,81 U / ml in the SSF. The Collagenase present in the crude extract obtained in the fermentative processes partitioned preferentially to the PEG-rich phase. The highest value for the variable response Purification Factor (PF = 3,49) was obtained in the system that used SSF crude extract. According with the showed results, both extraction systems seemed to be feasible for collagenase extraction, as well as being a process that can be used in large scale, constituted by low cost components and conditions used in this ATPS favored the enzyme extraction. Furthermore, the collagenase extraction from the SSF was more promising because of the higher interest enzyme concentration found in this type of fermentation.

Keywords: *Mucor subtilissimus*, proteases, collagenases, Solid state fermentation, submerged fermentation, aqueous two-phase systems.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
CAPÍTULO 1 REVISÃO DA LITERATURA	
Figura 1. Aplicação da colagenase no tratamento da doença de Dupuytren.	08
Figura 2. Fotomicrografia mostrando as hifas cenocíticas, importante característica do Gênero <i>Mucor</i> .	10
Figura 3. Ciclo reprodutivo de um representante da ordem Mucorales.	11
Figura 4. Representante da ordem Mucorales (<i>Mucor subtilissimus</i>).	11
Figura 5. Esquema da partição de biomoléculas por Sistema de duas fases aquosas.	15
CAPÍTULO 2 Produção e extração das proteases de <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa.	
Figura 1. Teor de proteínas totais obtido por fermentação submersa e em estado sólido pelo <i>Mucor subtilissimos</i> após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.	36
Figura 2. Atividades Proteásicas específicas obtidas por fermentação submersa e em estado sólido pelo <i>Mucor subtilissimos</i> após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.	37
Figura 3. SDS-PAGE corado com nitrato de prata, comparando o perfil proteico de <i>Mucor subtilissimus</i> quando crescido em fermentação submersa e em estado sólido.	37
Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável- resposta o coeficiente de partição da colagenase proveniente da fermentação em estado sólido.	38
Figura 5. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição da colagenase proveniente da fermentação submersa.	39
Figura 6. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da colagenase proveniente da fermentação em estado sólido.	41

- Figura 7.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da colagenase proveniente da fermentação submersa. 41
- Figura 8.** Representação gráfica do fator de purificação da colagenase, oriunda da fermentação em estado sólido, na fase PEG em relação à concentração de fosfato e de PEG. 42
- Figura 9.** Representação gráfica do fator de purificação da colagenase, oriunda da fermentação submersa, na fase PEG em relação à concentração de fosfato e de PEG. 43

LISTA DE TABELAS

	Pág.
CAPÍTULO 1 REVISÃO DE LITERATURA	
Tabela 1. Espécies microbianas relatadas como produtoras de colagenase.	09
CAPÍTULO 2 Produção e extração das proteases de <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa.	
Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 para SDFA de protease colagenolítica em PEG/Fosfato de sódio.	31
Tabela 2. Atividades enzimáticas obtidas por fermentação em estado sólido e submersa pelo <i>Mucor subtilissimos</i> após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.	35
Tabela 3. Resultado do planejamento fatorial 2^3 para extração da colagenase oriunda da fermentação em estado sólido	44
Tabela 4. Resultado do planejamento fatorial 2^3 para extração da colagenase oriunda da fermentação submersa.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PEG	Polietileno glicol
K	Coefficiente de partição
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
MPEG	Massa Molar do Polietileno glicol
CPEG	Concentração de Polietileno glicol
Cfos	Concentração de fosfato
Y	Recuperação
ATPS	Aqueous two phase systems
RPM	Rotações por minuto
ANOVA	Análise de Variância
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PAGE	Gel de poliacrilamida
pH	Potencial hidrogênionico
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FP	Fator de purificação
BM	Balanco de massa

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
INTRODUÇÃO	03
CAPÍTULO 1	05
1. REVISÃO DA LITERATURA	05
1.1 Enzimas proteolíticas	05
1.2 Protease Colagenolítica	07
1.3 Micro-organismos produtores de Colagenases e aplicações das colagenases microbianas	08
1.4 Gênero <i>Mucor</i>	09
1.5 Processos microbianos de produção enzimática	12
1.6 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	14
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	17
CAPÍTULO 2	
Produção e extração das proteases de <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 cultivado em fermentação sólida e submersa.	24
Resumo	26
Abstract	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Micro-organismo	30
2.2 Fermentação em Estado sólido (FES)	30
2.3 Fermentação Submersa (FS)	30
2.4 Extração da protease Colagenolítica em Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	31
2.5 Perfil eletroforético SDS-PAGE	32
2.6 Determinações Analíticas	32
2.6.1 Quantificação Proteica	32
2.6.2 Determinação da Atividade Proteásica	32
2.6.3 Determinação da Atividade Fibrinolítica	32
2.6.4 Determinação da Atividade Colagenolítica	33
2.6.5 Determinação da Atividade Queratinolítica	33
2.6.6 Determinação do Coeficiente de partição (K), Recuperação enzimática (Y), Fator de purificação (FP) e Balanço de massa (BM) para o SDFA	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Produção de proteases por <i>Mucor subtilissimus</i> em FS e FES	35
3.2 Extração líquido-líquido da protease colagenolítica provenientes da FES e FS	38
3.2.1 Coeficiente de Partição (K)	38

3.2.2 Recuperação da colagenase (Y)	40
3.2.3 Fator de Purificação (FP)	42
4. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO I – Guia de autores	50

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos, pois aceleram reações bioquímicas em organismos vivos. Podem ser extraídas a partir de células e em seguida, utilizadas para catalisar processos comercialmente importantes (ROBINSON, 2015). Em 2014, o mercado mundial de enzimas industriais cresceu 5% com uma estimativa de aumento em 14 bilhões de reais neste mesmo ano (NOVOZYMES, 2014).

As proteases pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam uma variedade de proteínas, possuem aplicações na medicina e em vários setores industriais, tais como os setores de alimentos, farmacêuticos, couro, detergente e gestão de resíduos (PALANIVEL et al., 2013; LI et al., 2013).

Dentre as proteases com aplicações industriais destacam-se as colagenases pois são as principais proteases capazes de clivar a fibra do colágeno nativo dos tipos I, II, III, V e IX *in vivo* e *in vitro* (HOLMBECK e BIRKEDAL-HANSEN, 2004). As colagenases agem em diferentes tipos de colágeno e os produtos da reação destas enzimas são os peptídeos de colágeno, estes peptídeos por sua vez, são eficientes no tratamento de doenças como, por exemplo, a supressão de artrite induzida por colágeno e também servem como um pré-tratamento contra a osteoporose (WATANABE, 2004; HWANG et al., 2007; UESUGI et al. 2008).

A maioria das enzimas que apresentam propriedades colagenolíticas e que tem sido aplicada em grande parte dos processos biotecnológicos é oriunda de micro-organismos (DUARTE, 2012). As enzimas podem ser produzidas através de micro-organismos por processos fermentativos (SCHMIDELL et al., 2001; PANDEY, 2003). Esses processos podem ser realizados em substratos sólidos com o cultivo superficial do micro-organismo, neste caso é chamado de fermentação em estado sólido (FES), ou podem ser realizados em meio líquido, fermentação submersa (FS), no qual o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio de fermentação (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011). Geralmente as enzimas produzidas por micro-organismos são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação (GERMANO et al., 2003).

Uma das técnicas de extração e purificação das enzimas é o sistema de duas fases aquosas (SDFA), este é muito utilizado devido ao seu alto teor de água que impede a desnaturação das proteínas. O SDFA é formado por duas fases aquosas imiscíveis, essas fases podem ser dois polímeros ou um polímero e um sal (GAVASANE; GAIKAR, 2003;

SANTOS et al., 2011). Este sistema pode ser utilizado para a purificação de várias moléculas diferentes, pois suas propriedades físico-químicas são alteradas quando se modifica os fatores que influenciam a natureza do sistema. Tais fatores podem ser o tipo do polímero, massa molecular do polímero e concentração, o tipo de sal e sua concentração, pH, tampão de íon e temperatura (PERICIN et al, 2009; SILVA et al., 2013).

Os fungos filamentosos têm sido empregados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico como as enzimas (GERMANO et al., 2003). É relatada a capacidade de *Mucor subtilissimus* de produzir e secretar proteínas (NASCIMENTO et al, 2015), especialmente enzimas, durante seu processo de desenvolvimento em diferentes formas de cultivo, entretanto nenhum trabalho relatou a comparação da produção enzimática deste micro-organismo em diferentes tipos de cultivo. Em virtude disto torna-se interessante comparar a produção de proteases por *Mucor subtilissimus* em cultivos sólido e submerso bem como comparar a extração da protease com maior valor de atividade obtidas em ambos os processos fermentativos.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas ou também chamadas de proteases pertencem ao grupo de hidrolases, pois catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. São encontradas em todos organismos vivos, sendo essenciais para o crescimento e diferenciação celular (SOUZA et al., 2015).

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas em grupos distintos de acordo com sua especificidade ao substrato e modo de ação. São classificadas pelo modo de ação em exopeptidases, estas clivam as ligações peptídicas próximas à região amino ou carboxiterminal do substrato, e endopeptidases que clivam as ligações peptídicas próximas a estas regiões (MONOD et al., 2002; CASTRO et al., 2011).

As proteases exopeptidases dividem-se em: aminopeptidases, carboxipeptidases. As carboxipeptidases atuam na região carboxiterminal da cadeia peptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo. Enquanto que as aminopeptidases atuam na região aminoterminal livre da cadeia polipeptídica podendo liberar um único resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo (RAY et al., 2012).

As proteases ainda podem ser classificadas em: Serino Proteases, Aspártico Proteases, Cisteíno Proteases e Metaloproteases. As serino proteases caracterizam-se pela presença do grupo serina no sítio ativo. São comumente ativas em pH neutro e alcalino (RAO et al., 1998; YIKE, 2011). As aspártico proteases, também conhecidas como proteases ácidas por exibirem atividade máxima entre pH 3 e 4, são endopeptidases que dependem do resíduo ácido aspártico para a realização da atividade catalítica (RAY et al., 2012; CASTRO et al., 2011). As cisteíno proteases dependem da presença da cisteína-histidina no centro catalítico. As metaloproteases são o grupo mais diverso das proteases, são caracterizadas por requerimento de íons bivalentes em pH neutro e alcalino para que ocorra sua atividade e engloba enzimas de variadas origens como toxinas hemorrágicas de cobras venenosas, termolisina de bactérias e mesmo as colagenases de organismos superiores (RAO et al., 1998; BI et al., 2010).

Dependendo da origem das proteases elas podem ter características e aplicações mais específicas. As proteases microbianas podem ser produzidas em grandes quantidades em um curto período de tempo através de fermentação, além disso, os micro-organismos são

considerados como as melhores fontes de obtenção de proteases por conta da sua diversidade bioquímica e susceptibilidade a manipulação genética (SANDHYA et al., 2005).

Dentre as proteases microbianas destacam-se as proteases de origem bacteriana e fúngica, pois podem desenvolver-se em meio simples e barato. A maioria das proteases de origem bacteriana comercializadas é neutra e alcalina, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* por conta da sua facilidade de adaptação e crescimento (AGREBI et al., 2010)

A obtenção de proteases de origem fúngica possuem vantagens como baixo custo e as enzimas obtidas podem ser modificadas facilmente, enfatiza-se ainda que o micélio do fungo não é um problema na produção, pois o mesmo pode ser removido por meio de filtração. Alguns fungos são considerados GRAS (“generally regarded as safe”), ou seja, são geralmente seguros não oferecendo risco a saúde humana tornando sua utilização na produção de proteases ainda mais viável. Além disso, suas enzimas são extracelulares, o que facilita a recuperação do meio fermentado (DIAS et al., 2002).

Estas enzimas proteolíticas compreendem cerca 52% do mercado mundial de enzimas e se destacam na biotecnologia por sua variedade estrutural, mecanismo de ação, diversidade de suas aplicações como enzimas comerciais e industriais, por exemplos, as indústrias de alimentos, detergentes, rações, couro, farmacêutica, química, na síntese de proteínas e tratamentos de resíduos (LI et al., 2013)

Na indústria alimentícia, sabe-se que as proteases produzidas por micro-organismos tem ganhado destaque na produção de queijo, pois é uma alternativa para não utilizar o estômago de bovino jovem como fonte de proteases (CAMPOS et al., 2010). No tratamento de resíduos as proteases com ação queratinolítica são utilizadas em processos biotecnológicos envolvendo a digestão de penas não aproveitadas em curtumes, grandes esforços estão sendo feitos para a redução de resíduos de penas oriundos de aviários, e as proteases são uma excelente solução para este impasse, pois além de degradar as penas pode-se converter o produto final da hidrólise em alimentos industriais, cola, fertilizantes, principalmente em suplemento de rações animais, pois este subproduto é rico em aminoácidos (MAZOTTO et al., 2009; SALES et al., 2008).

Na indústria farmacêutica, as colagenases têm sido largamente utilizadas na medicina com o propósito de debridar feridas necrosadas, escaras, cicatrizes pós-operatórias, e no tratamento de psoríase e pediculoses, em cicatrizes de queimaduras de crianças, em lesões de mamilos de mulheres em aleitamento e no tratamento de cicatrizes hipertróficas (ÖZCAN et al., 2002).

1.2 Protease Colagenolítica

O colágeno é a proteína de origem animal mais abundante, compõe a matriz extracelular, nos organismos multicelulares constitui aproximadamente 30% do total das proteínas e confere função mecânica e estrutural aos tecidos. É encontrado em pele, osso, tendão, dentes, e os vasos sanguíneos (CHATTOPADHYAY et al., 2014). Os vários tipos de colágenos possuem repetições de tripeptídios ricos em glicina envolvidos na formação da estrutura da tripla hélice do colágeno (NAGAI et al., 2002; SHOULDERS; RAINES, 2009).

Devido ao fato do colágeno possuir estrutura rígida sua degradação é realizada por um número limitado de proteases. E esta degradação está relacionada a várias situações fisiológicas; por exemplo, o desenvolvimento ósseo fetal, o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas; e também podem estar relacionadas a patologias como na artrite reumatoide, a invasão de tumor maligno, ulcerações intestinais (OKAMOTO et al 2001).

O colágeno é uma proteína com uma vasta gama de aplicações, sendo o principal componente de couros, colas, gelatina para cápsulas alimentares e farmacêuticas, e cordas para instrumentos musicais e raquetes de tênis (CHATTOPADHYAY et al., 2014). A hidrólise do colágeno resulta em biomoléculas que também possuem interesse medicinal e industrial, como conservantes não alérgicos em medicamentos, ingredientes para alimentos dietéticos e nutrição parenteral e ainda podem ser utilizados na produção de cosméticos (WANTANABE, 2004; OGAWA et al., 2004).

Colagenases são enzimas proteolíticas capazes de degradar moléculas de colágeno em pequenos fragmentos (ROSSO et al., 2012). Em geral, outras proteases não digerem a tripla hélice do colágeno, essa degradação só é possível através da ação de enzimas específicas que requerem íons bivalentes para o desenvolvimento da sua atividade catalítica sendo, portanto, classificadas como metaloproteases (GOSHEV et al., 2005).

As enzimas colagenolíticas têm sido utilizadas nas indústrias de curtumes e peles, em indústrias de processamento de peixe para esfoliar carcaças de lulas, em indústrias de processamento de alimentos, indústrias de fabricação de cerveja para clarificar e estabilizar a cerveja, indústrias de cosméticos, na produção de hidrolisados de proteína, além de serem utilizadas em investigações científicas que se relacionam com a fisiologia animal, especialmente em estudos neurológicos e na remoção dos tecidos conjuntivos no tratamento de feridas (DABOOR et al., 2012).

Existem inúmeras vantagens do uso de colagenases no tratamento de feridas: removem o tecido necrosado com maior eficiência por sua capacidade de hidrolisar vários tipos de

colágeno, são indolores e não hemorrágicos, podem ser usados por longos períodos e também em associação com outros medicamentos, atraem macrófagos e fibroblastos para o local da ferida, aumentam a formação de tecidos de granulação e estimulam o próprio organismo a promover a cicatrização (THALIS et al., 2013).

1.3 Micro-organismos produtores de Colagenases e aplicações das colagenases microbianas

A colagenase de micro-organismos hidrolisam tanto o colágeno nativo como o colágeno desnaturado. Têm afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas. Diferentemente das colagenases extraídas de animais, que só degradam o colágeno nativo (DUARTE et al., 2014).

As enzimas mais proeminentes utilizadas para dissociação de tecidos foram as colagenases obtidas a partir de *Clostridium histolyticum*, um micro-organismo patogênico aos seres humanos. O complexo enzimático é adequado para a separação de tecidos, uma vez que contém a enzima necessária, colagenase, para degradar o colágeno nativo, além das demais enzimas, que hidrolisam as outras proteínas, polissacáridos e lípidos na matriz extracelular. A utilização de misturas de enzimas purificadas é um passo essencial no atual procedimento padrão de isolamento de células a partir de tecido utilizados em culturas de células (SALAMONE et al., 2012).

Uma aplicação significativa da colagenase é no tratamento da doença de Dupuytren (Figura 1), Esta doença é uma afecção da fáscia palmar, caracterizada pela transformação de suas fibras de colágeno, que formam cordas fibrosas que seguem o sentido longitudinal dos dedos e podem retrá-los nos estágios mais avançados. Injeções contendo colagenase de *Clostridium histolyticum* são aplicadas nas cordas fibrosas a fim de remover a contratura (LAWRENCE et al., 2009).

Figura 1 – Aplicação da colagenase no tratamento da doença de Dupuytren.



(A) antes do tratamento, (B) 1 dia após da injeção de colagenase de *Clostridium histolyticum*, (C) 30 dias após a terceira e última injeção (Fonte: LAWRENCE et al., 2009)

Geralmente os micro-organismos que produzem colagenases são agentes infecciosos e estas enzimas contribuem para sua patogenicidade, degradando o tecido conjuntivo do hospedeiro e dessa forma facilitando a entrada do patógeno no tecido conjuntivo (PETROVA; DEREKOVA; VLAHOV, 2006). Colagenases de *Clostridium histolyticum* possui forte atividade, mas sempre apresentam alguns efeitos tóxicos, reduzindo a eficiência de separação das células (SALAMONE et al., 2010). Por esse motivo, houve a necessidade de buscar novos micro-organismos produtores de colagenases (Tabela 1) a fim de que a utilização destas enzimas não fosse restringida pelo fato de ser proveniente de um patógeno e apresentar altos níveis de toxicidade (WU et al., 2010; SALAMONE et al., 2012).

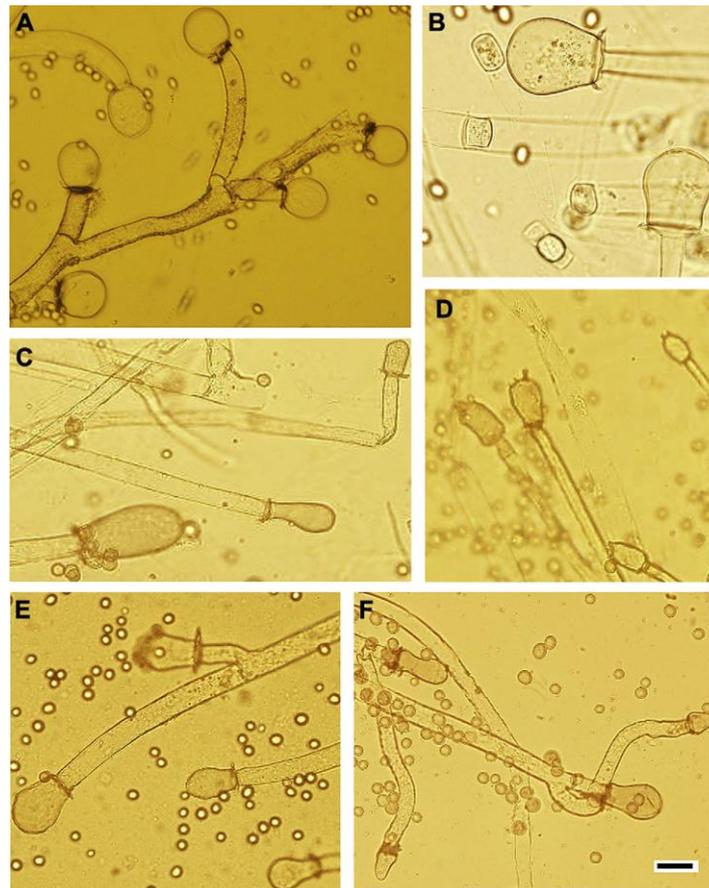
Tabela 1 - Espécies microbianas relatadas como produtoras de colagenase.

MICRO-ORGANISMO PRODUTOR	AUTORES (ANO)
<i>Bacillus subtilis</i>	Nagano et al (1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	Tran; Nagano (2002)
<i>Bacillus pumilus</i>	Wu et al (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Asdornithee et al (1994)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Rosso et al (2012)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima et al (2011)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima et al (2013)
<i>Nocardia</i>	Rippon; Lorincz (1964)
<i>Streptomyces sp</i>	Petrova; Derekova; Vlahov (2006)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nordwig; Jahn (1968)
<i>Aspergillus niger</i>	Barthomeuf; Pourrat; Pourrat (1992)
<i>Eupenicillium javanicum</i>	Neto; Motta; Cabral (2013)
<i>Clostridium histolyticum</i>	Salamone et al (2012)
Micromicetos	Sharkova et al (2015)

1.4 Gênero *Mucor*

O gênero *Mucor* compreende fungos filamentosos com vasto potencial biotecnológico, pois são responsáveis pela produção de enzimas industriais (ALVES et al., 2005), tal gênero está compreendido no filo Zygomycota e pertence a família Mucoraceae da ordem Mucorales (ALEXOPOULOS et al., 1996). Como todo zigomiceto, os fungos do gênero *Mucor* possuem características como a parede celular constituída por quitina e quitosana, o micélio é geralmente cenocítico (Figura 2), ou seja, não apresentam septos, embora estes possam estar presentes na delimitação das estruturas de reprodução (separando os esporângios) ou quando a colônia estiver envelhecida (HERMET et al., 2012).

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando as hifas cenocíticas, importante característica do Gênero *Mucor*.

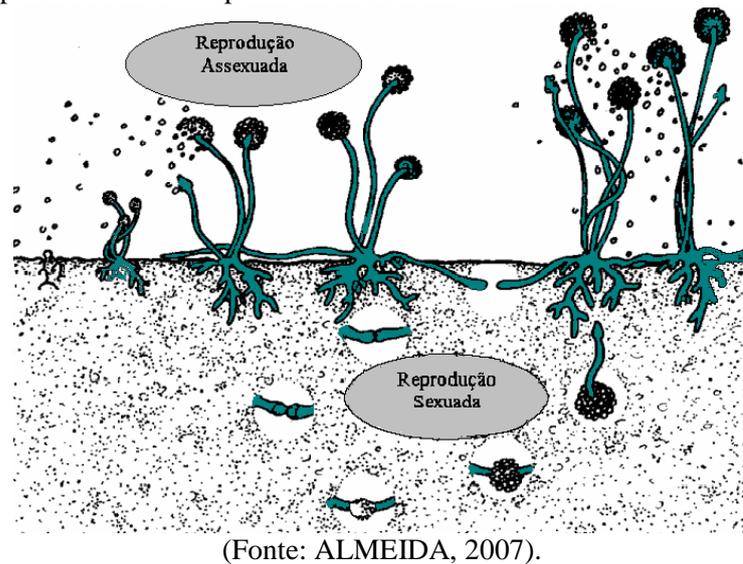


(A) *M. circinelloides*; (B) *M. racemosus*; (C) *M. plumbeus*; (D) *M. plumbeus*; (E) *M. fuscus*; (F) *Mucor lanceolatus* sp. Escala =50 μ m. (Fonte: HERMET et al., 2012).

Os representantes de Mucorales caracterizam-se pelos hábitos cosmopolitas, raramente são micoparasitas, são saprófagos decompondo matéria orgânica animal, vegetal e até mesmo excrementos, sendo desta forma, considerados coprófagos. As enzimas produzidas por esses fungos permitem-lhes decompor açúcares de estrutura molecular mais simples, geralmente presentes nos estágios iniciais ou finais da decomposição dos substratos orgânicos, contribuindo para a ciclagem de nutrientes (CRUSIUS et al., 1997).

A reprodução assexuada da ordem Mucorales consiste no desenvolvimento do micélio vegetativo originando hifas aéreas que formam esporângio, o esporângio por sua vez se rompe liberando os esporangiósporos (esporos) que ao encontrarem substrato ideal germinam e iniciam o ciclo novamente. Enquanto que a reprodução sexuada ocorre com a formação de gametângios (gametas) pelas extremidades das hifas, os gametângios geneticamente compatíveis se fundem e formam o zigósporo que sofre meiose e dar origem a novos esporângios (Figura 3) (CRUSIUS et al., 1997; BONONI et al, 1999) .

Figura 3 - Ciclo reprodutivo de um representante da ordem Mucorales.



Mucorales têm sido exaustivamente explorados em processos biotecnológicos em função de seu rápido crescimento, reunindo organismos que despertam grandes interesses em virtude de sua importância na indústria (KATO et al., 2013; AMARILIS et al., 2013). Esses fungos podem ser facilmente reconhecidos, observando as características macroscópicas, como colônias de lã com pequenos pontos (esporângio) que aparecem em poucos dias espalhadas sobre uma placa com meio de cultivo sólido ou formando “pellets” em cultivo submerso (Figura 4) (KARIMI et al., 2013).

Figura 4 - Representante da ordem Mucorales (*Mucor subtilisssimus*)



(A) *M. subtilisssimus* em cultivo submerso com meio de soja. (B) *M. subtilisssimus* cultivado em meio Batata dextrose ágar. (C) *M. subtilisssimus* cultivado em estado sólido com farelo de soja. (Fonte: arquivo pessoal).

O gênero *Mucor* tem aproximadamente 3.000 espécies, podem ser encontrados no solo, em superfícies de plantas e vegetais em decomposição, e em fezes de herbívoros, esses fungos desempenham um papel importante sendo responsáveis pela colonização primária do substrato (ALVES et al., 2002; INOKUMA et al., 2013; KARIMI; ZAMANI, 2013).

O gênero *Mucor* podem assimilar e fermentar açúcares complexos de forma eficiente, e também podem produzir várias hidrolases extracelulares como é o caso de *Mucor circinelloides* que produz β -glicosidases (KATO et al., 2013). Essa mesma espécie é amplamente utilizadas na produção de biocombustíveis (CARVALHO et al., 2015), além disso, *Mucor circinelloides* é um modelo de destaque dentro do filo Zygomycota devido ao desenvolvimento precoce de técnicas de manipulação genética que foram reforçadas culminando com o sequenciamento de seu genoma (AMARILIS et al., 2013).

Outras espécies do gênero *Mucor* também tem se destacado como importantes fontes de produtos biotecnológicos, como a *Mucor miehei* produtora de lipase (GUSTAFSSON et al., 2012); *M. rouxii* produtora de quitosana (CHATTERJEE et al., 2005); *M. racemosus* produtora de fitase (ROOPESH et al., 2006); *M. mucedo* produtora de aspartil protease (YEGIN et al., 2012); *M. prainii* produtora de glicose desidrogenase (SATAKE et al., 2013). A espécie *Mucor subutilissimus* é utilizada na biotransformação dos esteróides Resibufogenina (ZHAN et al., 2003), além de ser boa produtora de protease fibrinolítica (NASCIMENTO et al., 2015).

1.5 Processos microbianos de produção enzimática

Os processos microbianos são importantes na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas (YOU et al., 2015; CHANDLER et al., 2015; SAHIN et al., 2015; DONIZETE et al., 2015). Podem ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio em fermentações sólidas e submersas (MIYASHIRA; RODRIGUES; KILIKIAN, 2003). A produção de enzimas em escala industrial se faz, majoritariamente, por fermentação submersa (FS), embora nos países orientais exista ainda a tradição da utilização da fermentação em estado sólido (FES) (KIRK et al., 2002; ZHANG et al., 2013).

A FES baseia-se no crescimento dos micro-organismos em substratos sólidos na ausência de água livre, sendo um processo microbiano que geralmente ocorre na superfície ou dentro das partículas dos materiais sólidos que tem capacidade de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis (OLIVEIRA et al., 2012). A quantidade de líquido neste tipo de

fermentação apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos micro-organismos, mas não excede à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PINTO et al., 2006).

Os substratos ou suportes da FES podem ser os mais variados possíveis, como por exemplo: farelo de trigo, milho, cascas de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira, palha (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011). A seleção do substrato sólido na FES é um dos fatores mais importante deste bioprocessos, para escolha do substrato leva-se em consideração o custo e a disponibilidade do mesmo. Estudos têm sido realizados a fim de obter substratos adequados para este tipo de fermentação (DHILLON et al., 2012; ANG ET AL., 2013; MUKHERJEE et al., 2014; GARCÍA et al., 2015).

Em relação à produção e purificação de enzimas a FES na maioria das vezes é preferida por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação (SILVA et al., 2002). O fato desse processo se aproximar o habitat natural dos micro-organismos faz com que estimule o crescimento dos mesmos e conseqüentemente reflita em uma maior produção de biomoléculas (HÖLKER; LENZ, 2005).

Outras vantagens da FES podem ser mencionadas como o meio ser geralmente simples, consistindo de produtos agrícolas não refinados que podem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo, o custo de esterilização é reduzido, pois se aquece menos água, o espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, como a maioria das bactérias requer altos níveis de mistura líquida, a FES exclui, ou reduz, sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana, há um menor custo dos equipamentos, torna-se possível a obtenção de esporos que são impossíveis de se obter em cultura submersa e exige menor demanda de energia. Contudo as medidas de pH, O₂, CO₂ e cálculo de rendimento de produto são mais complexos na FES, além do controle de temperatura, e das variáveis como agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos serem críticos (CASTILHO et al., 2000; SANTOS et al., 2006).

Já a Fermentação submersa é definida como um processo fermentativo que ocorre na presença de grande volume de água, no qual os nutrientes disponíveis apresentam-se dissolvidos no meio de produção (SINGHANIA et al., 2010). Os nutrientes neste tipo de bioprocessos como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons) são dissolvidos em água ou mesmo em soluções tampões. Essas fermentações devem ser mantidas

em agitação constante para ideal aeração e disponibilidade de nutrientes (OLIVEIRA et al, 2012).

É de interesse industrial que os nutrientes relacionados ao meio de crescimento dos micro-organismos contidos na FS sejam de substratos alternativos com menores custos, pois 40% do custo total na produção de enzimas microbianas estão relacionados ao meio de cultivo (VERMELHO et al., 2008). A fim de reduzir este alto custo com meio de produção, estudos foram realizados para obtenção de meio produtivo para cultivo submerso com farinha de soja (PORTO et al.,1996) a fim de tornar o processo de produção enzimática menos oneroso.

A FS conta com equipamentos bem estruturados para sua realização além da vasta gama de pesquisa para o seu controle, a facilidade de controlar os parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato) é o que tem levado a FS a se destacar em relação à produção em larga escala. Além disso, a FS possui melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas de baixa termoestabilidade (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Pode-se destacar também que amostras da FS são utilizadas para determinação das células viáveis e totais, e o sobrenadante é utilizado para a identificação da atividade enzimática. A determinação de biomassa e consequente cinética de crescimento do micro-organismo também é facilitada. Entretanto há uma maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e consequente possibilidade de desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis como bactérias e leveduras (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

1.6 Sistema de duas fases aquosas (SDFa)

O Sistema de duas fases aquosas (SDFa) é utilizado para separação e purificação de biomoléculas, consiste na mistura de dois polímeros, ou de um sal e um polímero em concentrações apropriadas, estes componentes separam-se em duas fases aquosas imiscíveis através de uma perceptível membrana interfacial. Ambas as fases apresentam os dois componentes do sistema, porém em cada fase há a predominância de um deles (YAO et al., 2011).

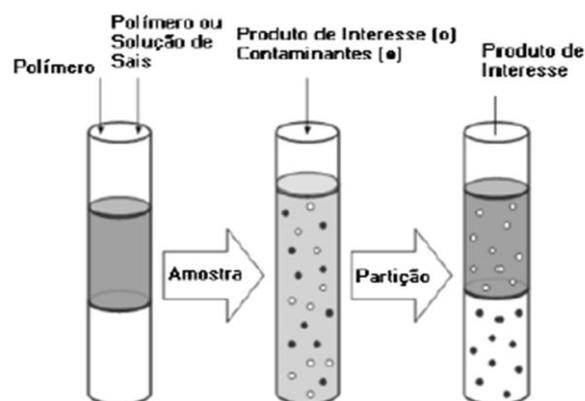
O SDFa quando comparado com outros métodos de isolamento e pré-purificação de moléculas é mais vantajoso principalmente do ponto de vista financeiro, pois técnicas cromatográficas, por exemplo, são mais dispendiosas (AGUILAR et al., 2006; ROSA et al.,

2010) . Outras vantagens oferecidas pelo SDFA na purificação de biomoléculas são: a facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de operação rápida e seletiva; possibilidade de operação à temperatura ambiente (PORTO et al., 2008, COELHO et al., 2013).

O SDFA possui características importantes como alta composição de água aproximadamente 85 a 99%, este fator contribui para que as biomoléculas e partículas celulares não desnaturem ou não sejam facilmente degradadas quando particionadas. Diferentes moléculas podem ser purificadas devido às propriedades físico-químicas dos sistemas bifásicos aquosos são moldadas quando a concentração e composição dos polímeros e sais são alteradas (RESCHKE et al., 2014).

No SDFA, a molécula de interesse migra preferencialmente para uma das fases (Figura 5) e os fatores que geralmente influenciam na migração da biomolécula para qualquer uma dessas fases são: a massa molar do PEG, a concentração do polímero, concentração do sal, o tipo de sal, temperatura, pH , tamanho da molécula estudada, dentre outros fatores (ANDREWS, 2012; SALES et al., 2013).

Figura 5 - Esquema da partição de biomoléculas por Sistema de duas fases aquosas.



(Fonte: Benavides et al., 2008)

O sucesso com sistemas duas fases aquosas depende, principalmente da capacidade de manipular a composição das fases com intuito de obter fases com diferentes propriedades físico-químicas, coeficientes de partição (K) apropriados e seletividade para o material de interesse. Sendo fundamental o estudo dos parâmetros internos e externos que podem influenciar a análise dos resultados (XU et al., 2003).

O sistema bifásico aquoso quando utilizado em grande escala está muito limitado aos sistemas de PEG-dextrana e PEG-sal. Este fato se deve as propriedades físicas favoráveis destes componentes, como por exemplo, à viscosidade e a diferença de densidades entre as fases. Além disso, o SDFA é uma técnica relativamente simples e barata, e pode ser facilmente operado em grande escala, tem uma capacidade de alta resolução e permite clarificação, pré-purificação e concentração (AZEVEDO et al., 2009, RAJA et al., 2012)

O SDFA é uma técnica que demonstrou grande potencial para extração de compostos biológicos tais como de albumina de soro bovino com SDFA/ PEG e citrato de potássio (MIN et al., 2010); de tripsina com SDFA/PEG e citrato de sódio (TUBIO et al., 2009); de protease com SDFA/PEG e sulfato de magnésio (NALINANAON et al., 2009); de α -amilase com SDFA/PEG e citrato de sódio (KAMMOUN et al., 2009); de lipase com SDFA/propanol e fosfato de potássio (OOI et al., 2009) de enzima fibrinolítica com SDFA/PEG e fosfato de potássio (ALI et al., 2014); e de colagenase com PEG e fosfato de sódio (LIMA et al., 2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGREBI, R.; HMIDET, N.; HAJJI, M.; KTARI, N.; HADDAR, A.; FAKHFAKH-ZOUARI, N.; NASRI, M. Fibrinolytic Serine Protease Isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An 6 Grown on Mirabilis jalapa Tuber Powders. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 162, 75–88, 2010.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4ed. New York: John Wiley e Sons, 1996.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. DE; OKADA, K. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p. 114–117, 2005.
- ALVES, M. H.; TRUFEM, S. F. B. Táxons de *Mucor* (Zygomycota) em fezes de herbívoros. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 147–160, 2002.
- ANGA, S.K. et al Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**. 2013.
- ANITHA, T.S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, p. 214–220, 2013.
- ASDORNNITHEE, S. et al. Isolation and characterization of a collagenolytic enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, p. 283–287, 1994.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography**, v.1238, p. 1– 10, 2012.
- BARTHOMEUF, C.; POURRAT, H.; POURRAT, A. Collagenolytic Activity of a New Semi-Alkaline Protease from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.73, p.233-236, 1992.
- BENAVIDES J. et al. Review: Extraction and Purification of Bioproducts and Nanoparticles using Aqueous Two- Phase Systems Strategies. **Chem. Eng Technol.**, v. 31, n. 6, p. 838-845, 2008.
- BI, B. et al. Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 46–53, 2011.
- BONONI, V.L. Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biológicas. **São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente**, p.184, 1999.
- CAMPOS, S.; CLAUDIA, A.; JOSE, F. Preliminary characterization of some Streptomyces species isolated from a composting process and their antimicrobial potential. p. 1847-1856, 2010.
- CASTILHO L. R; MEDRONHO R. A.; ALVES T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, A. M. Produção, Propriedades e Aplicação de Celulasas na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais, **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, H. C.; ABREU, P. A.; GERALDO, R. B. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 24, n. 2, p. 165–81. 2011.

CHANDLER, S. Role of Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* in Mounting Induced Immunity in Rice (*Oryza sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2015.

CHATTERJEE, S. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v.40, p. 395–400. 2005.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. **Biopolymers**, 2014.

COELHO, D. F., et al . Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulfate). **Bioprocess and Biosystems engineering**, v. 36, n. 2, p. 185–92, 2013.

COLLA, L. M. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.101, p. 8308–8314. 2010.

DHILLON, G.S. et al. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.38, p.6– 13, 2012.

DIAS, J. C.C.A. et al. Avaliação da estabilidade in vitro de uma protease comercial. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.54, n. 6. 2002.

DUARTE, A.S.; ESTEVES, A.C.; CORREIA, A. Produção de uma nova collagenase e suas aplicações. **Portugal patent application**, 2012.

GARCIA, L. R. P. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid state fermentation by *Penicillium purpurogenum*, **Food Science and Technology**, v.35, p. 704-711, 2015.

GERMANO, S. et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**,v.32, p. 246-251.

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.

GUSTAFSSON, H. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporoussilica—The effect of varied particle size and morphology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.100, p. 22– 30. 2012.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 64. p.175-186. 2004.

HOLMBECK, K.; BIRKEDAL-HANSEN, H. Collagenases. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, v. 1, p. 478-481. 2004.

- HURST, L.C. et al. Injectable Collagenase Clostridium Histolyticum for Dupuytren's Contracture. **New England Journal of Medicine**, v.361, p. 968-79, 2009.
- HWANG, J.H. et al . Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoei*). **Food Chemistry**, v. 100, p. 921–925. 2007.
- INOKUMA, K.; TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 24–32, 2013.
- KAMMOUN, R. et al. Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 306–312, 2009.
- KARIMI, K.; KARIMI, A.Z.; ZAMANI, A. *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 466–481, 2013.
- KATO, Y. Two new β -glucosidases from ethanol-fermenting fungus *Mucor circinelloides* NBRC 4572: enzyme purification, functional characterization, and molecular cloning of the gene. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.97, p. 10045-10056, 2013
- KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345–351, 2002.
- LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**, v.587, n. 8, p. 1155–63. 2013.
- LIMA, C. A. 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.
- LIMA, C. A. et al. Fermentation Medium for Collagenase Production by *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. **Biotechnol. Prog.**, v. 27, n. 5, 2011.
- LIMA, C.A. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **J Food Sci Technol**, 2014.
- LIU, Z. et al. States and challenges for high-value biohythane production from waste biomass by dark fermentation technolog. **Bioresource Technology**, v.135, p.292–303, 2013.
- MAHESH, R.G.; VILAS, G.G. Aqueous two-phase affinity partitioning of penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 32, p. 665–675. 2003.
- MAZOTTO, A. M. et al. Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.
- MIN, L.Y. et al. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. **Food and Bioproducts Processing**, v.88, p. 40-46, 2010.
- MONOD, M. et al. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical microbiology**, v. 292, p. 405-419.2002.

- MUKHERJEE, R. et al. Defect-induced plating of lithium metal within porous grapheme networks. **Nature Communications**, 2014.
- NAGAI, T.; ARAKI, Y.; & SUZUKI, N. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugurubripes*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 173–177. 2002.
- NAGANO, H.; TO, K.A. Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* fs-2. **Biosc. Biotechnol. Biochem**, v.63, p.181-183, 1999.
- NALINANON, S. et al. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. **Process Biochem**, v. 44, p. 471–476, 2009.
- NASCIMENTO, T. P. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v.3, p.81-91. 2015.
- NETO, Y. A. A. H.; MOTTA, C. M. S.; CABRAL, H. Optimization of metalloprotease production by *Eupenicillium javanicum* in both solid state and submerged bioprocesses **African Journal of Biochemistry Research**, v. 7, n. 8, p. 146-157, 2013.
- NOORMASHELA, U.A. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* biopesticide produced in shrimp pond sludge as alternative culture medium against *Bactrocera dorsalis* (Hendel). **Acta Biologica Malaysiana**, v.4, p. 5-16, 2015.
- NORDWIG, A.; JAIN, W. F. A Collagenolytic Enzyme from *Aspergillus oryzae* Purification and Properties. **European J. Biochem.**, v.3, p.519-529, 1968.
- Novozymes S/A. The Novozymes Report. 2014. Disponível em: <<http://report2014.novozymes.com>>
- OGAWA, N. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). **Losso Food Chemistry**. v.88, p.495–501. 2004.
- OKAMOTO, M. et al. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 57, p.103–108. 2001.
- OLIVEIRA, A.C.D.; et al. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. 2012.
- OOI CW, et al. Direct purification of *Burkholderia pseudomallei* lipase from fermentation broth using aqueous twophase systems. **Biotechnol Bioproc Eng**, v. 14, p. 811–8. 2009.
- ÖZCAN, C. et al. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. **Burns**, v. 28, p. 791–794. 2002.
- PANDEY, A. Solid state fermentation, **Biochemistry Eng. J**, n.113, p.81-84. 2003.
- PERICIN, D. M.; MADAREV-POPOVIĆ, S. Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 1, p. 43–7. 2009.

- PETROVA, D. H.; SHISHKOV, S. A.; VLAHOV, S. S. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. **J. Basic Microbiol.** v.46, p. 275–285, 2006.
- PETROVA, D.; DEREKOVA, A.; VLAHOV, S. Purification and Properties of Individual Collagenases from *Streptomyces* sp. Strain 3B. **Folia Microbiol.**, v.51, p. 93–98, 2006.
- PORTO, T.S. et al. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 716–721, 2008.
- PORTO; CAMPOS-TAKAKI; LIMA, F. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.60, p.115-122. 1996.
- RAJA, S., et al. Aqueous Two-phase Systems for the Recovery of Biomolecules. **A Review. Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2012.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p. 597-635.1998.
- RESCHKE, T.; BRANDENBUSCH, C.; SADOWSKI, G. Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol and inorganic salts as APTS former. **Fluid Phase Equilibria**, v.368, p.91–103, 2014.
- RIPPON, J.W.PH.D.; LORINCZ, A.L.M.D. Collagenase Activity of *Streptomyces (Nocardia)* Mad Urae. **The Journal of Investigative Dermatology**, 1964.
- ROBINSON, P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays In Biochemistry**, p.591-41.2015.
- RODRÍGUEZ-FRÓMETA, R.A. et al. Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 3063–3072, 2013.
- ROOPESH, K. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology**, v.97, p. 506–511, 2006.
- ROSA, P. A. J. et al. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n. 16, p. 2296-2305, 2010.
- ROSSO, B.U. et al. 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.
- SALAMONE M. et al. A new method to value efficiency of enzyme blends for pancreatic tissue digestion. **Transplant Proc.**, v. 42(6), p. 2043–2048, 2010.
- SALAMONE, M. et al. Biochemical Comparison Between *Clostridium Hystoliticum* Collagenases G and H obtained by DNA Recombinant and Extractive Procedures. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, 2012.

- SALES, A. E., et al. Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1676–1688, 2013.
- SALES, M. R. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p.285-288. 2008.
- SANDHYA, C. et al. “Comparative evolution of Neutral proteases production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state-fermentation.” **Process Biochem**, V. 40, p. 2689-2694. 2005.
- SANTOS, V. C. et al. Liquid–liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 75-83, 2011.
- SATAKE, R. Novel glucose dehydrogenase from *Mucor prainii*: Purification, characterization, molecular cloning and gene expression in *Aspergillus soja*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* v. 1, n.6. 2015.
- SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**: Engenharia Bioquímica. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; Milanez, A.I. *Mucorales (Zygomycotina) da Mata Atlântica da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Santo André, SP, 1997.*
- SHARKOVA, T. S. et al. Screening of Producers of Proteinases with Fibrinolytic and Collagenolytic Activities among Micromycetes. **Microbiology**, v.84, p. 359–364, 2015.
- SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annu. Rev. Biochem.** v.78, p. 929-956.2010.
- SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.318-324, 2002.
- SILVA, G.M.M. et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, n. 339, p.52– 57. 2013.
- SOUZA P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 2, p. 337-346. 2015.
- TALLIS, A; Clinical and Economic Assessment of Diabetic Foot Ulcer Debridement with Collagenase: Results of a Randomized Controlled Study. **Clinical Therapeutics**. v.35, n.11.2013.
- TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and Characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its Collagenase Production. *Journal of Food Science*, v. 67, 2002.
- TUBIO, G. et al. Liquid–liquid equilibrium of the Ucon 50-HB5100/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, p. 3–8, 2009.

UESUGI, Y.; ARIMA J.; USUKI, H.; IWABUCHI, M.; HATANAKA, T. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 716–726. 2008.

VERMELHO, A. B. et al. Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**. 2008.

WANDERLEY, M.D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da Produção Industrial de Enzimas. **Ciência Tecnologia Inovação e Oportunidade**, v. 1, n. 1, 2011.

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

WU, Q. et al. Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 129–139, 2010.

YAO, W. et al. System establishment of atps for one-step purification of glutamate decarboxylase from *E. coli* after cell disruption. **Appl Biochem Biotechnol**, v.164, p.1339–1349, 2011.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323. 2011.

ZHAN, J. Directional Modifications of Resibufogenin by *Mucor subtilissimus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21, p. 141-143. 2003.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEASES DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262
CULTIVADO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA E SUBMERSA

Artigo a ser submetido à revista:



Fator de impacto: 3.337

Qualis A₂ para Ciências Biológicas I

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DAS PROTEASES DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262
CULTIVADO EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA E SUBMERSA**

Kessia Porfírio da Silva Souza¹ . Márcia Nieves Carneiro da Cunha² . Amanda Emanuelle Sales² . Thiago Pajeú Nascimento³ . Osmar Soares da Silva² . Tatiana Souza Porto⁴ . Camila Souza Porto⁵ . Ana Lúcia Figueiredo Porto^{2*}

¹ Centro de Ciências Biológicas – CCB. Universidade Federal de Pernambuco. Avenida da Engenharia, s/n - Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil.

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

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Azumi. Universidade Federal de Pernambuco. Avenida da Engenharia, s/n - Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil.

⁴ Unidade Acadêmica de Garanhuns-UAG. Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns – PE, Brasil.

⁵ Unidade de Penedo, Universidade Federal de Alagoas- UFAL. Av. Duque de Caxias, 1074, Penedo, Alagoas, Brasil.

*Autor de Correspondência: Tel: + 55 (81) 3320.6345.

Endereço de e-mail: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

As proteases catalisam a reação de hidrólise das proteínas e se destacam por sua diversidade de aplicações industriais. As proteases colagenolíticas de origem microbiana, por exemplo, têm grande importância em aplicações terapêuticas, por serem enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de diferentes tipos de colágeno. O sistema de duas fases aquosas é um método atrativo para extração e purificação de colagenases. Tal sistema possui baixo custo e não desnatura as enzimas por conter altos níveis de água. Assim, este trabalho teve como objetivo comparar a produção de proteases produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 em fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FS), bem como extrair em Sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Fosfato, as colagenases oriundas de ambas as fermentações. Neste sistema foi analisada a influência de três variáveis no processo de extração: massa molar do PEG (200, 550 e 1000 g/mol), concentração do PEG (17,5; 20 e 22,5%) e concentração do sal fosfato de sódio (15; 17,5 e 20%). A maior produção de proteases (362,66 U/ml) ocorreu na FES, enquanto que na FS obteve-se apenas 26,33 U/ml. Dentre as atividades proteásicas específicas: colagenolítica, fibrinolítica e queratinolítica, os melhores resultados foram obtidos para a atividade colagenolítica, sendo esta de: 179,81 U/ml, em FES. A colagenase presente no extrato bruto obtida nos processos fermentativos foram particionadas para fase rica em PEG do SDFA. O maior valor para a variável resposta Fator de purificação (FP=3,49) foi obtido no sistema que utilizou o extrato obtido por FES. Os resultados mostram que a FES é um método de cultivo promissor na obtenção de proteases principalmente na produção de colagenase através do *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Além de que a extração em SDFA da colagenase presente na FES obteve melhor resultado do fator de purificação, sendo esta mais eficaz do que a extração utilizando amostras da FS.

Palavras-chave: *Mucor subtilissimus*, proteases, colagenases, Fermentação em estado sólido, Fermentação submersa, Sistemas de duas fases aquosas.

ABSTRACT

The proteases catalyze the hydrolysis reaction of the protein and are distinguished by their range of industrial applications. The collagenolytic proteases from microbial source are important enzymes for therapeutic applications, because they are able to hydrolyse peptide bonds of different types of collagen. The aqueous two-phase system is an attractive method for collagenase extraction and purification. This type of extraction system has a low cost and does not denature the enzymes due its composition high water concentrations. Thus, this study aimed to compare the production of proteases produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) as well as extract collagenolytic proteases using Aqueous two-phase system (ATPS) -PEG/Phosphate from both fermentations. In this system was analyzed the influence of three variables in the extraction process: PEG molar mass (200, 550 and 1000), the PEG concentration (17,5; 22,5 and 20%) and sodium phosphate salt concentration (15; 17,5 and 20%). The higher proteolytic activity (362,66 U/ml) was produced using SSF, while in the FS was obtained 26,33 U/ml. Among the specific proteolytic activities: collagenolytic, fibrinolytic and keratinolytic, the best results were obtained for the collagenolytic activity, this being: 179,81 U / ml in the SSF. The Collagenase present in the crude extract obtained in the fermentative processes partitioned preferentially to the PEG-rich phase. The highest value for the variable response Purification Factor (PF = 3,49) was obtained in the system that used SSF crude extract. The results show that SSF is a promising culture method for obtaining proteases mainly the production of collagenase by *Mucor subtilissimus* UCP 1262. In addition to the extraction ATPS of the present collagenase SSF obtained best results purification factor, which is more effective than extraction using samples of SF.

Keywords: *Mucor subtilissimus*, proteases, collagenases, Solid state fermentation, submerged fermentation, aqueous two-phase systems.

1. INTRODUÇÃO

No mercado mundial de enzimas as proteases destacam-se, pois perfazem um total 60 a 65%, sendo utilizadas como detergentes, na transformação do couro, indústrias alimentícias, farmacêuticas e para processos biorremediação (Zaferanloo et al. 2014). Podem ser extraídas de plantas, animais ou produzidas por micro-organismo (Llorente et al. 2014; Medeiros et al. 2015; Silva et al. 2015).

As proteases microbianas de origem fúngica podem ser produzidas em fermentação submersa ou em estado sólido, tais fermentações possuem características próprias, na fermentação submersa o fungo é exposto a forças hidrodinâmicas enquanto que em fermentação sólida, o crescimento se restringe à superfície da matriz sólida. O crescimento do fungo e a produção de metabólitos por estes micro-organismos em tais sistemas dependem da disponibilidade de nutrientes e a configuração geométrica da matriz (Badamchi et al. 2013). O mesmo micro-organismo em diferentes tipos de fermentação podem produzir quantidades diferentes de enzimas ou até mesmo diferentes enzimas (Oda et al. 2006)

Dentre as proteases com importância industrial destaca-se a protease colagenolítica ou simplesmente colagenase, esta enzima é capaz de clivar a região helicoidal do colágeno em pequenos fragmentos (Salamone et al. 2012). O colágeno, substrato da colagenase, é uma proteína fibrosa, estrutural e insolúvel que têm alta resistência à tração, e está presente principalmente na pele, cartilagens, ossos, tendões, dentes e vasos sanguíneos (Lima 2013). Essa proteína possui uma ampla aplicação nas indústrias de processamento de couro, cosméticos, biomédica, farmacêutica e de alimentos (Hwang et al. 2007; Lima et al. 2014). Além dessas aplicações, os peptídeos resultantes da degradação do colágeno, também apresentam diversas atividades biológicas de interesse industrial (Duarte 2012).

A maioria das colagenases aplicadas em processos biotecnológicos é oriunda de micro-organismos (Duarte 2012). Apesar da facilidade de obtenção, a produção de enzimas por micro-organismos ainda tem como fator limitante sua purificação. Sistemas convencionais para separar biomoléculas muitas vezes não são satisfatórios. O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um dos processos mais econômicos e viáveis de extração e pré-purificação de compostos biológicos (Padilha et al. 2011).

O SDFA comumente é composto por dois polímeros como, por exemplo, o polietileno glicol (PEG) e dextrana ou por um polímero e um sal. Estes componentes do SDFA são solutos hidrofílicos mutuamente incompatíveis que são dissolvidos em água acima de certa concentração crítica para que o sistema bifásico seja formado (Kaul et al. 2000;

Ratanapongleka 2010). O S DFA oferece vantagens na purificação de biomoléculas como: a facilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de operação rápida e seletiva; possibilidade de operação à temperatura ambiente (Porto et al. 2008). Com isso, objetivo do presente trabalho foi comparar a produção de proteases e a extração da protease colagenolítica em S DFA produzidas por *Mucor subullissimus* UCP 1262 em diferentes tipos de fermentações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Mucor subullissimus UCP 1262 foi isolado do solo da Caatinga no município de Serra Talhada, PE-Brasil e depositado na coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Brasil. Este fungo filamentososo foi mantido em meio Czapek incubado a 30°C.

2.2 Fermentação em Estado sólido (FES)

Os esporos do micro-organismo foram extraídos por meio da solução nutriente, previamente esterilizada, composta de 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 1% (m/v) de glicose e 0,01% de Tween 80 (m/v) diluída em tampão de fosfato de sódio 245 mM e pH 7,0. Os esporos foram contados em câmara de Neubauer para uma concentração final de 10^7 esporos/mL. A solução contendo esporos do *Mucor subullissimus* UCP 1262 foi inoculada em Erlenmeyer de 125 ml contendo 5 g de farelo de soja, com uma granulometria entre 0,6 a 2,0 mm, humidade de 40% e incubados a 30 °C durante 72 horas em estufa bacteriológica. A extração da enzima foi realizada após 72 horas de fermentação. Utilizou-se para extração uma proporção de 7,5 ml de tampão de fosfato de sódio pH 7,0 (245 mM) para cada 1 g de substrato. Após a adição do tampão os frascos foram colocados num agitador orbital a 150 rpm durante 90 min à temperatura ambiente. Terminado este período, o conteúdo foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

2.3 Fermentação Submersa (FS)

Os esporos do micro-organismo foram extraídos, como citado anteriormente, para uma concentração final de 10^4 esporos/mL. A solução contendo esporos do *Mucor subullissimus* UCP 1262 foi inoculada em Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 mL de meio MS-2 (Porto et al. 1996) composto por: 2,0% (m/v) de farinha de soja, 0,06% (m/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% (m/v) de NH_4Cl , 0,435% (m/v) de K_2HPO_4 e 0,1 mL de solução mineral (100mg de $FeSO_4$, 100 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4$, 100 mg de $CaCl_2 \cdot H_2O$ em 100 mL de água destilada, com pH inicial 7,2). A autoclavagem do meio de cultivo foi a 121°C/ 1

atm de pressão, durante 20 minutos. A fermentação foi realizada em agitador orbital a 120 rpm, 30 °C, por 72 horas. Após o período de cultivo as amostras foram centrifugadas para separação da biomassa a 3500 rpm durante 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

2.4 Extração da protease colagenolítica em Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Para formação do SDFA foi utilizada uma solução concentrada de sais de fosfato de sódio (40% m/m) preparada pela mistura de fosfato de sódio bibásico e fosfato de sódio monobásico a pH 6,0. Quantidades necessárias desta solução foram colocadas em tubos graduados com pontas cônicas de 15 mL e adicionado o Polietileno glicol (PEG). Logo após os tubos foram homogeneizados no vortex para atingir a composição desejada do sistema específico. As concentrações de PEG e sal e as massas molares do PEG em cada sistema variaram de acordo com o planejamento fatorial 2^3 apresentados na Tabela 1. O sistema foi carregado com 2 g do líquido metabólico livre de células. Após a adição do líquido metabólico ocorreu agitação no vortex durante 1 min, a mistura foi deixada em repouso durante 60 min a temperatura ambiente, para separação das fases. Os volumes das fases foram medidos e, alíquotas de cada fase foram retiradas separadamente e usadas para a determinação da atividade colagenolítica e da concentração de proteína. Foram realizados dois planejamentos fatoriais, um para o líquido metabólico obtido da FS e outro para o líquido metabólico obtido da FES. As significâncias dos efeitos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 95 % para realizar as estimativas dos efeitos principais lineares e de segunda ordem, em valor absoluto, dos fatores em relação às variáveis respostas estudadas. A análise estatística do planejamento experimental, incluindo os diagramas foram realizados utilizando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

Tabela 1. Níveis e valores das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2^3 para SDFA de protease colagenolítica em PEG/Fosfato de sódio.

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Massa Molar do PEG (g/mol) - MPEG	200	550	1000
Concentração de PEG (%) - CPEG	17,5	20	22,5
Concentração de Fosfato de sódio (%) - CSAL	15	17,5	20

2.5 Perfil eletroforético SDS-PAGE

A eletroforese SDS-PAGE foi determinada segundo Laemmli (1970). A coloração das proteínas foi feita através da imersão do gel em uma solução contendo 0,1% de Coomassie Blue R-250 e posteriormente coloração com prata (Fluka Fine Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

2.6 Determinações Analíticas

2.6.1 Quantificação Proteica

O teor de proteínas dos extratos brutos foi determinado através do método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6.2 Determinação da Atividade Proteásica

A quantificação proteásica foi determinada pelo método de Ginther (1979), que utiliza azocaseína a 1% como substrato para reação, tendo como 1 unidade de atividade enzimática (U) a variação de **0,01** na absorbância a 420nm por 1 hora.

2.6.3 Determinação da Atividade Fibrinolítica

A determinação da atividade fibrinolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Wang et al. (2011). Em que consistiu, inicialmente por 0,4 mL de fibrinogênio a 0,72%, 0,1mL de tampão fosfato de sódio a 245 mM em pH 7,0, inserido em banho-maria por 5 minutos a 37°C. Logo após colocou-se 0,1ml de trombina equivalente a 20U/mL, por fim esta solução foi incubada a 37°C por 10 minutos. Depois disto inseriu-se 0,1mL do líquido metabólito livre de células, após 60 minutos adicionou-se 0,7 mL TCA a 0,2M na reação e esta foi centrifugada a 15.000xg por 20 minutos. Por fim, retirou-se 1mL do sobrenadante para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda a 275nm. Portanto 1 unidade de atividade enzimática (U) é definida como a variação da absorbância de 0,01 por minuto.

2.6.4 Determinação da Atividade Colagenolítica

A determinação da atividade colagenolítica foi realizada de acordo com a metodologia modificada, descrita por Chavira et al. (1984). Na qual se inicia com a pesagem de 0,005g do substrato, o azocolágeno, e sua posterior lavagem com o tampão Tris-HCl a 0,1 M e pH 7,8. A lavagem foi realizada até o substrato não liberar cor após a centrifugação. Para reação enzimática 50 µL do líquido metabólico e 950 µL de tampão Tris-HCl a 0,1 M e pH 7,8 foi acrescentado ao substrato lavado. A reação ocorreu a temperatura de 37°C por uma hora. Passado este tempo cada ensaio foi centrifugado e 1mL do sobrenadante foi retirado para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda a 520nm, portanto 1 unidade de atividade enzimática (U) foi definida por um aumento de 0,1 na absorbância.

2.6.5 Determinação da Atividade Queratinolítica

A determinação da atividade queratinolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Anbu et al. (2007). Na qual se inicia com a pesagem de 0,02g do substrato, pena de galinha, e sua posterior lavagem com o tampão Tris-HCl a 0,1 M e pH 7,8. A lavagem foi realizada três vezes. Para reação enzimática, 200 µL do líquido metabólico e 3,8 mL de tampão Tris-HCl a 0,1 M e pH 7,8 foi acrescentado ao substrato lavado. A reação ocorreu a temperatura de 37°C por uma hora. A reação foi interrompida através de banho de gelo por um período de 10 minutos. Passado este tempo cada ensaio foi centrifugado e 1mL do sobrenadante foi retirado para a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda a 280nm, portanto 1 unidade de atividade enzimática (U) foi definida por um aumento de 0,01 na absorbância.

2.6.6 Determinação do Coeficiente de partição (K), Recuperação enzimática (Y), Fator de purificação (FP) e Balanço de massa (BM) para o SDFa

A distribuição da atividade colagenolítica entre as fases foi expressa em termos de coeficiente de partição (K), calculada como se segue:

$$K = \frac{Ac_s}{Ac_i}$$

Onde “Acs” e “Aci” são as atividades colagenolíticas (U/mL) na fase superior e fase inferior, respectivamente.

A recuperação (Y) da protease colagenolítica na fase rica em PEG foi calculada a partir da fórmula abaixo:

$$Y = \frac{V_s \cdot Ac_s}{V_{inic} \cdot Ac_{inic}} \times 100$$

Onde: “Vs” e “Acs” são o volume da fase superior e a atividade colagenolítica (U/mL) na fase superior, respectivamente. Enquanto que “V inic” e “Ac inic” são o volume inicial (líquido metabólico) e a atividade colagenolítica (U/mL) inicial (líquido metabólico), respectivamente.

O fator de purificação (FP) foi calculado como se segue:

$$FP = \frac{Ac_s/Ps}{Ac_{inic}/Prot_{inic}}$$

Onde: “Acs” e “Ps” são as atividades colagenolíticas (U/mL) na fase superior e a concentração de proteína (mg/mL) na fase superior, respectivamente. Enquanto que “Ac inic” e “Prot inic” são a atividade colagenolítica (U/mL) inicial e a concentração de proteína (mg/mL) inicial, respectivamente.

O balanço de massa (BM) foi verificado de acordo com a seguinte fórmula:

$$BM = \frac{(Ps \cdot Vs) + (Pi \cdot Vi)}{Prot_{inic} \cdot Ma} \times 100$$

Onde: “Ps” e “Vs” é a concentração de proteína (mg/mL) na fase superior e o volume da fase superior, respectivamente. Enquanto que “Pi”, “Vi”, “Prot inic” e “Ma” é a concentração de proteína (mg/mL) na fase inferior, o volume da fase inferior, concentração de proteína (mg/mL) inicial e quantidade em gramas da amostra utilizada, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de proteases por *Mucor subtilissimus* em FS e FES

A produção de proteases foi avaliada tanto por FES quanto por FS e os resultados obtidos com 72h de fermentação estão descritos na Tabela 2. A atividade proteolítica total e as atividades proteolíticas a substratos específicos (colagenase, queratinase e fibrinolítica) foram maiores no processo FES. Tal ocorrência se deve ao fato de que algumas enzimas produzidas por fungo em FS ficam aderidas à parede celular do micro-organismo. Já no cultivo em estado sólido, essas mesmas enzimas são encontradas no meio extracelular, ou seja, são secretadas pelo fungo no meio de cultivo (Oda 2006). Muitos estudos realizados com fungos filamentosos para produção de enzimas também demonstraram que a maior produção enzimática acontece quando o micro-organismo é submetido ao processo FES (Badamchi et al. 2013; Mazotto et al. 2013; Bhavsar et al. 2013). O aumento da produção de muitas enzimas utilizando a FES está relacionado com a resistência significativa à repressão catabólica, existentes no meio sólido (Viniegra-González et al. 2006).

Tabela 2. Atividades enzimáticas obtidas por fermentação em estado sólido e submersa pelo *Mucor subtilissimos* após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.

Atividades Enzimáticas	Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
Colagenolítica	179,81U/mL	18,70U/mL
Fibrinolítica	40,80 U/mL	10,75 U/mL
Queratinolítica	72,62 U/mL	16,35 U/mL
Proteolítica Total	362,66 U/mL	26,33 U/mL

O teor de proteínas totais encontrado no extrato enzimático da FES foi de 1800,22 mg/mL, sendo este superior ao obtido na FS com 344,01 mg/mL, como demonstrado na Fig 1. *Mucor* na FES possui mais dificuldade para degradar o substrato, pois se comparado ao meio aquoso (FS), os nutrientes estão menos acessíveis. Por isso, por questão de sobrevivência, *Mucor subtilissimos* foi induzido a elevar a produção de proteínas (enzimas) para degradar o substrato. De fato, são vários os estudos que demonstram a maior concentração de proteínas secretadas no meio sólido em detrimento do meio líquido (Iwashita 2002; Mazotto et al. 2013; Shivanna e Venkateswaran 2014).

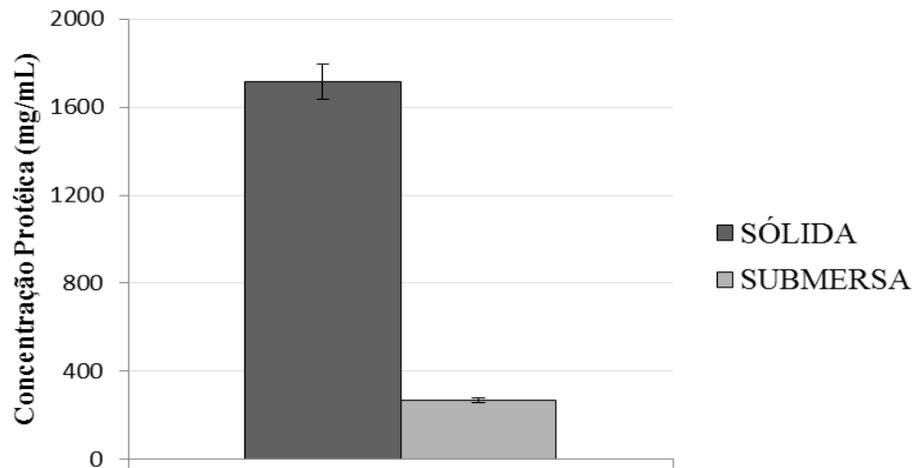


Fig. 1 Teor de proteínas totais obtido por fermentação submersa e em estado sólido pelo *Mucor subtilissimos* após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.

No presente trabalho, a atividade proteásica a partir da FES teve um aumento de 13,7 vezes em relação à FS. Sandhya et al. (2005) investigaram a produção de protease por *Aspergillus oryzae* em fermentação submersa e em estado sólido e observaram um aumento de 3,5 vezes na quantidade de enzima produzida em estado sólido, utilizando o farelo de trigo como substrato, corroborando com nossos resultados. Dentre as atividades proteásicas específicas, a collagenase foi a enzima que apresentou maior valor de atividade (179,81 U/ml) em FES, como mostra a Fig 2. Consequentemente, a collagenase foi selecionada para extração em SDFa. As proteases collagenolíticas têm grande importância em aplicações terapêuticas, pois são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno (Lima et al. 2014).

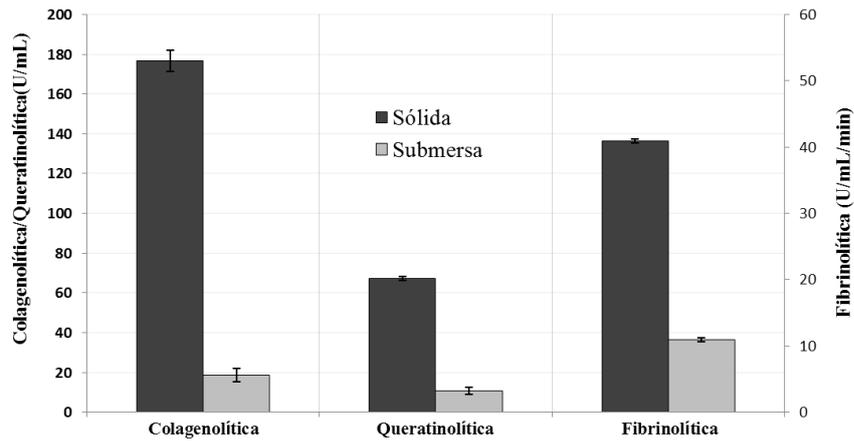


Fig. 2 Atividades Proteásicas específicas obtidas por fermentação submersa e em estado sólido pelo *Mucor subtilissimos* após 72 horas de cultivo em meio MS-2 (Porto et al. 1996) na fermentação submersa e meio contendo farelo de soja na fermentação em estado sólido.

Com relação ao perfil proteico nos dois tipos de fermentações (Fig 3) pode-se verificar que o perfil proteico da FES é mais complexo, pois possui mais bandas diferenciadas, ou seja, proteínas com pesos moleculares diferentes; enquanto que na FS a diversidade de proteínas é menor. Esses resultados corroboram com os resultados de Oda et al. (2006) que compararam a quantidade de proteínas secretadas nas duas formas de cultivo, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono; o estudo relata que o crescimento em estado sólido resultou em uma quantidade de quatro a seis vezes mais proteínas secretadas, se comparada ao cultivo submerso, resultando num perfil proteico mais complexo.

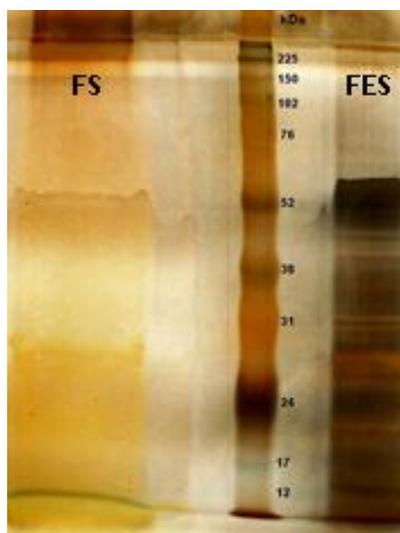


Fig. 3 SDS-PAGE corado com nitrato de prata, comparando o perfil proteico de *Mucor subtilissimos* quando crescido em fermentação submersa e em estado sólido.

3.2 Extração líquido-líquido da protease colagenolítica provenientes da FES e FS

Para a extração da colagenase em SDFA foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , variando as concentrações e massas molares de PEG, bem como as concentrações do sal fosfato de sódio. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

3.2.1 Coeficiente de Partição (K)

Os coeficientes de partição encontrados nos dois planejamentos apresentaram valores superiores a 1,0, indicando que a protease colagenolítica tem mais afinidade pela fase polimérica do sistema do que pela fase rica em sal. Este comportamento de migração para a fase PEG também foi observado pelos autores que extraíram a colagenase de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 a partir de SDFA PEG/Fosfato (Lima et al. 2013).

A Figura 4 mostra um gráfico de Pareto referente ao planejamento de extração da colagenase, obtida em FES, no qual a variável concentração de sal (Csal) foi a única que não apresentou efeito significativo para a variável resposta coeficiente de partição (K). Já as outras variáveis principais: massa molar do PEG (MPEG) e concentração do PEG (CPEG) foram significativas ao nível de confiança de 95% para o valor de K. Semelhantemente, no processo de partição da colagenase produzida por FS, a variável Csal não apresentou efeito significativo, assim como as variáveis independentes MPEG e CPEG, bem como a interação entre elas foram significativas (Fig 5).

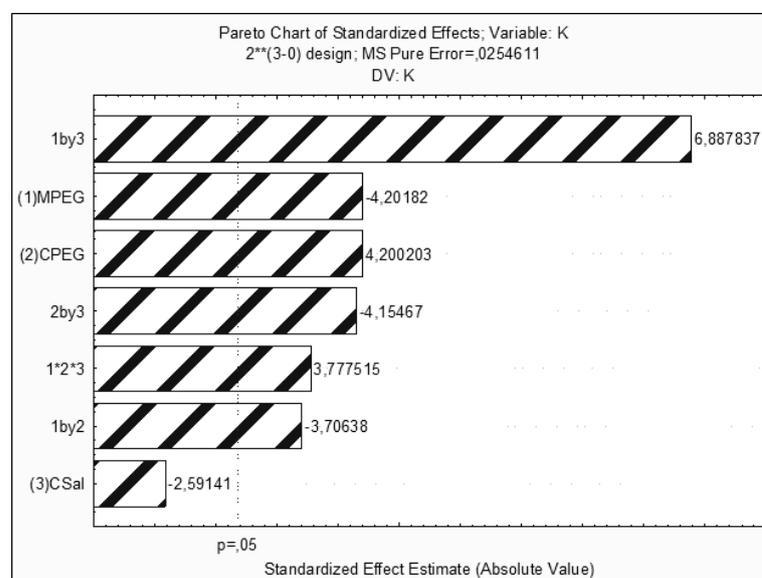


Fig. 4 Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição da colagenase proveniente da fermentação em estado sólido.

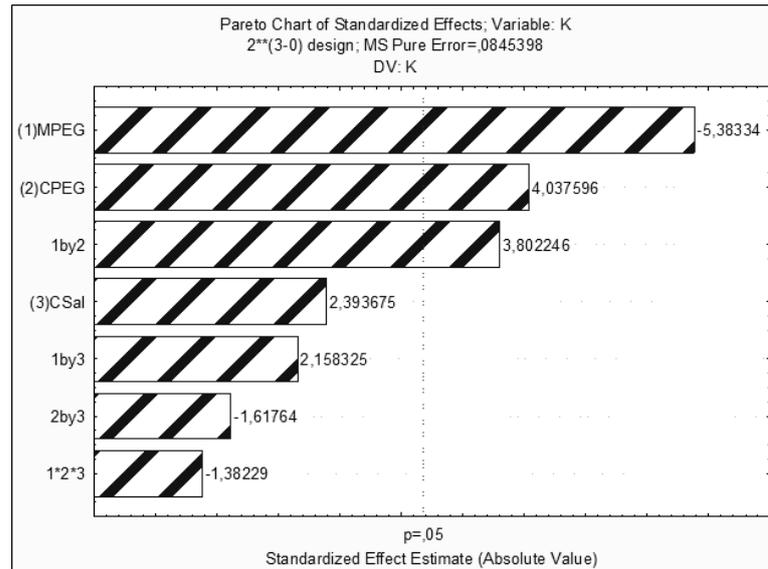


Fig. 5 Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição da colagenase proveniente da fermentação submersa.

A interação das variáveis MPEG-CSal teve maior influência na partição da colagenase proveniente da FES. Tal influência foi positiva, significando que o aumento ou a diminuição simultânea dos valores de massa molar do PEG e das concentrações de fosfato, maiores serão os valores de K. Esse efeito foi observado no presente trabalho, onde a massa molar do PEG 200 g/mol e a concentração de fosfato 15% (m/m) foram às condições que melhor favoreceram a partição da colagenase para a fase rica em PEG. Baixos valores de massa molar de PEG associadas com baixas concentrações de fosfato favoreceram a partição da molécula para a fase superior, aumentando o coeficiente de partição.

Em contrapartida, no planejamento da FS, a variável independente MPEG foi a que teve mais influência na partição da colagenase para fase polimérica, sendo esta influência negativa, indicando que altos valores de K se darão quando as massas molares do PEG forem as menores possíveis. Observou-se que os maiores coeficientes de partição ocorreram com a massa molar do PEG 200g/mol.

O SDFA possui grande versatilidade na separação de misturas complexas devido ao grande número de variáveis que interferem na partição da molécula alvo. Através da manipulação sistemática das variáveis extrínsecas pode-se modificar o comportamento da proteína de interesse e de seus contaminantes. Contudo com essa grande gama de variáveis e, a maioria delas sendo interdependentes, torna-se muito difícil a compreensão teórica do comportamento da molécula de interesse em SDFA (Tubio et al. 2008). Em virtude disso, as conclusões em relação à partição da colagenase apresentadas neste estudo foram baseadas nas

características físico-químicas dos componentes do sistema e da estrutura química da molécula alvo.

A partição da colagenase para a fase rica em PEG em ambos os sistemas estudados pode ser justificada pela interação hidrofóbica entre o PEG e a colagenase. A esse respeito é possível inferir que tal interação ocorre devido à presença de domínios hidrofóbicos na colagenase, assim como ocorre nas quitinases, celulases e xilanases (Bockle et al. 1995). Os domínios hidrofóbicos presentes nas colagenases microbianas, assim como em todas as metaloproteases, são formados pelos resíduos de metioninas contidos nestas enzimas e que são os responsáveis por tais bases hidrofóbicas (Bode et al. 1993; Stocker e Bode 1995). Além disso, o PEG possui alta hidrofobicidade, em virtude de suas longas cadeias carbônicas, além de ser uma molécula neutra (Pereira et al. 2012). Sendo assim os domínios hidrofóbicos da colagenase interagiram com as cadeias hidrofóbicas do PEG possibilitando, por meio de forças hidrofóbicas, a migração da enzima de interesse para a parte superior do sistema bifásico.

Os outros fenômenos, como volume excluído e “salting out” que comumente ocorrem nos sistemas bifásicos não foram observados, pois em geral as colagenases microbianas possuem tamanho pequeno, com o peso molecular variando de 28 kDA a 116 kDA (Juca et al. 2008), desta forma, o fenômeno do volume excluído não ocorreu. O “salting out” também não foi observado, pois valores altos de K também foram encontrados com as menores concentrações de sal.

3.2.2 Recuperação da colagenase (Y)

Consideraram-se apenas os resultados da recuperação da colagenase na fase superior do sistema em virtude dos maiores valores encontrados. Tal fenômeno também pode ser explicado da mesma forma que foi discutido em relação ao coeficiente de partição, onde ocorreu uma possível interação hidrofóbica entre o PEG e a colagenase, particionando a enzima para esta fase. Em contrapartida, as proteínas contaminantes com características hidrofílicas podem ter interagido com a fase inferior rica em sal.

Os melhores resultados para recuperação da colagenase proveniente da FES e da FS foram respectivamente: 129,94% e 198,65%. Outros autores utilizando o SDFa para extração enzimática também encontraram valores de recuperação acima de 100% (Mayerhoff et al. 2004; Porto et al. 2004; Porto et al. 2011; Nascimento et al. 2013; Herculano et al. 2012; Silva et al. 2013). Este fato pode ser explicado através da possível diminuição dos inibidores da

enzima de interesse, durante o processo de extração ou a fase PEG pode ter promovido maior estabilidade à enzima alvo (Mayerhoff et al. 2004; Porto et al. 2004).

O gráfico a seguir (Fig 6) mostra a variável recuperação da colagenase proveniente da FES, no qual as variáveis independentes MPEG e Csal apresentaram efeitos significativos e ambos negativos para a variável resposta em questão. Isso implica dizer que quanto menor a massa molar do PEG e a concentração de fosfato, maior será a recuperação da colagenase na fase PEG.

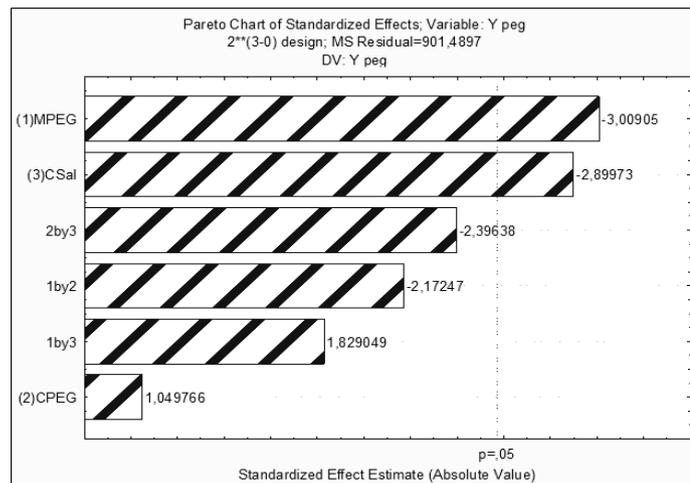


Fig. 6 Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da colagenase proveniente da fermentação em estado sólido.

Contudo, em relação à recuperação da colagenase proveniente da FS (Fig 7), a variável MPEG se destacou como a mais significativa das variáveis independentes, e a CPEG foi a segunda mais significativa. Vale ressaltar que estas variáveis obtiveram efeitos opostos, MPEG com efeito negativo e a CPEG com efeito positivo, indicando que quanto menor a massa molar do PEG e maior a concentração do PEG, maior será o valor da recuperação.

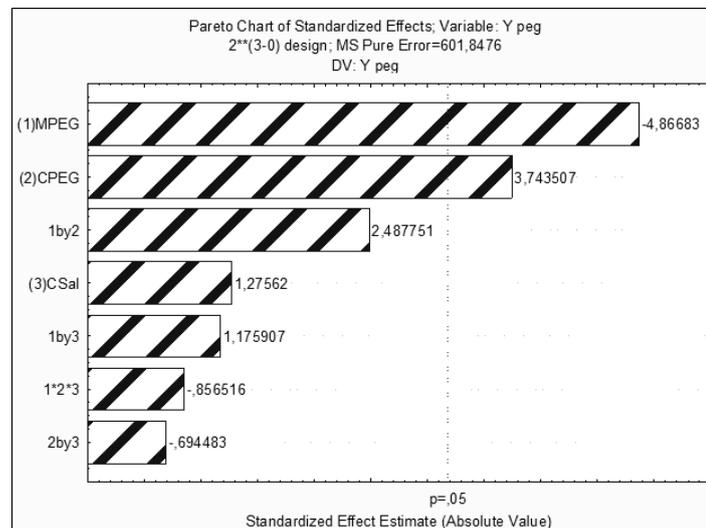


Fig. 7 Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da colagenase proveniente da fermentação submersa.

3.2.3 Fator de Purificação (FP)

Os melhores resultados expressos para o fator de purificação da collagenase foram obtidos no ensaio 4, para a FES (Fig 8), e no ensaio 7 para a FS (Fig 9). A collagenase proveniente da FES apresentou o maior valor de FP (3,495) enquanto a collagenase proveniente da FS, revelou um fator de purificação menor (FP= 2,389). Isto se deve ao fato de que na FES a concentração das enzimas collagenolíticas é maior, o que facilita o processo de extração e purificação. Na FS isso não ocorre visto que as collagenases são produzidas em menor quantidade e o meio de cultivo extremamente aquoso favorece a diluição das enzimas. No trabalho realizado por Yuri et al. (2014) foi observado que a purificação de quitinase em FS, de forma geral, é mais complexa pois as etapas de purificação necessitam de grandes volumes de líquidos metabólicos, devido à baixa concentração enzimática.

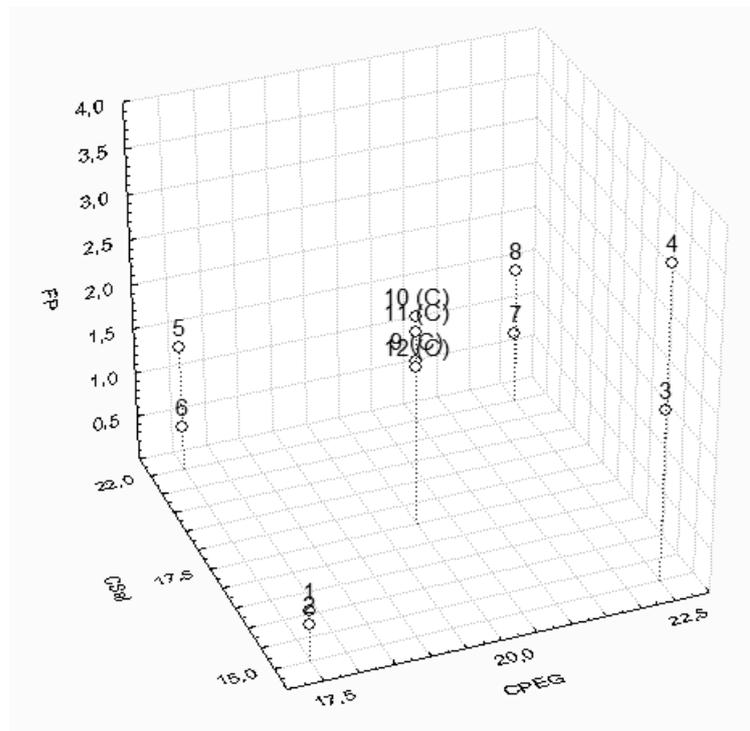


Fig. 8 Representação gráfica do fator de purificação da collagenase, oriunda da fermentação em estado sólido, na fase PEG em relação à concentração de fosfato e de PEG.

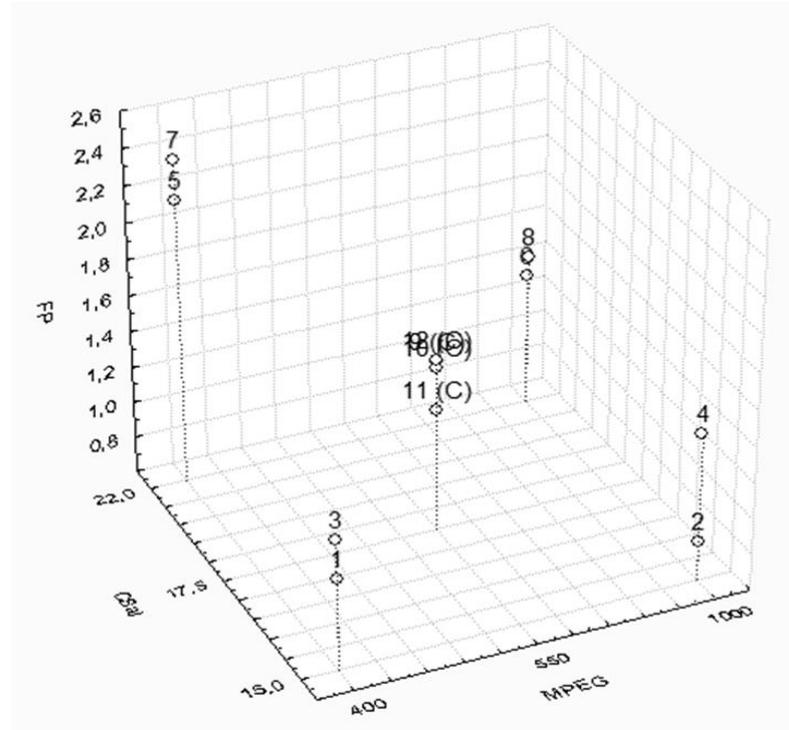


Fig. 9 Representação gráfica do fator de purificação da collagenase, oriunda da fermentação submersa, na fase PEG em relação à concentração de fosfato e de PEG.

Tabela 3 Resultado do planejamento fatorial 2^3 para extração da colagenase oriunda da fermentação em estado sólido.

Ensaio	CPEG%	Cfos%	MPEG	Ac (PEG)	Ac (SAL)	K	Y	AP	BM
1	17,5	15	200	27,6	16,6	1,66	125,64	0,557	96,49
2	22	15	1000	32,4	25,8	1,25	116,06	0,406	139,77
3	17,5	15	200	65,2	18,9	3,45	291,94	1,925	83,84
4	22	15	1000	34,8	25,7	1,35	96,09	3,495	103,10
5	17,5	20	200	37,5	25,2	1,48	123,13	1,409	92,06
6	22	20	1000	29,6	16,6	1,78	97,19	0,500	96,16
7	17,5	20	200	25,1	16,9	1,48	93,66	0,775	80,38
8	22	20	1000	29,1	16,2	1,79	69,49	1,516	86,57
9	20	17,5	500	40,3	25,1	1,60	132,33	1,860	85,65
10	20	17,5	500	50,1	26,2	1,91	134,60	2,348	110,61
11	20	17,5	500	47,5	26,7	1,77	127,61	2,176	103,24
12	20	17,5	500	40	25,5	1,56	131,34	1,779	90,45

Tabela 4 Resultado do planejamento fatorial 2^3 para extração da colagenase oriunda da fermentação submersa.

Ensaio	CPEG%	Cfos%	MPEG	Ac (PEG)	Ac (SAL)	K	Y	AP	BM
1	17,5	15	200	12	4,13	2,903	175,14	1,106	106,432
2	22	15	1000	1,3	4,53	0,287	12,30	0,818	91,938
3	17,5	15	200	13,3	4,43	3,000	194,11	1,323	99,032
4	22	15	1000	10,9	4,33	2,515	147,30	1,415	90,978
5	17,5	20	200	14	4,67	3,000	174,05	2,174	135,365
6	22	20	1000	8,4	4,57	1,839	81,73	1,333	104,727
7	17,5	20	200	14,7	4,90	3,000	198,65	2,389	127,697
8	22	20	1000	13,7	4,83	2,834	162,92	1,441	101,601
9	20	17,5	500	13,4	7	1,914	159,35	1,544	92,171
10	20	17,5	500	13,2	6,97	1,895	156,97	1,508	112,664
11	20	17,5	500	8,8	6,77	1,300	109,41	1,280	89,708
12	20	17,5	500	11	6,93	1,587	124,86	1,551	85,405

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que a FES é um método de cultivo promissor na obtenção de proteases principalmente na produção de colagenase através do *Mucor subtilissimus* UCP 1262. No que se refere à extração da colagenase de ambos os processos fermentativos por sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato, os dois sistemas mostraram-se viáveis para a extração de colagenase, pois além de ser um processo que pode ser utilizado em larga escala é constituído por componentes de baixo custo e, as condições utilizadas no SDFA favoreceram a extração destas enzimas. Todavia, a extração da colagenase oriunda da FES obteve melhor extração com melhor resultado do fator de purificação.

REFERÊNCIAS

- Anbu P, Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmipriya T, Annadurai G (2007) Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technology* 98:1298–1303.
- Anitha TS, Palanivelu P (2013) Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expression and Purification* 88:214–220.
- Badamchi M, Hamidi-Esfahani Z, Abbasi S (2013) Comparison of Phytase Production by *Aspergillus Ficum* under Submerged and Solid State Fermentation Conditions. Focusing on Modern Food Industry (FMFI).
- Bhavsar K, Buddhiwant P, Soni SK, Depan D, Sarkar S, Khire JM (2013). Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. *Process Biochem.* 1–8.
- Bockle B, Galunski B, Muller R (1995) Characterizaion of a keratinolyic serine proteinase from *Streptomices pactum* DSM 40530. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:3705-3710.
- Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lets.* 331:134-140.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Chavira RJ, Burnett TJ, Hageman JH (1984) Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem.* 136:4446–4450.
- Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D (2010) Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6:239-263.
- Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D (2012) Isolation and activation of collagenase from fish processing Waste. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3:191-203.
- Duarte AS, Correia A, Esteves AC (2014) Bacterial collagenases – A review. *Critical Reviews in Microbiology* 1–21.
- Ginther CL (1979) Sporulation on the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamduran*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:522-526.
- Hatti-Kaul R. (2000) *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*. Humana Press 1-10.

- Hwang JH, Mizuta S, Yokoyama Y, Yoshinaka R (2007) Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoei*). Food Chemistry 100:921–925.
- Iwashita K (2002) Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering 94:530-535.
- Jucá M, Nunes BLBBP, Menezes HL, Gomes EGA, Matos D (2008) Metaloproteinases 1 e 7 e Câncer Colorretal. Rev bras Coloproct 28:353-362.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–686.
- Lima CA, Campos JF, Lima Filho JL, Converti A, Carneiro da Cunha MG, Porto ALF (2014) Antimicrobial and radical scavenging properties of Bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. Journal of Food Science and Technology
- Llorente BE, Obregón WD, Avilés FX, Caffini NO, Vairo-Cavalli S (2014) Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. Food Chemistry 159:55–63.
- Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Franco TT (2004) Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. Biochemical Engineering Journal 18:217-223.
- Mazotto AM, Couri S, Damaso MCT, Vermelho AB (2013). Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. Int Biodeterior Biodegrad. 85:189–195.
- Medeiros FS, Marcuschi M, de Assis CRD, da Silva JF, Espósio TS, et al. (2015) Potencial laundry detergent applications of mutton snapper (*Lutjanus analis*) proteases. Journal of FisheriesSciences.com 93:63-69.
- Nascimento CO, et al. (2013) Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. Separation and Purification Technology 116:154–161.
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. Applied and Environmental Microbiology 72:3448-3457.
- Padilha GS, Ferreira JF, Alegre RM, Tambourgi EB (2011) Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. Acta Scientiarum. Technology 33:1-4.
- Porto ALF, Campos-Takaki GM, Lima Filho JL, (1996) Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. Applied Biochemistry Biotechnology 60:115-122.
- Porto ALF, Sarubbo LA, Moreira KA, Melo HJF, Lima- Filho JL, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB (2004) Recovery of ascorbic oxidoreductase from crude extract with na aqueous two-phase system in a perforated rotating disc contactor. Brazilian Archives of Biology and Technology 47: 821-826.

- Porto CS, et al. (2011) Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. *Biochemical Engineering Journal* 53:165-171.
- Porto TS, Silva GMM, Porto CS, Cavalcanti MTH, Netoc BB, Lima-Filho JL, Converti A, Porto ALF, Junior AP (2008) Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47: 716–721.
- Raja S, Murty VR, Thivaharan V, Rajasekar V, Ramesh V. (2012) Aqueous Two-phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. *Science and Technology* 1: 7–16.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A (2005) Comparative evolution of Neutral proteases production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state-fermentation. *Process Biochem.* 40:2689-2694.
- Shivanna GB, Venkateswaran G (2014) Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. Hindawi Publishing Corporation.
- Silva GMM, Bezerra RP, Teixeira JA, Porto TS, Lima-Filho JL, Porto ALF (2015) Fibrinolytic protease production by new *Streptomyces sp.* DPUA 1576 from Amazon lichens. *Electronic Journal of Biotechnology* 18: 16–19.
- Stocker W, Bode W (1995) Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:383-390.
- Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI (2014) Review Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. *Eng. Life Sci.* 1–9.
- Tubío G, Nerli B, Picó G (2007) Partitioning features of bovine trypsin and chymotrypsin in polyethyleneglycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 852: 244–249.
- Tubío G, Picó GA, Bibiana B (2009) Nerli Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography* 877:115–120.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? *Food Technol Biotechnol.* 44:397–406.
- Wang S, Deng Z, Li Q, Ge X, Bo Q, Liu J, Cui J, Jiang X, Liu J, Zhang L, Hong M (2011). A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. *Comp Biochem Physiol Part B.* 159:18-25.
- Zaferanloo B, Quang TD, Daumoo S, Ghorbani MM, Mahon PJ, Palombo EA (2014) Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. *World J Microbiol Biotechnol.*

ANEXO I
GUIA DE AUTORES



Applied Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Alexander Steinbüchel
ISSN: 0175-7598 (print version)

ISSN: 1432-0614 (electronic version)
2014 Impact Factor 3.337

Instructions for Authors

Plagiarism prevention with CrossCheck

Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database.

This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word. Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text. Use italics for emphasis. Use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use field functions. Use tab stops or other commands for indents, not the space bar. Use the table function, not spreadsheets, to make tables. Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. LaTeX macro package (zip, 182 kB).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

MANUSCRIPT PREPARATION

Please select a concise and informative title (composed of no more than 130 characters).

Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").

Manuscripts must be written in English and the complete text should be formatted in 1,5 line spacing.

Mini-Reviews on biotechnological products and processes or an apparatus and reactors used for biotechnological processes are welcome. They should provide a short historical outline of the development, extensively review the current state and conclude with an outline of trends and prospects for the future. For biotechnological products the competitiveness of the biotechnological process as compared to chemical processes or to processes, which rely on the isolation of the product from natural sources, should be provided. Applications and cost figures should be provided. Mini-reviews should contain a structural formula or a photograph of the biotechnological product, an outline of the biosynthetic pathway, a scheme of the apparatus, plant or reactor or a flow scheme of the process. Authors are asked to contact the Editor-in-Chief before submitting a mini-review.

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

Abstract

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.

Footnotes

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer. Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Introduction

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

Materials and methods

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work. The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable).

The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers. For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

Results

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

Discussion

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

WDCM culture collections

NCBI Bio Project

HUPO proteomics standard initiative

American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines

SCIENTIFIC STYLE

All taxa names (species names, genus names, and names of higher categories) should be in italics.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Multi-author papers must be cited in the text with "et al."; first author name is not sufficient; names of two-authors papers must both be given.

Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990). This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

⌘
Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

⌘
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

⌘
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

⌘
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

⌘
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN Website.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote Style

Please note:

All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts! Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al.!"

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order. For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically. Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

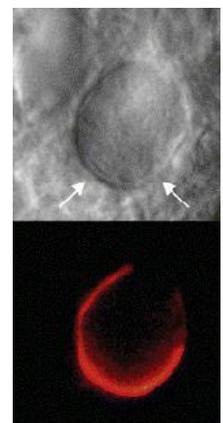
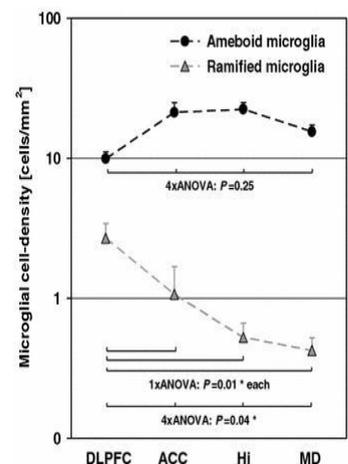
Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading. Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size. All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide. Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

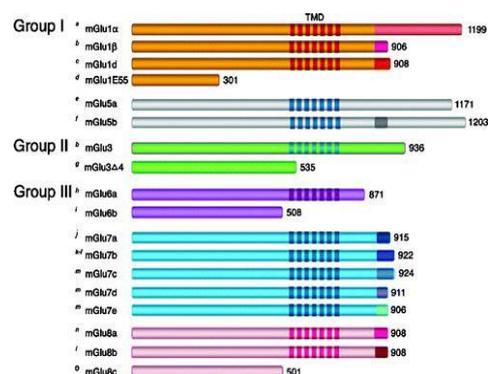


Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

⠄

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that. All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware). Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements). Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3 Maximum file size: 25 GB Minimum video duration: 1 sec Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxfl, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that the manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズグループジャパン

For Authors from Korea

영어논문투고에앞서원어민에게영문교정을받고자하시는분들께 Edanz 회사를소개해드립니다. 서비스내용, 가격및

신청방법등에대한자세한사항은저희 Edanz Editing Global 웹사이트를참조해주시면감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief’s implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above- mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia Financial support for educational programs
- Employment or consultation.
- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights) Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work.

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.