

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Centro de Ciências Biológicas
Área Biotecnologia

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
COLAGENASES A PARTIR DE CEPAS DE *Streptomyces* spp. DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

MÁRCIA CARINE DA SILVA BARROS

RECIFE, 2011

MÁRCIA CARINE DA SILVA BARROS

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
COLAGENASES A PARTIR DE CEPAS DE *Streptomyces* spp. DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

**Tese para obtenção do grau de
doutor(a) em Ciências Biológicas, área
de concentração Biotecnologia, da
Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE .**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto**

RECIFE, 2011

Elaine Barroso
CRB 1728

Barros, Márcia Carine da Silva

Produção, caracterização e purificação de colagenases a partir de cepas de *Streptomyces* spp. da Região Amazônica/ Márcia Carine da Silva Barros. – Recife: O Autor, 2012.

115 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Tatiana Souza Porto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Enzimas 2. Colágeno 3. Actinomycetes I. Barros, Márcia Carine da Silva (orientadora) II. Título**

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-207

Márcia Carine da Silva Barros

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE
COLAGENASES A PARTIR DE CEPAS DE *Streptomyces* spp. DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Orientadora/Presidente da banca
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta
Departamento de Micologia - UFPE

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Departamento de Bioquímica - UFPE

Recife, 5 de agosto de 2011.

*A Deus, aos meus pais, Luiz Mendes e
Ivonete, ao meu irmão Luiz Alberto, sobrinho
Alberto, ao meu esposo Davi e aos meus amados
filhos Gabriel e Rafael com todo amor e carinho.*

*Em memória ao meu
amado pai Luiz Mendes Barros.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da minha existência, e por sempre colocar no meu caminho formas de me fazer seguir em direção ao que é certo, me trazendo conforto e paz espiritual para enfrentar com paciência e paz os momentos difíceis.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto, por ter aceitado ser minha orientadora neste doutorado. Agradeço pela confiança, incentivo e por sua excelente orientação no decorrer do doutorado me servindo como exemplo de profissionalismo, ética e ter contribuído na minha formação profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Souza Porto, pela confiança, incentivo e por sua fundamental co-orientação no decorrer deste doutorado, contribuindo grandemente para o desenvolvimento desta tese.

Aos Doutores Gaus S. A. Lima e Iraildes P. A, pela contribuição em minha formação como graduanda e mestra que me levaram a este doutorado.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho na admirável infra-estrutura que é o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Francisca Teixeira, Curadora da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por ter cedido os isolados para a realização deste experimento.

*À Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo. do Departamento de Antibióticos da UFPE, por ter permitido a realização inicial dos experimentos em seu laboratório e pelo conhecimento me cedido sobre o gênero *Streptomyces*.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos membros da banca de qualificação, Dr^ª. Camila Souza Porto e Dr^ª. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, pela participação e avaliação dessa tese, sendo responsáveis por valiosas sugestões para este trabalho.

Aos membros da banca examinadora da defesa, que ao se disporem a participar da avaliação dessa tese, contribuirão imensamente para o aprimoramento deste trabalho.

Aos funcionários e professores que fazem parte do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFPE, que muito ajudaram e também contribuíram com meu conhecimento no decorrer deste curso.

Aos colegas de doutorado, pela troca de conhecimentos durante as aulas que realizei neste curso.

Aos colegas e amigos do LIKA e LABTECBIO em especial Tatiana, Camila, Carolina, Júlio, Flávio Veras, Flávio Oliveira, Patrícia, Clarissa, Marília, Edgar, Milena, Petrus e Germana, pela ajuda e incentivo durante o decorrer deste trabalho.

Aos funcionários do LIKA, Moisés, Seu Otaviano, Vera, Felipe, Dona Celestina, Rafael, Oscar, Ilma, Paulo, Cláudio, Cleide, Paulina e Conceição.

À minha família, em especial aos meus pais Luiz Mendes e Ivonete, ao meu irmão Luiz Alberto, minha cunhada Lidiane, minha sogra Nazaré e sogro José Antônio, ao meu esposo Davi pelo amor, paciência, incentivo, apoio nos momentos difíceis e ajuda para a minha manutenção no estado de Pernambuco.

Às amigas e amigos, em especial, Dona Pedrina, Alisson, Orivas, Ilma, Jeneffer, Cristina, Mariana, Érica, Juliana, Luana e Graça pela amizade, momentos de divertimento, apoio e hospitalidade durante a minha permanência no estado de Pernambuco

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	2
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 Potencial industrial das enzimas	3
1.2 Proteases	4
1.2.1 Classificação das proteases	4
1.2.2 Fontes de proteases	5
1.2.2.1 Proteases de origem vegetal	5
1.2.2.2 Proteases de origem animal	6
1.2.2.3 Proteases de origem microbiana	6
1.2.3 Aplicação das proteases	7
1.3 Colagenases	8
1.3.1 Colágeno	9
1.3.2 Classificação e mecanismo de ação das colagenases	10
1.3.3 Aplicação industrial de colagenases microbianas	13
1.3.4 Micro-organismos produtores de colagenases	13
1.4 Gênero <i>Streptomyces</i>	14
1.5 Processos de purificação	15
1.6 Sistema de duas fases aquosas –SDFA	16
1.6.1 Tipos de sistemas de duas fases aquosas (SDFA)	17
1.6.2 Fatores que influenciam o sistema de duas fases aquosas	18
1.6.2.1 Massa molar e concentração do polímero	19
1.6.2.2 pH e adição de sais	19
1.6.2.3 Temperatura	21
1.6.3 Aplicações dos sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG/sal	21
1.7 Referências	22
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR <i>STEPTOMYCES</i>	40

spp.

CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES PRODUZIDAS POR <i>STREPTOMYCES</i> sp. DPUA 1559	59
CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO DE COLAGENASES DE <i>STREPTOMYCES</i> sp. 1559 UTILIZANDO O SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS PEG- FOSFATO	73
5 – CONCLUSÕES FINAIS	93
6 – ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	3
Figura 1. Molécula em tripla hélice formada pelo entrelaçamento de três cadeias alfa do tropocolágeno. (SIONKOWSKA, 2006, modificado).	10
Figura 2. Protease colagenolítica típica de <i>Clostridium histoliticum</i> (WATANABE et al., 2004).	12
Figura 3. Imagem obtida através de microscopia eletrônica de micélio e esporos de <i>Streptomyces</i> sp. Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY.	14
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR STREPTOMYCES spp.	40
Figura 1. Curvas de pH, biomassa e atividade colagenolítica obtida do cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559 em pH=6, 200rpm, 1% gelatina, 28°C em 96h.	49
Figura 2. Gráfico de Pareto das variáveis agitação (1), temperatura (2), concentração de substrato (3) e pH (4) sobre o crescimento da biomassa do <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559.	52
Figura 3. Gráfico de Pareto para as variáveis agitação (1), temperatura (2), concentração de substrato (3) e pH (4) sobre a produção de colagenases por <i>Streptomyces</i> sp DPUA 1559.	53
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES PRODUZIDAS POR STREPTOMYCES sp. DPUA 1559	59
Figura 1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade de colagenases produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em 5h.	64
Figura 2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de colagenases produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em 5h.	66
Figura 3. Eletroforese e zimograma da colagenase produzida por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559. Padrão de Peso Molecular: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (60 kDa), Ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).	68
CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO DE COLAGENASES DE STREPTOMYCES sp. DPUA 1559 UTILIZANDO O SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO	73
Figura 1. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos concentração do PEG e concentração de fosfato, tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K).	84

Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos massa molar do PEG e 86
concentração de fosfato, tendo como variável resposta o rendimento (Y).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	3
Tabela 1. Classificação das proteases (RAO et al., 1998, modificado).	5
Tabela 2. Fontes de proteases e suas aplicações	8
Tabela 3. Colagenases extracelulares bacterianas com seu tipo e massa molecular.	12
Tabela 4. Sistemas de duas fases aquosas mais utilizados na separação de proteínas (ZASLAVSKY, 1995, modificado).	17
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR <i>STREPTOMYCES</i> sp.	40
Tabela 1. Atividade colagenolítica qualitativa e quantitativa de cepas de <i>Streptomyces</i> spp isolados de liquens do estado do Amazonas.	48
Tabela 2. Planejamento 2 ⁴ para produção de colagenases por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559.	51
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES PRODUZIDAS POR <i>STREPTOMYCES</i> sp. DPUA 1559	59
Tabela 1. Características das colagenases obtidas de micro-organismos.	65
Tabela 2. Ensaio de inibição enzimática das colagenases produzidas por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559.	67
Tabela 3. Massa molecular de proteases colagenolíticas extracelulares de diferentes espécies bacterianas.	69
CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO DE COLAGENASES DE <i>STREPTOMYCES</i> sp. DPUA 1559 UTILIZANDO O SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO	73
Tabela 1- Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento 2 ⁴ para extração das colagenase em SDFA.	78
Tabela 2- Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento 2 ² para extração das colagenase em SDFA com concentração do PEG de 12,5% e concentração de fosfato de 10%.	79
Tabela 3. Condições e resultados do planejamento experimental 2 ⁴ escolhido para a extração de colagenase por PEG / fosfato em SDFA.	82
Tabela 4. Efeitos estatísticos para as respostas de acordo com o planejamento experimental 2 ⁴ .	84
Tabela 5. Condições e resultados do delineamento experimental 2 ² escolhido para a extração de colagenase por PEG / fosfato em SDFA.	88

Tabela 6. Cálculos dos efeitos estatísticos para as respostas de acordo com o planejamento experimental 2². 88

LISTA DE ABREVIACES

Dex	Dextrana
DPUA	Departamento de Patologia da Universidade Federal do Amazonas
EC	Enzyme Commission
EDTA	cido etileno diamino tetracético
Gly	Glicina
4-Hyp	4 – Hidroxiprolina
Ileu	Isoleucina
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K	Coeficiente de partio
Leu	Leucina
MD	Maltodextrina
MMPs	Metaloproteinases da matriz
PEG	Polietileno glicol
pI	ponto isoelétrico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
PPG	Polipropilenoglicol
Pro	Prolina
PVA	Polivinil lcool
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do sulfato dodecil de sódio
TCA	Tropocolágeno A
TCB	Tropocolágeno B

RESUMO

Colagenases são enzimas proteolíticas de grande interesse industrial. O custo desta enzima purificada é muito elevado, gerando a necessidade da busca de métodos alternativos de produção. O trabalho objetivou selecionar uma cepa do gênero *Streptomyces* produtora de colagenase extracelular, determinar as melhores condições de cultivo para a produção da enzima pela cepa selecionada, realizar a caracterização bioquímica parcial das colagenases produzidas e a purificação parcial das colagenases através do sistema de duas fases aquosa (SDFA) PEG/fosfato. As cepas foram submetidas ao cultivo líquido sob condições controladas, analisando a capacidade de degradar gelatina e azocol, para a escolha do melhor produtor de colagenase. Em seguida foi realizado um planejamento experimental completo 2^4 para a seleção das melhores condições de produção, onde pH, temperatura, velocidade de agitação orbital e concentração do substrato foram estudados. Foi realizada a seguir a caracterização bioquímica da enzima e a purificação parcial das colagenases através do SDFA PEG/fosfato. Dois planejamentos experimentais completos (2^4 e 2^2) foram usados para escolher as variáveis significativas para o processo de extração, sendo o pH, a massa molar do PEG, concentração de PEG e concentração de fosfato as variáveis independentes investigadas. O primeiro SDFA foi composto por, PEG com massa molar de 1500, 4000 e 8000 g / mol com concentrações de 12,5, 15,0 e 17,5% (w / w), fosfato de concentrações de 10,0, 12,5 e 15,0% (w / w) e pH (6,0, 7,0 e 8,0). O segundo planejamento foi composto por, PEG com massa molar de 4000, 8000 e 10.000 g / mol com concentrações de 12,5% (w / w), fosfato de concentrações de 10,0% (w / w) e pH (6,0, 7,0 e 8,0). As respostas avaliadas foram: fator de purificação, coeficiente de partição e rendimento em atividade da enzima. Dentre as cepas de *Streptomyces* estudadas, mais de 97% foram capazes de degradar a gelatina e de utilizar o azocol como substrato, porém, o *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi considerado o melhor produtor da colagenase. A máxima produção da enzima foi obtida após 72 h de fermentação, com atividade colagenolítica de 21,13 U/ml. Através do estudo de produção utilizando planejamento fatorial foi possível obter um valor da atividade colagenolítica de 39,13 U/ml e definir as melhores condições de cultivo (100 rpm, pH 6,0 e 1,5% de gelatina a 28°C). A colagenase apresentou pH ótimo 8,0 e estabilidade na faixa de pH 7,4 a 9,5 durante 5h. Foram observados dois picos de temperatura ótima que foram em 37°C e 50°C, indicando a presença de mais de uma enzima as quais foram estáveis na faixa de 25 a 70°C durante 5h. As colagenases encontradas foram identificadas como serino e aspártico proteases. O zimograma demonstrou várias bandas com atividade proteolítica: 108, 64, 57, 48, 45 e 43kDa. Os melhores resultados obtidos a partir do SDFA foram (coeficiente de partição 0,36, o rendimento de atividade de 167,2% e fator de purificação de 2,53) foram obtidos com o sistema PEG 8000, pH 8,0, c oncentração de PEG 12,5% (m / m) e concentração de fosfato de 10,0% (m / m). Os resultados demonstram o potencial do uso de *Streptomyces* sp. DPUA1559 como produtores de colagenases e que o SDFA foi seletivo para extração de colagenases.

Palavras chave: Colagenase, *Streptomyces*, Caracterização enzimática, SDFA

ABSTRACT

Collagenases are proteolytic enzymes of great industrial interest. The cost of this purified enzyme is very high, creating the need to search for alternative methods of production. The work aimed to select a strain of the genus *Streptomyces* produces extracellular collagenase, determine the best growing conditions for enzyme production by strain selected, perform the partial biochemical characterization of collagenase produced and partial purification of collagenase by aqueous two-phase system (ATPS) PEG / phosphate. The strains were subjected to liquid culture under controlled conditions, analyzing ability to degrade gelatin and azocol to choose the best producer of collagenase. Then we performed a complete experimental design 2^4 for selecting the best production conditions, where pH, temperature, stirring speed orbital and substrate concentration were studied. Was performed following the biochemical characterization of the enzyme and the partial purification of collagenase ATPS using the PEG / phosphate. Two experimental designs complete (2^4 e 2^2) were used for selecting the variables significant for the extraction process and the pH, the molecular weight of PEG, PEG concentration of phosphate concentration and the independent variables investigated. The first ATPS was composed of PEG with a molar mass of 1500, 4000 and 8000 g / mol with concentrations of 12.5, 15.0 and 17.5% (w / w), phosphate concentrations of 10.0, 12.5 and 15.0% (w / w) and pH (6.0, 7.0 and 8.0). The second design was composed of PEG with a molar mass of 4000, 8000 and 10,000 g / mol with concentrations of 12.5% (w / w), phosphate concentrations of 10.0% (w / w) and pH (6.0, 7.0 and 8.0). The answers were: purification factor, partition coefficient and yield of enzyme activity. Among the strains of *Streptomyces* studied more than 97% were capable of degrading gelatine and azocol use as substrate, however, *Streptomyces* sp.DPUA1559 was considered the best producer of collagenase. The maximum enzyme production was obtained after 72 h of fermentation with collagenolytic activity of 21.13 U / ml. Through study on the production of using factorial design was possible to obtain a value of collagenolytic activity of 39.13 U / ml and define the best culture conditions (100 rpm, pH 6.0 and 1.5% gelatin at 28°C). Collagenase showed optimum pH 8.0 and stability in the pH range 7.4 to 9.5 for 5h. Two peaks were observed that were optimal temperature at 37°C and 50°C, indicating the presence of more than one enzyme which were stable in the range 25-70°C for 5h. Found collagenases have been identified as aspartic and serine proteases. The zymogram showed several bands with proteolytic activity: 108, 64, 57, 48, 45 and 43kDa. The best results were from ATPS (partition coefficient 0.36 yield of activity of 167.2% and purification factor of 2.53) were obtained with the system PEG 8000, pH 8.0, concentration PEG of 12.5% (m / m) and phosphate concentration of 10.0% (w / w). The results demonstrate the potential use of *Streptomyces* sp. DPUA 1559 as producers of collagenase and the ATPS extraction was selective for collagenases.

Keywords: Collagenase, *Streptomyces*, enzymatic characterization, ATPS

INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas são o grupo mais importante de enzimas produzidas comercialmente, ocupando uma posição comercial calculada em quase 60% do mercado mundial. São bastante utilizadas como aditivos em detergentes, em tratamento de couro, como agente inseticida, em produtos farmacêuticos e nas indústrias de alimentos (RAO et al., 1998; VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010; HARRISON; BONNING, 2010).

Apesar das enzimas proteolíticas serem obtidas a partir de plantas (papaína e bromelina) e de animais (tripsina, pepsina), são as proteases de origem microbiana que melhor atendem a demanda industrial, passando a ter grande relevância (MONTI et al., 2000; FRANÇA-SANTOS et al., 2009; BON; FERREIRA; CORVO, 2008; BEZERRA; VIEIRA; CARVALHO, 2001; IMELIO et al., 2008).

Dentro do grupo das enzimas proteolíticas estão as collagenases que apresentam capacidade de degradar diferentes tipos de colágeno e vem se tornando cada vez mais importantes comercialmente (RAVANTI; KAHARI, 2000). São utilizadas na medicina em formulações de pomadas para limpeza de feridas infectadas, tratamento de lesões necrosadas, abscessos e queimaduras (RAO et al., 1998; KUMAR; TAKAGI, 1999). Na indústria de cosméticos são utilizadas no preparo de cremes para o tratamento de acne e rugas, limpeza e clareamento da pele (DOMOGATSKY, 2003). Collagenases de micro-organismos são também utilizadas na indústria de alimentos para o amaciamento de carne (TRAN; NAGANO, 2002).

Milhares de preparações enzimáticas, incluindo misturas de biocatalizadores, estão disponíveis no mercado em variados níveis de pureza e preço, dependendo da enzima e do seu grau de pureza (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Uma promissora técnica de extração e purificação de produtos biológicos, o sistemas de duas fases aquosas (SDFA), vem sendo estudada como uma técnica alternativa de purificação de biomateriais (MONTEIRO FILHO, 2010). Esta técnica permite o isolamento de biomoléculas de misturas complexas podendo remover produtos indesejáveis presentes no sistema como polissacarídeos não identificados, pigmentos e proteínas reduzindo a interferência na atividade da enzima (BABU; RASTOGI; RAGHAVARAO, 2008; ZUÑIGA et al., 2006). O SDFA oferece a vantagem de ser constituído por cerca de 85-90% de água, permitindo a partição da biomolécula em condições que mantém as suas propriedades e estrutura. É uma tecnologia promissora para a recuperação e processos de purificação de proteínas (GAVASANE GAIKAR, 2003; RITO-PALOMARES, 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Produzir collagenases a partir cepas de *Streptomyces* spp. provenientes de líquens da região Amazônica, bem como caracterizá-las parcialmente e purificá-las parcialmente através do sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar uma cepa de *Streptomyces* spp. produtora de collagenases;
2. Avaliar a curva de crescimento e produção de collagenases em função do tempo, pela cepa selecionada;
3. Determinar as melhores condições de produção da enzima, utilizando um planejamento fatorial completo 2^4 , avaliando as variáveis: temperatura, pH, agitação, concentração do gelatina;
4. Caracterizar parcialmente a collagenase quanto aos aspectos físico-químicos, tais como, pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH e a temperatura, ação de inibidores, perfil eletroforético e zimograma;
5. Estudar a influência das variáveis (massa molar e concentração do PEG, pH e concentração de fosfato) sobre a extração de collagenases utilizando sistema de duas fases aquosas, e determinar as melhores condições a extração com o auxílio de planejamentos fatoriais (2^4 e 2^2), tendo como respostas o coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação da atividade enzimática;

CAPÍTULO 1

Neste capítulo é apresentada uma revisão geral dos assuntos relacionados com este trabalho de tese, e que contribuiu grandemente para a realização das análises dos resultados e para a discussão dos mesmos. Serão encontrados tópicos que abordarão assuntos como: o potencial industrial das enzimas, a produção de enzimas mundialmente e a posição das proteases neste mercado enzimático; as collagenases que é o ponto chave deste trabalho; o uso dos micro-organismos para a produção de enzimas; o gênero *Streptomyces*, sua descrição e sua capacidade de produzir biomoléculas como as collagenases; os processos de purificação de proteases, mais precisamente o sistema de duas fases aquosas (SDFA).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Potencial industrial das enzimas

Os problemas gerados pelo homem ao meio ambiente, como degradação ambiental e alterações climáticas, devido ao uso inadequado dos recursos naturais, têm gerado a necessidade da procura de tecnologias mais limpas e mais eficientes. Neste contexto, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisados que associa desenvolvimento tecnológico, com a utilização de matérias primas renováveis e preservação ambiental (POLITZER; BON, 2006; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Do ponto de vista industrial, as enzimas possuem características importantes, comparando-se aos catalisadores químicos, devido à sua especificidade tanto por substrato, quanto na promoção de apenas uma reação bioquímica, possibilitando a formação de um produto específico. Algumas das vantagens existentes no uso de enzimas são alta especificidade, condições suaves de reação e a redução de problemas ambientais e toxicológicos (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

É grande o consumo de enzimas a nível internacional e neste mercado, as proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais sendo responsáveis por aproximadamente 60% da venda mundial de enzimas (RAO et al., 1998; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

1.2 Proteases

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das proteínas através da quebra das ligações peptídicas, alterando os substratos com especificidade. O número de proteases descrito é muito grande, representando cerca de 10% de todas as enzimas incluídas na lista (EC) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). Não são facilmente incluídas nos sistemas de nomenclatura enzimática em função de sua grande diversidade de atividade e estrutura (RAO, et al., 1998).

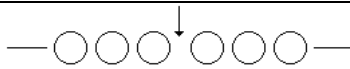
1.2.1 Classificação das proteases

As proteases constituem uma grande família (EC 3.4). São classificadas segundo três critérios principais: 1 – em endopeptidases (que atuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas) e exopeptidases (que clivam as ligações peptídicas próximas as extremidades), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia da proteína. (RAO et al., 1998; MONOD et al., 2002). 2 – quanto à natureza química do sítio catalítico, (serina, aspártico, cisteína e metalopeptidases) e 3 – quanto às relações evolutivas, sendo classificadas em famílias e subdivididas em classes de acordo com a convergência ou divergência de um ancestral comum (RAO, et al., 1998; BARRETT RAWLINGS; O'BRIEN, 2001).

De acordo com o grupo funcional presente no sítio catalítico, as endopeptidases podem ser classificadas como serina, cisteína, aspártico e metalo endopeptidases enquanto que as exopeptidases são divididas com base no seu mecanismo de ação em aminopeptidases e carboxipeptidases (Tabela 1) (MONOD et al., 2002).

As aminopeptidases atuam no N-terminal livre da cadeia polipeptídica podendo liberar um único resíduo de aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (Dipeptidil peptidases), ou um tripeptídeo (tripeptídeo-peptidases) (RAO et al., 1998). As carboxipeptidases atuam no C-terminal da cadeia polipeptídica e liberam um único aminoácido ou um dipeptídeo (MONOD et al., 2002) e de acordo com a natureza do aminoácido presente no sítio ativo, as carboxipeptidases podem ser classificadas em três grupos principais: serina carboxipeptidases, metalocarboxipeptidases e cisteína carboxipeptidases (BON; FERRARA ; CORVO, 2008). Enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99 (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Tabela 1. Classificação das proteases.

Proteases	Modo de ação	EC subclasses
EXOPEPTIDASES		
Aminopeptidases		3.4.11
Dipeptidil peptidase		3.4.14
Tripeptidil peptidase		3.4.14
Carboxipeptidases		
Serina-carboxipeptidase		3.4.16
Metalo-carboxipeptidase		3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase		3.4.18
ENDOPEPTIDASES		
Serina-endopeptidase		3.4.21
Cisteína-endopeptidase		3.4.22
Aspártico-endopeptidase		3.4.23
Metalo-endopeptidase		3.4.24
Endopeptidases com mecanismo catalítico desconhecido		3.4.99

Fonte: RAO et al. (1998), modificado

1.2.2 Fontes de proteases

Considerando que as proteases são importantes para os processos fisiológicos dos organismos vivos, elas são obtidas de diversas fontes como, vegetais, animais e a partir de micro-organismos. Estas enzimas representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos (AEHLE, 2007; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

1.2.2.1 Proteases de origem vegetal

Os processos necessários para a obtenção de proteases de origem vegetal exigem um certo tempo, pois dependem da disponibilidade de área de cultivo e também das condições

climáticas (MEZHLUMYAN *et al.*, 2003). Dois importantes exemplos de proteases obtidas a partir de vegetais são a papaína e a bromelina.

A papaína é uma enzima extraída do latex do mamão (*Carica papaya*) com grande ação proteolítica. (NITSAWANG; HATTI-KAUL; KANASAWUD, 2006). Em grande parte é utilizada na indústria de alimentos para o amaciamento de carne, porém tem outras aplicações como em tratamento de edemas e desbridamento de feridas (NITSAWANG; HATTI-KAUL; KANASAWUD, 2006).

A bromelina é constituída por um conjunto de isoenzimas proteolíticas presentes em vegetais da família Bromeliaceae, na qual o abacaxi é o mais conhecido. Tem aplicações em diversas áreas envolvendo a medicina, indústria farmacêutica, indústria de alimentos, indústrias têxteis. Na medicina é demonstrado *in vitro* a capacidade proteolítica da bromelina em reduzir o crescimento de tumores (MAURER *et al.*, 1988; HARRACH *et al.*, 1998). Na indústria de alimentos é utilizada na clarificação de cervejas, fabricação de queijos, amaciamento de carnes. Nas indústrias têxteis é utilizada para o amaciamento de fibras (DRAETTA; GIACOMELLI, 1993).

1.2.2.2 Proteases de origem animal

As proteases de origem animal para serem produzidas dependem da disponibilidade de animais para o abate, tornando o processo dispendioso (RAO *et al.*, 1998). Duas das principais proteases de origem animal são a tripsina e a pepsina. Trabalhos foram realizados para obtenção dessas enzimas como o de Imelio *et al.*, 2008 que extraiu pepsina de estômago bovino e Tubio *et al.*, 2009 em seu trabalho extraiu tripsina de pâncreas bovino.

A tripsina é uma protease usada no preparo de meios bacterianos e em algumas aplicações médicas especializadas (TUBIO *et al.*, 2009).

A pepsina é uma protease encontrada no estômago de quase todos os vertebrados. (IMELIO *et al.*, 2008). Tem importância na indústria de alimentos, sendo utilizadas como coagulante de leite para a produção de queijos (ALTUN; CETINUS, 2007)

1.2.2.3 Proteases de origem microbiana

Apesar da grande importância das proteases de vegetais e animais, as de origem microbianas, principalmente as bacterianas, são as que melhor atendem a demanda industrial. As bactérias como fonte de proteases apresentam vantagens como, rápido crescimento, grande diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética, a produção não estar

condicionada às questões sazonais e geográficas e ainda pela possibilidade do uso de matérias-primas de baixo custo (RAO et al., 1998; RODRIGUES; SANTÁNNIA, 2001).

As proteases de origem bacteriana são as de maior relevância, comparadas as de outras fontes. JOO et al (2003) relatam que a maioria das proteases que estão disponíveis no mercado são obtidas a partir de bactérias do gênero *Bacillus*.

Muitos trabalhos de produção de proteases por *Bacillus* spp. vem sendo realizados, tais como *Bacillus* sp. MO-1 (OKAMOTO et al., 2001), *Bacillus mojavenensis* (BEG et al., 2003), *Bacillus* sp. RGR-14 (GUPTA; CHAUHAN, 2004), *Bacillus* sp. I-312 (JOO et al., 2005), *Bacillus* sp. RKY (REDDY et al., 2008) e *Bacillus mojavenensis* A21 (HADDAR et al., 2010).

Apesar do grande número de proteases produzidas por organismos do gênero *Bacillus* (JOO et al., 2003; NASCIMENTO; MARTINS, 2004), estas enzimas também são produzidas por outras espécies bacterianas como *Porphyromonas gingivalis* (HOULE et al., 2003), *Teredinobacter turnirae* (ELIBOL; MOREIRA, 2005) *Colwellia* sp. NJ341 (WANG et al., 2008) e *Pseudomonas fluorescens* (KALAIARASI; SUNITHA, 2009), *Streptomyces* sp. A6 (SINGH; CHHATPAR, 2010).

1.2.3 Aplicação das proteases

As proteases podem ser aplicadas de diversas formas. Na indústria farmacêutica, na formulação de pomadas para tratamento de queimaduras e feridas (RAO et al., 1998); na produção de alimentos, principalmente na indústria de laticínios na produção de queijo (VASCONCELOS et al., 2004) e como amaciante de carne (KIM et al., 2007); na indústria de lavanderia, na formulação de detergentes; na indústria de curtumes no processamento de couro, para remoção de proteínas não fibrosas facilitando a embebição com água durante o processo de reidratação e também na remoção pêlos e epiderme (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008); no tratamento de efluentes (SANTAELLA et al., 2009); e em pesquisas que visam esclarecer o relacionamento entre a estrutura, função e síntese de peptídeos e sequenciamento de proteínas (RAO et al., 1998). A Tabela 2 mostra algumas das proteases e suas aplicações.

Tabela 2. Fontes de proteases e suas aplicações

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação	Referência
Vegetal			
<i>Carica papaya</i>	Papaina	Medicina, Indústria farmacêutica, de couro,	Draetta; Giancomelli, 1993
<i>Ananas comosus</i>	Bromelina	processamento de alimentos.	Rao et al., 1998 Mezhlumyan et al., 2003 Borracini, 2006 Nitsawang et al., 2006 França-Santos et al., 2009 Elias et al., 2011
Animal	Pepsina	Preparo de meios bacterianos,	Rao et al., 1998 Altun; Centinus, 2007
	Tripsina	indústria de alimentos, medicina.	Imelio et al., 2008 Tubio et al., 2009
Micro-organismos			
<i>Mucor pusillus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptomyces</i> sp	Proteases ácidas	Coagulante de leite para a produção de queijos, bebidas, temperos.	Somkuti; Babel, 1967 Azeredo et al., 2004 Vishwanatha et al., 2010
<i>Bacillus caldolyticus</i> <i>Streptomyces tendae</i>	Proteases neutras	Indústria de alimento	Burg et al., 1991 Seong et al., 2004
<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Streptomyces gulbargensis</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>	Proteases alcalinas	Indústria de alimentos, curtumes, detergentes e de seda.	Moreira et al., 2001 Joshi et al., 2007 Devi et al., 2008 Kalaiaarasi; Sunitha, 2009 Vishalakshi et al., 2009

1.3 Colagenases

Fazendo parte das proteases de grande aplicação industrial estão as colagenases. Estas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar moléculas de colágeno (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000).

1.3.1 Colágeno

O colágeno compõe uma família de proteínas fibrosas insolúveis e estruturais de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, estando presente em todos os organismos multicelulares, representando cerca de 30% do peso total das proteínas animais (RAVANTI; KAHARI, 2000).

É encontrado na pele, tendões, vasos sanguíneos, cartilagem, ossos, córnea, interstícios de todos os outros tecidos e órgãos, exceto no sangue, linfa e tecidos queratinosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A degradação do colágeno pode estar envolvida tanto em situações fisiológicas como, desenvolvimento ósseo fetal, desenvolvimento embrional, reparação de feridas, como também em situações patológicas, como, invasão de tumores malignos, ulcerações intestinais, inflamação crônica periodontal e artrite reumatóide (RAVANTI; KAHARI, 2000).

O colágeno é formado através de 19 cadeias α diferentes (cadeia α ; é a denominação dada a cada cadeia polipeptídica que irá formar a tripla hélice do colágeno) e que associadas 3 a 3, darão origem aos diferentes tipos de colágeno (Tabela 3), que são classificados de acordo com as características da estrutura primária das cadeias α que formam a tripla hélice (SILVA, 2005).

A unidade estrutural básica do colágeno é denominada tropocolágeno que possui massa molecular de aproximadamente 285kDa e é constituído de três cadeias polipeptídicas, denominadas α (Figura 1), enroladas entre si numa configuração de tripla hélice, através da formação de pontes de hidrogênio, que estabilizam esta estrutura (DUARTE et al., 2005).

Os colágenos contêm cerca de 35% de glicina e cerca de 11% de alanina. Ainda mais característico é o conteúdo em prolina e em 4-hidroxiprolina, um aminoácido raro em outras proteínas que não o colágeno e a elastina. Juntos, a prolina e a hidroxiprolina representam perto de 21% de todos os resíduos de aminoácidos dos colágenos (NELSON; COX, 2004). Apenas resíduos de Gly podem ser acomodados nas voltas das cadeias individuais. Os resíduos Pro e 4-Hyp permite a torção aguda da hélice do colágeno. 4-hidroxiprolina tem um papel especial na estrutura do colágeno e na história humana. A organização das cadeias da tripla hélice colágeno proporciona resistência à tração maior que a de um fio de aço. (NELSON; COX, 2004).

Atualmente são conhecidos 29 tipos de colágeno, os quais se diferenciam na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais (SODERHALL et al., 2007). O mais conhecido química e estruturalmente e comumente encontrado na matrix extracelular de animais vertebrados, é o colágeno do tipo I,

o qual é formado por duas cadeias idênticas chamadas $\alpha 1$, possuindo cerca de 1.056 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente $\alpha 2$, possuindo cerca de 1.038 resíduos (SILVA, 2005; DUARTE et al., 2005).

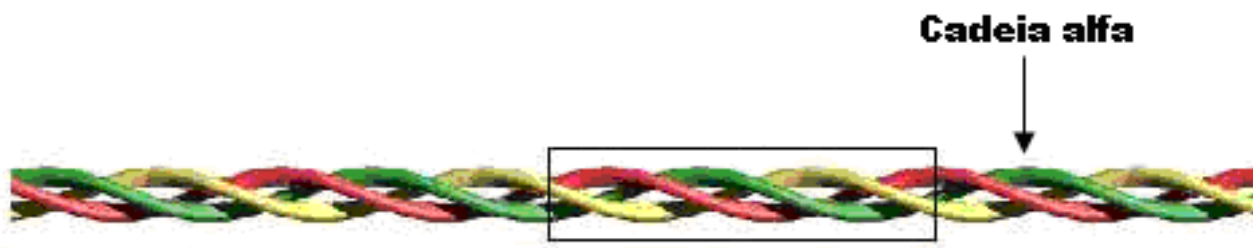


Figura 1. Molécula em tripla hélice formada pelo entrelaçamento de três cadeias alfa do tropocolágeno. (SIONKOWSKA, 2006, modificado).

O colágeno em suas formas nativa, desnaturada e seus peptídeos, provenientes da degradação enzimática são interessantes biomateriais e têm sido demonstrado em diversas atividades biológicas de interesse industriais e medicinais, levando a uma grande variedade de aplicações, por exemplo em produtos de hidratante de pele, em conservantes, produção de cosméticos, na nutrição (NAKAYAMA et al., 2000; UESUGI et al., 2008). Devido à grande busca por produtos naturais, o estudo de biomateriais com múltiplas funções, como colágenos e seus fragmentos peptídicos tem recebido bastante atenção (WATANABE, 2004).

1.3.2 Classificação e mecanismo de ação das collagenases

As proteases collagenolíticas, têm classificação diversificada, não obedecem facilmente às regras de nomenclatura, devido à diversidade de ação e estrutura (RAO et al., 1998).

De todas as proteases collagenolíticas, as metaloproteases (MMP) da matriz extracelular de mamíferos tem sido investigada com mais detalhes do que as proteases collagenolíticas de bactérias (RAVANTI; KAHARI, 2000).

Com relação as proteases collagenolíticas de bactérias, as mais frequentes são metaloproteases, enquanto que o número de serina-proteases e outras proteases é menor. Nagano et al. (1999) purificaram collagenase de *Bacillus subtilis* FS-2 que pertence ao grupo das cisteína proteases; Tsuruoka et al. (2003) estudaram uma protease collagenolítica serina-carboxil de *Alicyclobacillus sendaiensis*; Petrova et al. (2006) purificaram serino collagenase

de *Thermoactinomyces* sp. 21E e Uesugi et al. (2008) estudaram serina protease collagenolítica de *Streptomyces omiyaensis*.

As collagenases ou metaloproteases da matriz extracelular (MMPs) são as principais proteases capazes de clivar as fibras do colágeno nativo dos tipos I, II, III, V e IX. O colágeno tipo I é clivado por collagenases de fonte animal especificamente no sítio entre Gly⁷⁷⁵ - Ileu⁷⁷⁶ da cadeia $\alpha 1$ e entre os resíduos de Gly⁷⁷⁵ – Leu⁷⁷⁶ da cadeia $\alpha 2$ pela MMP-1, MMP-8 e MMP-13, situados a $\frac{3}{4}$ de distância da porção NH₂-terminal. Estas collagenases clivam a tripla hélice do colágeno gerando fragmentos de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$, o tropocolágeno A (TCA) e o tropocolágeno B (TCB), substrato para a ação das gelatinases (MMP-2). (BORKAKOTI, 2000; DUARTE et al., 2005; KANTH et al., 2008).

A hidrólise realizada pelas collagenases do tipo metaloproteases de bactérias ocorre na maioria das vezes entre a ligação peptídica de resíduos X e Gly-Pro, onde X é mais frequentemente um aminoácido neutro, sequência nas regiões não-polares da molécula de colágeno (VAN WART; STEINBRINK, 1981; HARRINGTON, 1996; KANTH et al., 2008).

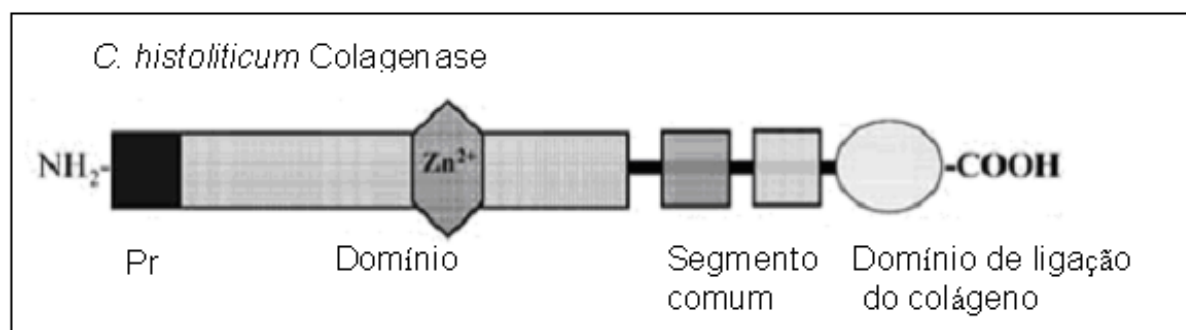
Outra característica importante das proteases collagenolíticas bacterianas é possuir massa molecular maior do que outras proteases (Tabela 3). Watanabe et al. (2004) relataram que as massas moleculares de metaloproteases collagenolíticas de *Clostridium histolyticum*, *V. alginolyticus*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus* são muito grandes em relação as de outras metaloproteases. Também as serino proteases collagenolíticas de *Geobacillus collagenovorans* e *Streptococcus gordonii* têm subunidades simples com massas moleculares muito maiores, 105 kDa e 98 kDa, respectivamente estando em contraste com as massas moleculares de outras serino proteases de bactérias, que geralmente variam entre 18 kDa e 35. A maior massa molecular de proteases collagenolíticas de bactérias pode ser devido a presença de domínios ligantes do colágeno, uma forma sofisticada de evolução para a sobrevivência das bactérias patogênicas. A presença de domínios na collagenase ColG de *C. histolyticum* (Figura 2), que é o micro-organismo mais bem estudado quanto a produção de collagenases, se ligam a todos os tipos de fibras colágenas, independentemente do seu diâmetro (TOYOSHIMA et al., 2001).

Em geral, micro-organismos como as bactérias que produzem collagenases são invasores de hospedeiros e presumivelmente, as enzimas contribuem para a patogenicidade, permitindo que os organismos penetrem a barreira do tecido conjuntivo. Um importante exemplo deste tipo de invasão foi demonstrado em 1961 por Mandl com a degradação do tecido conjuntivo durante a infecção por *Clostridium histolyticum* (PETROVA; DEREKOVA; VLAHOV, 2006).

Tabela 3. Colagenases extracelulares bacterianas. Tipo e massa molecular.

Bacteria	Tipo	Massa molecular (kDa)	Fonte
<i>Clostridium histolyticum</i>	Metaloprotease	116	Yoshihara et al., 1994
<i>Clostridium perfringens</i>		120	Matsushita et al., 1994
<i>Vibrio vulnificus</i> CYK279H		35	Kang et al., 2005
<i>Bacillus pumilus</i> Col-J		58,64	Wu et al., 2010
<i>Streptomyces</i> sp 3B		116 ou 97	Petrova et al., 2006
<i>Streptomyces parvulus</i>		52	Sakurai et al., 2009
<i>Streptomyces</i> sp A ₈		70	Chakraborty et al., 1986
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> NTA-1	Serino protease	37	Tsuruoka et al., 2003
<i>Streptococcus gordonii</i>		98	Juarez et al., 1999
<i>Bacillus</i> sp 21E		210 (2 x 105)	Okamoto et al., 2001
<i>Thermoactinomyces</i> sp. 21E		50	Petrova et al., 2006
<i>Bacillus subtilis</i> fs-2	Cisteína protease	125	Nagano et al., 1999

As colagenases microbianas, como as de *C. histolyticum*, possuem vantagens comparando-se as de origem animal, pois, além da capacidade de hidrolisar todos os tipos de colágenos, também apresentam afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (JUNG et al., 1998; TOYOSHIMA et al., 2001).

Figura 2. Protease colagenolítica típica de *Clostridium histolyticum* (WATANABE, 2004).

1.3.3 Aplicação industrial de collagenases microbianas

As collagenases microbianas apresentam diversas aplicações industriais. Na indústria de cosméticos são utilizadas para o preparo de pomadas para tratamento de rugas, acne, limpeza de pele (DOMOGATSKY, 2006).

Na indústria de curtumes apresenta grande utilização para o processamento do couro e também para a digestão de resíduos descartados pelas indústrias (ZERDANI et al., 2004; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Na indústria de alimentos são bastante utilizadas para limpeza de mariscos e para o amaciamento de carne (TRAN; NAGANO, 2002). Benito et al. (2002) estudaram a ação de collagenase obtidas a partir de *Penicillium chrysogenum* em tratamento de carnes e concluiu que houve uma melhora na textura e no sabor.

Na medicina podem ser utilizadas em pomadas para limpeza de feridas necrosadas, cicatrizes pré-operatórias, cicatrizes de queimaduras, lesões de mamilos de mulheres em aleitamento e remoção de cicatrizes hipertróficas (CHENG et al., 1999; KUSCU et al., 2002; HOYAMA et al., 2005).

1.3.4 Micro-organismos produtores de collagenases

O principal micro-organismo utilizado para a produção industrial de collagenases é o *Clostridium histolyticum*. Estas collagenases (EC 3.4.24.3) são metaloproteases dependentes de zinco, apresentam massa molecular de 116 kDa e são capazes de hidrolizar as regiões de tripla hélice do colágeno, sob condições fisiológicas, tão bem quanto hidrolizam substratos de peptídeos sintéticos (BOND; VAM, 1984; GROSS, 1997).

Após a demonstração da atividade collagenolítica em culturas filtradas de certas espécies de *Clostridium* por Mandl no ano de 1961, um grande número de outras espécies microbianas, tem sido utilizadas para sintetizar enzimas, que podem ser classificadas como collagenases (PETROVA; DEREKOVA; VLAHOV, 2006).

Muitos trabalhos são desenvolvidos na busca de collagenases por diferentes micro-organismos como os fungos: *Aspergillus flavus* (SUKHOSYROVA et al., 2003), *Rhizoctonia solani* (HAMDY, 2008) e *Candida albicans* (LIMA et al., 2008) e bactérias *Streptomyces* sp (CHAKRABORTY; CHANDRA, 1986), *Peptostreptococcus magnus* (KREPEL et al., 1992), *Borrelia burgdorferi* (GRAB et al., 1996), *Clostridium histolyticum* (SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2000), *Alicyclobacillus sendaiensis* (TSURUOKA et al., 2003), *Vibrio vulnificus* (KANG et al., 2005), *Clostridium perfringens* (TAMAI et al.,

2008), *Streptomyces omiyaensis* (UESUGI et al., 2008), *Bacillus pumilus* Col-J (WU et al., 2010) e *Parvimonas micra* (TSUZUKI; MAYER, 2010).

1.4 Gênero *Streptomyces*

Streptomyces pertencem ao grupo dos actinomicetos que são bactérias da ordem Actinomycetales. São bactérias gram-positivas, aeróbicas estritas e apresentam características como crescimento em colônias arredondadas, formação de grumos quando cultivado em meio de cultura líquido. Possuem filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetro entre 0,5 a 2,0 μm , tipicamente ramificados denominados de micélio (Figura 3), reprodução é feita através de fragmentos das hifas ou por produção de esporos assexuados em áreas especializadas do micélio (WILLIAMS; SHARPE; HOLT, 2001).

Apesar do solo ser seu principal habitat, os *Streptomyces* também podem ser encontrados em mares, em associação com líquens (GONZÁLEZ et al., 2005; CHAKRABORTY et al., 2009), em tecidos animais e vegetais, (MARTÍN et al., 2004; ZHI-QI et al., 2006). Grande parte dos *Streptomyces* tem crescimento em pH neutro ou medianamente alcalino, porém existem muitos relatos provando o crescimento de algumas cepas de *Streptomyces* em pH ácido (3,5) ou alcalino (pH 8 a 11,5) (SCHREMPF, 1999).

A presença deste micro-organismo é percebida devido à liberação de um odor característico de solo úmido que é causada pela produção de uma substância chamada de “geosmin”, um óleo neutro, que apresenta ponto de ebulição de aproximadamente 270°C, contém carbono e hidrogênio. (GERBER; LECHEVALIER, 1965; CANE et al., 2006).



Figura 3. Imagem obtida através de microscopia eletrônica de micélio e esporos de *Streptomyces* sp. Fonte: SCIENCE PHOTO LIBRARY.

A família *Streptomycetaceae* compreende três gêneros, *Streptomyces*, *Kitasatospora* e *Streptoverticillium*, dentre estes, o *Streptomyces* é representado na natureza por um grande número de espécies e variedades, as quais diferem na morfologia, fisiologia e atividades bioquímicas (WILLIAMS; SHARPE; HOLT, 2001).

Apesar de serem grandes produtores de antibióticos o gênero *Streptomyces* é bem conhecido pela produção de enzimas extracelulares (SINGH; CHHATPAR, 2010).

Dentre as várias enzimas produzidas pelo gênero *Streptomyces* estão as collagenases e alguns trabalhos vêm sendo realizados buscando produzir, caracterizar e purificar collagenases por estes micro-organismos. Collagenases produzidas por micro-organismos do gênero *Streptomyces* apresentam características semelhantes. Rippon e Peck (1967) produziram collagenase de *Streptomyces madurae* apresentando um pH ótimo de 7,5. Endo et al. (1987) purificaram collagenase de *Streptomyces* sp. C51 com pH ótimo de 8-9 e temperatura ótima de 35-40°C. Ivanko et al. (2002) produziram collagenase de *Streptomyces* sp. 1349 com pH ótimo de 6-7 e 9-10 e temperatura ótima de 37 e 60°C. Petrova et al. (2006), purificaram collagenases a partir de *Streptomyces* sp. 3B e identificaram a presença de duas collagenase com pH e temperatura ótima, 7,5 e 37°C respectivamente. Uesugi et al. (2008) produziram collagenases de *Streptomyces omiyaensis* com pH ótimo de 8-9 e temperatura ótima de 50, 45 e 55°C. Sakurai et al. (2009) purificaram collagenase de *Streptomyces parvulus* e verificaram que o pH ótimo da enzima era 9,0 e temperatura ótima de 50°C.

1.5 Processos de purificação

A etapa de purificação de um produto biotecnológico produzido por células, sejam bacterianas ou de animais, representa uma etapa complexa do processo devido as características das biomoléculas de interesse e dos meios utilizados. As etapas de purificação são mais complexas do que as etapas de cultivo, porque não existem processos de purificação de aplicação geral (BON; FERREIRA; CORVO, 2008). A elaboração de técnicas e métodos de purificação de proteínas é de fundamental importância para grande parte dos avanços nas indústrias de biotecnologia (COSTA; PESSOA-JR; ROBERTO, 2000).

Os procedimentos utilizados na purificação de proteínas baseiam-se em técnicas de separação baseadas na carga, tamanho, propriedades das ligações e na solubilidade das moléculas (BAYNES; DOMINICZAR, 2007).

São muitos os métodos que podem ser utilizados para a separação de proteínas e outras substâncias e a escolha do processo de purificação a ser utilizado vai depender da aplicação

final da molécula-alvo, das características físico-químicas e também das impurezas. Há produtos (ácidos orgânicos, enzimas industriais) cuja aplicação não necessita de elevado grau de pureza, de modo que operações cromatográficas não são necessárias e, por vezes, a simples concentração do meio é suficiente para a comercialização e o uso. Produtos farmacêuticos (diagnósticos e terapêuticos) são os que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Uma medida dessa complexidade é o custo do processo de purificação, o qual pode chegar a 80% do custo final do produto (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

A redução do custo e de perda da molécula-alvo no processo de purificação é de fundamental importância na viabilidade do processo e para evitar perda pode-se reduzir o número de etapas do processo combinando finalidades diferentes em uma única etapa, por exemplo, clarificando, concentrando e pré-purificando simultaneamente pela extração em sistemas de duas fases aquosas (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

1.6 Sistema de duas fases aquosas –SDFA

Os sistemas de duas fases aquosas frequentemente são formados por uma solução aquosa de um ou dois polímeros hidrófilos, ou de polímeros com determinados sais. Quando dois certos polímeros, por exemplo, dextrana (Dex) e polietileno glicol (PEG), são misturados na água acima de determinadas concentrações, a mistura se separa em duas fases aquosas imiscíveis (XU et al., 2003).

A separação entre a molécula alvo e os contaminantes é resultado de uma partição diferenciada, decorrente das diferentes solubilidades apresentadas por esses solutos, em cada uma das fases aquosas. O uso deste sistema garante a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas, pois apresentam uma elevada porcentagem de água, 85 a 90%. (GAVASANE; GAIKAR, 2003).

O SDFA foi inicialmente descoberto por Beijerick (1896), quando percebeu que ao se misturar gelatina, ágar e água em determinadas concentrações ocorria a formação de um sistema de duas fases, onde a fase inferior ficava rica em ágar e a fase superior rica em gelatina. Depois, Albertsson utilizou este sistema, em 1950 para o isolamento e separação organelas e fragmentos celulares de planta e neste período ele descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, bem como o PEG, dextrana e água também formavam um SDFA. Desde então os sistemas de duas fases aquosas contendo dois polímeros têm encontrado ampla aplicação para separação da maioria dos materiais biológicos e os

sistemas contendo um único polímero e sais, também têm se mostrado útil na separação de macromoléculas (ALBERTSSON, 1986; BABU; RARTOGI; RAGHAVARAO, 2008).

Nos SDFA`s constituídos de PEG/dextrana e PEG/sais, a fase mais leve, é rica em PEG enquanto que a mais pesada é rica em dextrana ou sais. Os polímeros e os sais são solúveis em água, mas são incompatíveis entre si levando a separação e a formação em duas fases. Esses dois tipos de sistemas além de apresentarem propriedades físicas favoráveis como diferenças na viscosidade e nas densidades entre as fases, também obedecem às questões legais, pois, tanto o PEG como a dextrana são substâncias atóxicas e não causam distúrbios ao ambiente (SARMENTO et al., 1994; PADILHA et al., 2011).

1.6.1 Tipos de sistemas de duas fases aquosas (SDFA)

Os SDFA`s mais empregados e estudados são os constituídos por PEG/Dx, PPG/Dx; sulfato dextrana de sódio/PPG; PEG/fosfato de potássio, PEG/sulfato de magnésio e PEG/citrato de sódio, a Tabela 4 mostra alguns tipos de sistemas de duas fases, porém, em escala industrial, há preferência da utilização do SDFA contendo polietileno glicol (PEG) + sal em relação o uso de SDFA compostos por PEG + Dex, devido ao elevado custo da dextrana. Os sistemas formados por PEG e sal apresentam rápida separação de fases, baixo custo e elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade (ALBERTSSON, 1971; PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005).

Tabela 4. Sistemas de duas fases aquosas mais utilizados na separação de proteínas.

Polímero Polipropileno glicol	Polímero Polietileno glycol (PEG) Dextrana (Dx) Polivinil álcool (PVA)
Polietileno glicol	Dextrana (Dx) Maltodextrina (MD)
Polímero	Componente de baixa massa molar
Polietileno glicol e copolímeros	Sais inorgânicos: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4$, Na_2HPO_4 , K_2CO_3 , K_3CO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , FeSO_4
Polietileno glicol	Glicose, maltose
Polipropileno glicol	Sais inorgânicos: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 Glicerol

Fonte: ZASLAVSKY, (1995) modificado.

O polietileno glicol (PEG) é um polímero bastante utilizado para os sistemas de duas fases aquosas. É composto por uma estrutura de subunidades repetidas, denominadas de

monômeros, sendo encontrado em diversas massas molares e representado pela fórmula geral $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Em massas molares abaixo de 1000 g/mol é encontrado como solução incolor ou pasta e em massas molares acima de 1000 g/mol encontra-se na forma de pó ou flocos brancos. Pode ser armazenado em temperatura ambiente (WALTER; BROOKS; FISHER, 1985).

O uso deste polímero é de grande interesse biotecnológico, principalmente pelo baixo custo; pelas propriedades físicas e químicas favoráveis como exclusão, em ambientes aquoso, de outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles; são compostos biodegradáveis e atóxicos, a descarga de PEG não gera problemas ao meio ambiente e não diminui a atividade das biomoléculas. Os polietileno glicóis (PEGs) são polímeros industrialmente importantes, tendo propriedades de solubilização únicas, dissolvem-se em água em todos os graus de temperatura controlada e formam complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos (HARRIS, 1992; KIRINCIC; KLOFUTAR, 1999; LI; KAO, 2003; PADILHA et al., 2011).

Apesar de existirem vários sais que formem duas fases com o PEG, como por exemplo, o sulfato de amônio (ZAVARZINA et al., 2002), sulfato de sódio (ASHIPALA; HE, 2008) e o citrato de sódio (PORTO et al., 2011), o sal fosfato de potássio é o mais utilizado por apresentar baixo custo e alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação aos outros sais (ALBERTSSON, 1971).

1.6.2 Fatores que influenciam o sistema de duas fases aquosas

A formação e a partição de biomoléculas nos sistemas de duas fases aquosas podem ser influenciados por diversos fatores. Nesses sistemas ocorrem interações complexas entre as substâncias de interesse com os componentes de cada fase envolvendo interações entre as cargas hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e força de *Van der Waals*. Por isso, a eficiência da partição vai depender tanto dos fatores relacionados ao próprio sistema (componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero ou do sal, pH e temperatura) como dos fatores relacionados à biomolécula alvo (hidrofobicidade, distribuição das cargas, ponto isoelétrico e massa molar (ALBERTSSON, 1986; SCHMIDT et al., 1994; FERREIRA et al., 2009).

1.6.2.1 Massa molar e concentração do polímero

Na maioria das vezes, o aumento na massa molar do polímero induz a partição da biomolécula para a fase oposta do sistema. Ocorrerá o oposto, caso haja uma diminuição da massa molar do polímero. Este comportamento pode ser explicado em termos de exclusão, pois com o aumento da massa molar do polímero o volume disponível vai diminuir o que levaria a uma diminuição da solubilidade das biomoléculas hidrofílicas na fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986; JOHANSSON; TJERNELD, 1994).

Com relação a biomolécula de interesse, quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e dependendo do tipo de interação, a partição para a molécula será mais favorável a uma das fases. Geralmente o valor do coeficiente de partição (K) diminui com o aumento da massa molar da biomolécula (SILVA, 2010).

Além do efeito do volume de exclusão, a massa molar do PEG também participa da interação hidrofóbica, onde aumentando a massa molar deste polímero ocorrerá aumento na capacidade de interação com proteínas hidrofóbicas. Aparentemente, isto ocorre independente do volume de excluído, pois PEG com grande massa molar possui a capacidade de formar ligações intramoleculares, adquirindo assim uma conformação mais compacta (TUBIO; MERLI, PICÓ, 2004; FARRUGIA; NERLI; PICÓ, 2003).

Quanto a concentração do polímero, tem sido relatado que com o aumento da concentração do PEG leva a um decréscimo da partição das proteínas, o que não é regra geral, vai depender do sistema (RABELO et al., 2004).

A concentração do polímero usada na formação do sistema de duas fases aquosas, depende da massa molar do mesmo. Estudos realizados por Padilha et al. (2011) mostraram que menores concentrações de PEG foram utilizadas para formar o SDFA com PEG de maior massa molar, segundo o autor isso torna significativo em termos econômicos.

1.6.2.2 pH e adição de sais

O pH influencia na partição de biomoléculas carregadas eletricamente, entretanto, esta influência da carga da biomolécula vai depender muito do tipo de sal presente no sistema, uma vez que diferentes sais dão origem a diferentes potenciais elétricos entre as fases. Alterando-se o pH, ocorrem mudanças na distribuição de cargas da proteína e também induz a modificações conformacionais na estrutura das proteínas, levando a mudanças no seu

comportamento de separação (ALBERTSSON, 1986; FORCINITI et al., 1991; GAUTAM; SIMON, 2006).

As partições das proteínas, como as enzimas dependem dos seus pontos isoelétricos (pI s), que é o valor de pH onde a proteína tem número igual de cargas positivas e negativas. Em pH menores do valor de pI ocorre o aumento da carga positiva e em pH maiores do valor de pI , ocorre aumento da carga negativa. As mudanças de cargas das proteínas podem ser usadas para direcionar a partição (HUDDLESTON et al., 1991; FORCINITI et al., 1991).

As proteínas carregadas negativamente, tem mais afinidade pela fase superior que é rica em PEG (ENGEL et al., 2000), também o aumento na concentração do íon mais carregado negativamente pode aumentar a força de repulsão entre a fase inferior rica em sal e a proteína (SHANG et al., 2004).

Extremas condições de pH podem levar a desnaturação das proteínas. Na maioria das vezes, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986).

Quanto a composição de sal, cada tipo, assim como a concentração deles, irá afetar o coeficiente de partição (NASCIMENTO et al., 2010). Isso significa que diferentes íons possuem diferentes afinidades pelas fases, criando uma diferença de potencial elétrico entre as fases, que por sua vez direciona a partição de materiais biológicos carregados (SARUBBO, 2000).

Os sais possuem distribuição diferenciada entre as duas fases, por exemplo: o sal fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema e o NaCl tem afinidade para ambas as fases, por isso eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases (FORCINITI, 2002). Além disso, íons mais hidrofóbicos se direcionam para a fase PEG, levando juntamente proteínas hidrofóbicas e cátions e com isso induzem a transferência de proteínas para a fase PEG.

Um importante efeito que ocorre devido ao aumento da concentração de sal é o “efeito *salting out*”. Neste efeito a solubilidade de biomoléculas na fase inferior diminui, o que leva a um aumento de particionamento de biomoléculas para a fase superior (TRINDADE et al., 2005; LUECHAU et al., 2009).

1.6.2.3 Temperatura

A temperatura afeta diretamente o diagrama de fase. Dependendo de seu nível pode causar efeito na composição das fases em equilíbrio, alteração da estrutura da biomolécula e desnaturação (SARUBBO, 2000; MURUGESAN; PERUMALSAMY, 2005).

O efeito da temperatura no SDFA varia de acordo com o tipo de sistema, pois vai depender do tipo de polímero utilizado. Para sistemas com PEG/ dextrana, a medida que se aumenta a temperatura é necessário uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para facilitar a formação das fases, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Para sistemas com PEG/sal, ocorre o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada (GU, 2000). Porto, 2008 relata que há a necessidade de estudos mais aprofundados para se esclarecer o efeito da temperatura na partição e a determinação de seus efeitos termodinâmicos.

1.6.3 Aplicações dos sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG/sal

É grande o uso dos sistemas de duas fases aquosas na purificação de biomoléculas e a maioria dos SDFA utilizados são constituídos por PEG/ sal.

Esmanhoto et al. (2002) extraíram, através do SDFA PEG/ fosfato, o antibiótico retamicina a partir do meio de cultura de micro-organismos filamentosos *Streptomyces olindensis* e *Monascus purpureus*, e também estudaram a influência de quatro variáveis: massa molar do PEG, pH, tempo de contato entre as fases e força de centrifugação e o melhor valor do coeficiente de partição foi de 8,2 e rendimento do processo de 91,3% que foi obtido em PEG 6000 (10% w/w), fosfato a 20% (w/w) e pH 6,0.

Chouyyok et al. (2005) extraíram protease alcalina de célula de *Bacillus subtilis* TISTR25 utilizando sistemas aquosos de duas fases de polietileno PEG/fosfato de potássio, obtendo rendimento de até 96,3%.

Babu; Rartogi; Raghavarao (2008) empregou pela primeira vez a extração em sistema de duas fases aquosa para a separação e purificação de uma mistura de enzimas (bromelina e polifenoloxidase), do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.). O sistema polietileno glicol / fosfato de potássio (que compreendeu de 18% PEG 1500 e fosfato 14%) resultaram em cerca de 228% recuperação da atividade e aumento de 4,0 vezes na pureza, no caso de bromelina e recuperação da atividade cerca de 90% e aumento de 2,7 vezes na pureza de polifenol oxidase.

Porto et al. (2008) realizaram a extração de proteases através do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato a partir de *Clostridium perfringens* o melhor desempenho do sistema foi com MPEG = 10.000 g / mol, CPEG = 22% (w / w) e CC = 8,0% (w / w), com 8,5 pH. Sob essas condições, o rendimento atividade foi muito alta (131%). Os autores relatam que o SDFA parece ser uma alternativa primária de concentração e descontaminação para a preparação de vacinas a partir do extrato fermentado de *Clostridium perfringens*.

Soares et al. (2011) purificaram lectina de *Canavalia ensiformis* usando sistema de duas fases aquosas PEG / citrato. A proteína foi extraída com maior sucesso da parte inferior do sistema composto de 22% (w / w) PEG 8000 e 12% (w / w), citrato, pH 6,0. O fator de purificação obtido foi 11.5 com perda na atividade hemaglutinante.

Porto et al. (2011) extraíram lectina a partir de semente e *Canavalia grandiflora* usando o sistema de duas fases aquosas PEG/citrato e o sistema composto de 20%(m/m) PEG 400, concentração de citrato 20% (m/m) de citrato, pH 6,0 permitiu um rendimento de 104% com coeficiente de partição de 8.67.

Apesar da grande importância das técnicas de SDFA na separação de biomoléculas de interesse biotecnológico, é pouco o conhecimento sobre as interações básicas moleculares da partição de proteínas (LI et al., 2003; TUBIO; NERLI; PICÓ, 2004). Embora muitos trabalhos já tenham sido realizadas utilizando o sistema de duas fases aquosas para a purificação de biomoléculas, poucos são os estudos que utilizam o SDFA para a extração de collagenases.

1.8 Referências

AEHLE, W. **Enzymes in Industry, Production and Applications**. 3 ed. editora Wiley, the Netherlands. 2007. p.15, 35, 36 e 164.

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3. edição. New York.:Wiley-Interscience. 1986. p.346.

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 2 edição. John Wiley. 2. ed. New York, 1971.

ALTUN, G.D.; CETINUS, S.A. Immobilization pf pepsin on chitosan beads. **Food chemistry**, v. 100, p. 964-971, 2007.

ASHIPALA, O.K.; HE, Q. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource technology**, v. 99, p. 4112-4119, 2008.

AZEREDO, L.A.I.; FREIRE, D.M.G.; SOARES, R.M.A.; LEITE, S.G.F.; COELHO, R.R.R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and microbial technology**, v. 34, p. 354-358, 2004.

BABU, B.R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical engineering and processing**, v. 47, p.83-89, 2008.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of structural biology**, v. 134, p. 95-102, 2001.

BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica médica**, 2 edição, Editora Elsevier. 2007. p. 17 -18.

BEG, Q.K.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process biochemistry**, v. 39, p. 203-209, 2003.

BEIJERICK, M.W. **Zbl. Bakt**, v.02, p. 627-689, 1896

BENITO, M. J.; RODRÍGUEZ, M.; NUNEZ, F.; ASENIO, M.A.; BERMÚDEZ, M.E.; CÓRDOBA, J.J. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.7, p.3532-3536, 2002.

BEZERRA, R.S.; VIEIRA, V.L.A.; CARVALHO Jr, L.B. Proteases no trato digestivo de peixes. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 22, p. 46-49, 2001.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**, editora intercência, Portugal, 2008.

BOND, M.D.; VANWART, H.E. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. **Biochemistry**, v. 23, n.13, p.3085-3091, 1984.

BORKAKOTI, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. **Journal of Molecular Medicine**, v.78, p. 261-8, 2000.

BORRACINI, H..M..P. **Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontínuo**. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade estadual de campinas, faculdade de engenharia química, área de concentração: sistemas de processos químicos e informática, 2006.

BURG, B.V.D.; ENEQUIST, H.G.; HARR, M.E.V.D.; EIJSINK, V.G.H.; STULP, B.K.; VEVEMA, G. A highly thermostable neutral protease from *Bacillus caldolyticus*: cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis* and characterization of the gene product. **Jornal of bacteriology**, v.173, n.13, p. 4107-4115, 1991.

CANE, D.E.; HE, X.; KOBAYASHI, S.; OMURA, S.; IKEDA, H. Geormin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. Molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. **The journal of antibiotics**, 59 (8), p 471-479, 2006.

CHAKRABORTY, S.; KHOPADE, A.; KOKARE, C.; MAHADIK, K.; CHOPADE, B. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. **Jornal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 17-23, 2009.

CHAKRABORTY, R.; CHANDRA, A.L. Purification and characterization of a Streptomycete collagenase. **Journal of applied bacteriology**, v. 61, p. 331-337, 1986.

CHENG, H.; SUN, G.; GUAN, Z. Experimental study clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars. **Zhonghua zheng xing wai ke zhi**, v.15, n. 3, p. 202-205, 1999.

CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process biochemistry**, v. 40, p. 3514-3518, 2005.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**, Editora EPUB, Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ. 2008.

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.

DEVI, M.K.; BANU, A.R.; GNANAPRABHAL, G.R.; PRADEEP, B.V.; PALANISWAMY, M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **India journal of science and technology**, v.1, n.7, p.1-6, 2008.

DOMOGATSKY, S. Highly selective proteolytic enzymes preparation for debridement of necrotic tissue from bum wounds. Disponível em: <<http://www.crd.org/Eventos/bio2003-proteolityc-enzymes>>. Acesso: 12/07/2006.

DRAETTA, I.S.; GIACOMELLI, E.J. Ocorrência da bromelina em cultivares de abacaxizeiro. **Colet. ITAL**, v. 23, n.1, p. 44-55, 1993.

DUARTE, A.S.; PEREIRA, A.O.; CABRITA, A.M.S.; MOIR, A.J.G.; PIRES, E.M.V.; BARROS, M.M.T. The characterisation of the collagenolytic activity of cardosin a demonstrates its potential application for extracelullar matrix degradative processes. **Current drug discovery technologies**, v. 2, p. 37-44, 2005.

ENDO, A.; MURAKAWA, S.; SHIMIZU, H.; SHIRAISHI, Y. Purfication and Properties of Collegenase from a *Streptomyces* Species. **The J of Biochem**, v.102, p.163-170, 1987.

ENGEL, S.; BARAK, Z.; CHIPMAN, D.M.; MERCHUK, J.C. Purification of acetohydroxy acid synthase by separation in an aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v.743, p. 281-286, 2000.

ELIAS, M.J.; ARCURI, I.F.; TAMBOURGI, E.B. Condições de pH e temperatura para máxima atividade da bromelina do abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill). **Acta Scientiarum technology**, v.23, n. 2, p. 191-196, 2011.

ELIBOL, M.; MOREIRA, A.R. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. **Process biochemistry**, v. 40, p. 1951-1956, 2005.

ESMANHOTO, E. **Purificação de rentamicina através de extração em sistemas de duas fases aquosas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 80f, 2002.

FARRUGIA, B.; NERLI, B.; PICÓ, G. Study of serum albumin-polyethyleneglycol interaction to predict the protein partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal chromatography B**, v. 798, p. 25-33, 2003.

FERREIRA, J.F.; PADILHA, G.S.; TAMBOURGI, E.B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009.

FORCINITI, D.; HALL, C.K. Influence of polymer molecular weight temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v.61, p. 243-262, 1991.

FORCINITI, D. **Aqueous two-phase systems: Methods and Protocols**. In: KAUL, R.H. Methods in Biotechnology, Human Press Inc, Totowa, NJ, v. 11. 2002.

FRANÇA-SANTOS, A.; ALVES, R.S.; LEITE, N.S.; FERNANDES, R.P.M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia plena**, v.5, n.11, p.1-6, 2009.

GAUTAM, S; SIMON, L. Partitioning of β -glucosidade from *Tricoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: influence of pH and temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v.30, p. 104-108, 2006.

GAVASANE, M.R.; GAIKAR, V.G. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillium acylase* from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and microbial technology**, v. 32, p. 665-675, 2003.

GERBER, N.N.; LECHEVALIER, H.A. Geosmin, an Earthy-Smelling Substance Isolated from Actinomycetes. **Applied Microbiology**, v.13, n.6, 1965.

GONZÁLEZ, I.; SACIDO, A.A.; ANDERSON, A.; GENILOUD, O. Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p 401-415, 2005.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

GRAB, D.J.; KENNEDY, R.; PHILIPP, M.T. *Borrelia burgdorferi* possesses a collagenolytic activity. **FEMS Microbiology letters**, v. 144, p. 39-45, 1996.

GROOS, E. B. In Cornea: **Fundamentals of Cornea and External Disease**; Krachmer, J. H.; Mannis, M. J.; Holland, E. J., Eds.; Morby-Year Book, St Louis, v. 6, 1997, p. 105-142.

GU, T. Liquid-liquid partitioning methods for bioseparations, **Separation science and technology**, v.2, p. 329-364, 2000.

HADDAR, A.; ZOUARI, N.F.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M.; KAMOUN, S. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **Journal of bioscience and bioengineering**, v.110, n. 3, p. 288-294, 2010.

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

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

HARRIS, J.M. **Poly (ethylrnr glycol) Chemistry**: Biochemical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992.

HARRISON, R.L.; BONNING, B.C. Proteases as insecticidal agents. **Toxins**, v. 2, p. 935-953, 2010.

HOULE, M.A.; GRENIER, D.; PLAMONDON, P.; NAKAYAMA, K. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. **FEMS Microbiology letters**, v. 221, p. 181-185, 2003.

HOYAMA, E.; SCHELLINI, S.A.; PELLIZON, C.; MARQUES, M.E.A.; PADOVANI, C.R.; ROSSA, R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelarar porcino com e sem cobertura impermeável. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, n.4, 2005.

HUDDLESTON, J.G.; OTTOMAR, K.W.; NGONYANI, D.M.; LYDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. **Enzyme and microbial technology**, v.13, p. 24-32, 1991.

IMELIO, A.; MARINI, A.; SPELZINI, D.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Moléculas mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio. **Journal of chromatography B**, v. 873, p. 133-138, 2008.

IUBMB. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology., <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, Acesso em 06 de abril de 2011.

IVANKO, O.V.; VARBANETS', L.D.; VALAHUROVA, O.V. Collagenase actitivity of *Streptomyces* sp. 1349. **Microbiol Z**, v. 64, n.6, p. 21-7, 2002.

JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. **Affinity partitioning**. In: Street, G, Highly selective separations in biotechnology, 1. edição, Blackie academic e professional. 1994. p. 55-83.

JOO, H.S.; KUMAR, C.G.; PARK, G.C.; PAIK, S.R.; CHANG, C.S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and properties. **Journal of applied microbiology**, v. 95, p. 267-272, 2003.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process biochemistry**, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

JOSHI, G.K.; KUMAR, S.; SHARMA, V. Production of moderately halotolerant, SDS stable alkaline protease from *Bacillus cereus* MTCC 6840 isolated from lake nainital, Uttaranchal state. **Brazilian journal of microbiology**, v. 38, p. 773-779, 2007.

JUAREZ, Z.E.; STINSON, M.W. An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. **Infection and immunity**, v.67, n. 1, p. 271-278, 1999.

JUNG, W.; WINTER, H. Considerations for the use of clotridial collagenase in practice from clinical drug investigation. **Clinical Drug Investigation**, v.15, n.3, p. 245-252, 1998.

JUNQUEIRA. L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, editora guanabara Koogan, 11 edição, Rio de Janeiro, cap 5, tecido conjuntivo. 2008. p. 103, 104.

KALAIARASI, K.; SUNITHA, P.U. Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolates from meat waste contaminates soil. **African journal of biotechnology**, v.8, n. 24, p. 7035-7041, 2009.

KANG, S.I.; JANG, Y.B.; CHOI, Y.J.; KONG, J.Y. Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 10, p. 593-598, 2005.

KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, p. 338-347, 2008.

KIM, M.; HAMILTON, S.E.; GUDDAT, L.W.; OVERALL, C.M. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. **Biochimica et biophysica**, v. 1770, p. 1627-1635, 2007.

KIRINCIC, S.; KLOFUTAR, C. Viscosity of aqueous solutions of poly(ethylene glycol) at 299.15K. **Fluid phase equilibria**, v.155, p. 311-325, 1999.

KREPEL, C.J.; GOHR, C.M.; WALKER, A.P.; FARMER, S.G.; EDMISTON, C.E. Enzymatically active *Peptostreptococcus magnus*: association with site of infection. **Jornal of clinical microbiology**, v. 30, n.9, p. 2330-2334, 1992.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases. **Biotechnology Advances**, v.17, n.7, p. 561-594, 1999.

KUSCU, N.K.; KOYUNCU, F.; LACIN, S. Collagenase treatment of sore nipples. **International jornal of gynecology e obstetrics**, v. 76, p. 81-82, 2002.

LI, J.; KAO, W.J. Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated-Peptide Biopolymer Conjugates. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1055-1067, 2003.

LIMA, C.A.; RODRIGUES, P.M.B.; PORTO, T.S.; VIANA, D.A.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; CUNHA, M.G.C. Production a collagenase from *Cândida albicans* URM3622. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 3, p. 315-320, 2008.

LUECHAU, F.; LING, T.C.; LYDDIATT, A. Selective partition of plasmid DNA and RNA in aqueous two-phase systems by the addition of neutral salt. **Separation and purification technology**, v.68, p114-118, 2009.

MANDL, L. Collagenases and elastinases. **Advances in enzymology**, v. 23, p. 163-264, 1961.

MARTÍN, M.C.; MANTECA, A.; CASTILLO, M.L.; VÁZQUEZ, F.; MÉNDEZ, F.J. *Streptomyces albus* isolated from a human actinomycetoma and characterized by molecular techniques. **Journal of microbiology**, v. 42, n.12, p. 5957-5960, 2004.

MATSUSHITA, O.; YOSHIHARA, K.; SEI-ICHI, K.; MINAMI, J.; OKABE, A. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-Kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. **Journal of bacteriology**, v. 176, n.1, p. 149-156, 1994.

MEZHUMYAN, L.G.; KASYMOVA, T.D.; YULDASHEV, P.Kh. Proteinases from *carica papaya* latex. **Chemistry of natural compounds**, v. 39, n.3, p. 171-175, 2003.

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiol**, v. 292, p. 405-419, 2001.

MONTEIRO FILHO, E.S. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência e tecnologia**, v.1, n.1, p. 33-41, 2010.

MONTI, R.; BASILIO, C.A.; TREVISAN, H.C.; CONTIERO, J. Purification of papain from fresh látex of *Carica papaya*. **Brazilia archives of biology and technology**, v.43, n.5, p. 501-507, 2000.

MOREIRA, K.A.; CAVALCANTI, M.T.H.; DUARTE, H.S.; TAMBOURGI, E.B.; MELO, E.H.M.; SILVA, V.L.; PORTO, A.L.F.; FILHO, J.L.L. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian journal of microbiology**, v. 32, p. 215-220, 2001.

MURUGESAN, T.; PERUMALSAMY, M. Liquid-liquid equilibria of poly(ethylene glycol) 2000+sodium citrate+water at (25,30,35,40 and 45) °C. **Journal chemical engineering data**, v. 50, p. 1392-1395, 2005.

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

NAKAYAMA, T.; TSURUOKA, N.; AKAI, M.; NISHINO, T. Thermostable Collagenolytic Activity of a Novel Thermophilic Isolate, *Bacillus* sp. Strain NTAP-1. **Journal. of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 612-614, 2000.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M.L.L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian journal of microbiology**, v. 35, p.91-96, 2004.

NASCIMENTO, K.S.; ROSA, P.A.J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and purification technology**, v. 75, p. 48-54, 2010.

NELSON, D.L.; COX.M.M, **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4ª edição, Nova Iorque: W.H Freeman, 2004.

NITSAWANG, S.; KAUL, R.H.; KANASAWUD, P. Purification of papaina from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, p. 1103-1107, 2006.

OKAMOTO, M.; YONEJIMA, Y.; TSUJIMOTO, Y.; SUZUKI, Y.; WATANABE, K. A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. Strain MO-1. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, p. 103-108, 2001.

PADILHA, G.S.; FERREIRA, J.F.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. **Acta scientiarum technology**, v.33, n.1, p. 1-4, 2011.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Editora Manole, São Paulo, Brasil. 2005. p. 176 – 279.

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

PETROVA, D.H.; SHISHKOV, S.A.; VLAHOV, S.S. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp, 21E: purification and some properties. **Journal of basic microbiology**, v. 46, n. 4, p. 275-285, 2006.

POLITZER, K.; BON, E.P.S. Enzimas industriais e especiais, Centro de gestão e estudos estratégicos-CGEE. **Ciência e tecnologia**, Rio de Janeiro, 2006.

PORTO, T.S. **Extração da pró-toxina Épsilon e de uma protease a partir de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/ citrato** (Dissertação de mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, pós graduação em tecnologia bioquímico-farmacêutica, USP, São Paulo, 87f, 2004.

PORTO, T.S.; MEDEIROS G..M.S.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B. NETO.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR, A. 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, C.S.; PORTO, T.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical engineering journal**, v. 53, p. 165-171, 2011.

RABELO, A.P.B.; TAMBOURGI, E.B.; PESSOA-JR, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous sustems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of chromatography B**, v. 807, p. 61-68, 2004.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p. 597-635, 1998.

RAVANTI, L.; KAHARI, V.M. Matrix metalloproteinases in wound repair. **International Journal of Molecular Medicine**, v 6, n 4, p 391-407, 2000.

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

RIPPON, J.W.; PECK, G.L. Experimental infection with *Streptomyces madurae* as a function of collagenase. **The jounal of investigative dermatology**, v. 49, n.4, 1967.

RITO-PALOMARES, M. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products: *Review*. **Journal of Chromatography B**, v. 807, p. 3–11, 2004.

RODRIGUES, A.M.; SANT'ANNA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n.1, p. 57-62, 2001.

SAKURAI, Y.; INOUE, H.; NISHII, W.; TAKAHASHI, T.; IINO, Y.; YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, K. Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, p.21-28, 2009.

SANTAELLA, S.T.; JÚNIOR, F.C.G.S.; GADELHA, D.A.C.; COSTA, K.O.; AGUIAR, R.; ARTHAUD, I.D.B.; LEITÃO, R.C. Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. **Engenharia sanitária e ambiental**, v.14, n.1, p. 139-148, 2009.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M.J.; CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 117-120, 1994.

SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas/UNICAMP, 174 f, 2000.

SCHMIDT, A.S.; VENTON, A.M.; ANSEJO, J.A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme and microbial technology**, v.16, p. 131-142, 1994.

SCHREMPF, H. Investigations of Streptomycetes using tools of recombinant DNA technology In: DEMAINE, A.L.; DAVIES, J.E. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, 2 edição, Washington: ASM Press, p. 501-510, 1999.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em:
http://www.sciencephoto.com/images/download_lo_res.html?id=662400037, Acesso em 06
 de abril de 2011.

SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T. Protease inhibitors: synthesis of *Clostridium histolyticum* collagenase inhibitors incorporating Sulfonyl-L-alanine Hydroxamate moities. **Bioorganic e medicinal chemistry letters**, v. 10, p. 499-502, 2000.

SEONG, C.N.; JO, J.S.; CHOI, S.K.; KIM, S.W.; KIM, S.J.; LEE, O.H.; HAN, J.M.; YOO, J.C. Production, purification, and characterization of a novel thermostable serine protease from soil isolate, *Streptomyces tendae*. **Biotechnology letters**, v. 26, p. 907-909, 2004.

SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI, D.Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid phase equilibria**, v. 219, p. 195-203, 2004.

SILVA, S.V. **Mineralização biomédica in vivo de matrizes de colágeno aniônico: modelo de biomineralização**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 115f, 2005.

SILVA, C.S. **Purificação do ácido clavulâmico por processo de filtração tangencial, extração por sistema de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica** (Tese de doutorado em engenharia química) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências exatas e tecnológicas, São Paulo, 2010.

SINGH, A.K.; CHHATPAR, H.S. Optimization of protease production by *Streptomyces* sp. A6 using statistical approach for reclamation of shellfish waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1631-1639, 2010.

SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly (ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 2, p. 305-312, 2006

SOARES, P.A.G.; NASCIMENTO, C.O.; PORTO, T.S.; CORREIA, M.T.S.; PORTO, A.L.F.; CUNHA, M.G.C. Purification of a lectin from *Canavalia ensiformis* using PEG-citrate aqueous two-phase system. **Journal of chromatography B**, v. 879, p. 457-460, 2011.

SODERHALL, C.; MARENHOLZ, I.; KERSCHER, T.; RUSHENODORF, F.; ESPARZA-GORDILLO, J.; WORM, M.; GRUBER, C.; MAYR, G.; ALBRECHT, M.; ROHDE, K.; SCHULZ, H.; WAHN, U.; HUBNER, N.; LEE, Y.A. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. **Plos biology**, v.5, p 1952-1961, 2007.

SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J. Conditions influencing the synthesis of acid protease by *Mucor pusillus* lindt. **Applied microbiology**, v. 15, n.6, p. 1309-1312, 1967.

SUKHOSYROVA, E.A.; NIKITINA, Z.K.; YAKOVLEVA, M.B.; VESHCHIKOVA, E.V.; BYKOV, V.A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Immunology and microbiology**, v.135, n.5, p. 526-530, 2003.

TAMAI, E.; MIYATA, S.; TANAKA, H.; NARIYA, H.; SUZUKI, M.; MATSUCHITA, O.; HATANI, N.; OKABE, A. High-level expression of his-tagged clostridial collagenase in *Clostridium perfringens*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 80, p. 627-635, 2008.

TOYOSHIMA, T.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; NISHI, N.; OKABE, A.; ITALO, T. Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagen exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo. **Connect tissue**, v. 42, p. 281-290, 2001.

TRAN, L.H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of Home Economics of Japan**, v.12, p. 1083-1187, 2002.

TRINDADE, I.P.; DIOGO, M. M.; PRAZERES, D.M.F.; MARCOS, J.C. Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1082 p.176-184, 2005.

TSURUOKA, N.; NAKAYAMA, T.; ASHIDA, M.; HEMMI, H.; NAKAO, M.; MINAKATA, H.; OYAMA, H.; ODA, K.; NISHINO, T. Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from Alicyclobacillus sendaiensis Strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.1, p. 162-169, 2003.

TSUZUKI, C.O.; MAYES, M.P.A. Collagenase production and hemolytic activity related to 16S rRNA variability among *Parvimonas micra* oral isolates. **Anaerobe**, v. 16, p. 38-42, 2010.

TUBIO, G.; NERLY, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of chromatography B**, v 779, p. 293-301, 2004.

TUBIO, G.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Extraction of tripsin from bovine pâncreas by applying polyethyleneglicol/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography B**, v. 877, p. 115-120, 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.

VAN WART, H.E.; STEINBRINK, D.E. A continuos spectrophoto-metris assay for *Clostridium histolticum* collagenase. **Analytical biochemistry**, v. 113, p. 356-365, 1981.

VASCONCELOS, M.P.; ARAÚJO, K.G.L.; VERRUMA-BERNARDI, M.R. Efeito do pH de coagulação do leite e do tipo coalho sobre o rendimento de massa na produção. **Revista Brasileira de agrociência**, v.10, n.4, p. 499-502, 2004.

VISHALAKSHI, N.; LINGAPPA, K.; AMENA, S.; PRABHAKAR, M.; DAYANAND, A. Production of alkaline protease from *Streptomyces gulbargensis* and its application in removal of blood stains. **India journal of biotechnology**, v.8, p. 208-285, 2009.

VISHWANATHA, K.S.; RAO, A.G.A.; SINGH, S.A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 129-138, 2010.

WALTER, H.; BROOKS, D.E.; FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology. **Orlando: Academic Press**, p. 85-130, 1985.

WANG, Q.; HOU, Y.; XU, Z.; MIAO, J.; LI, G. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 99, p. 1926-1931, 2008.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, p. 520-526, 2004.

WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 4, editora: Williams & Wilkins, 2001.

WU, QI.; LI, C.; LI, C.; CHEN. H.; SHULIANG, L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 129-139, 2010.

YOSHIHARA, K.; MATSUSHITA, O.; MINAMI, J.; OKABE, A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histoliticum* encoding a collagenase and a gelatinase. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 21, p. 6489-6496, 1994.

XU, Y.; SOUZA, M.A.; PONTES, M.Z.R.; VITOLO, M.; PESSOA JR, A. Liquid-liquid extraction of enzymes by affinity aqueous two-phase systems. **Brazilian archives of biology and technology**, v.46, n. 4, p741-750, 2003.

ZASLAVSKY, B. Y. Aqueous two-phase partitioning. **Physical, Chemistry and Bioanalytical Applications**, 1. ed, New York: Marcel Dekker Inc.: New York, 1995, p. 696.

ZAVARZINA, A.G.; DEMIN, V.V.; NIFANT'EVA, T.I.; SHKINEV, V.M.; DANILOVA, T.V.; SPIVAKOV, B.Y. Extraction of humic acids and their fractions in poly(ethylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 452, p. 95-103, 2002.

ZERDANI, M.I.; FAID, M.; MALKI, A. Digestion of solid tannery wastes by strains of *Bacillus* sp isolated from compost in Morocco. **International journal of agriculture e biology**, v.6, n. 5, p. 758-761, 2004.

ZHI-QI, Q.; XIANG, C.L.; MING, T.H.; NING, Z.S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* sp. S5 with herbicidal activity from tomato roots. **China agricultural university**, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2006.

ZUNIGA, A.D.G.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Dispersed phase hold-up in a graesser raining bucket contactor using aqueous two-phase systems. **Journal of food engineering**, v. 72, p. 302-309, 2006.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR *STREPTOMYCES* spp.

Este capítulo refere-se à seleção de uma cepa de *Streptomyces* sp., proveniente de líquens e pertencente ao Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como melhor produtora de collagenases, a determinação do melhor tempo de produção de collagenase pela cepa selecionada utilizando as variáveis da etapa de seleção e também a seleção das variáveis que influenciam na melhor produção de collagenases pela cepa selecionada. Estes resultados estão sendo analisados para a publicação na revista Applied Biochemistry and Biotechnology.



Fator de impacto: 1.42

PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR *STREPTOMYCES* spp.

M. C. S. Barros¹ · C. A. Lima¹ · G. M. Silva¹ · J. L. Lima-Filho¹ ·

M. F. S. Teixeira² · T. S. Porto³ · A. L. F. Porto^{1,4}

1.Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. Email: mcarinesb@hotmail.com

2.Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Dept. de Parasitologia, Laboratório de Micologia, Av. Gen. Otávio Jordão Ramos, n. 3000, Coroado I, Minicampus Universitário-Aleixo. CEP 69077-000, Manaus, Brasil.

3.Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus do Agreste, Unidade Acadêmica de Garanhuns. Av. Bom Pastor S/N Boa Vista 55296-901 - Garanhuns, PE – Brasil, Fone: (81) 3320-6345. Email: portots@yahoo.com.br

4.Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil. Email: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO No presente trabalho foi realizado a seleção de produtores de collagenases entre quarenta e cinco cepas de *Streptomyces* spp. A partir da cepa selecionada foi realizada a curva de produção para a determinação do melhor tempo de produção e em seguida um planejamento experimental completo 2⁴ para a determinação da influência das variáveis temperatura, pH, concentração de substrato e agitação orbital, na produção de collagenase. Os resultados demonstraram que mais de 97% das cepas testadas foram capazes de degradar a gelatina e de utilizar o azocol como substrato e o *Streptomyces* sp. DPUA 1559 foi selecionado como o melhor produtor da collagenase. A máxima atividade enzimática ocorreu após 72h de crescimento, com um valor de atividade collagenolítica de 21,13 U/ml. Todas as variáveis avaliadas no planejamento fatorial exerceram efeito estatisticamente significativo sobre a produção da collagenase, onde para a temperatura e agitação o efeito foi negativo enquanto que a concentração do substrato e pH o efeito positivo. O maior valor da atividade collagenolítica (39,13 U/ml) foi obtido nas condições onde a agitação foi de 100 rpm, pH 6,0 e

1,5% de substrato à 28°C em 72h de cultivo. Os resultados demonstraram o potencial collagenolítico do *Streptomyces* sp. DPUA1559.

Palavras-chave: *Streptomyces*, collagenase, proteases, atividade enzimática, planejamento

INTRODUÇÃO

As proteases são o grupo mais importante de enzimas produzidas comercialmente (1). No mercado mundial ocupam 60% das enzimas industriais (2) e fazendo parte das proteases estão as collagenases, que são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas nas regiões de tripla hélice do colágeno (3).

As collagenases, apesar de serem obtidas de diversas fontes como animal e vegetal, são as de origem microbiana que apresentam maior interesse industrial, pois, além da capacidade de hidrolisar todos os tipos de colágenos, também apresentam afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (4, 5 e 6).

Muitos micro-organismos têm sido relatados por secretarem collagenases, entre eles fungos como *Aspergillus flavus* (7), *Candida albicans* (8), *Rhizoctonia solani* (6) e bactérias como *Bacillus* sp. NTAP-1 (9), *Clostridium perfringens* (10), *Bacillus pumilus* Col-J (11), *Vibrio vulnificus* (12) e *Streptomyces madurae* (13).

As espécies de *Streptomyces* têm se tornado micro-organismos de grande interesse industrial, pela capacidade de produzirem uma variedade de enzimas de interesse industrial (14). As collagenases produzidas por estas espécies têm sido muito relatadas: *Streptomyces* sp. 3B (15), *Streptomyces omiyaensis* (16), *Streptomyces parvulus* (17).

A produção de proteases, como collagenases, por micro-organismos é bastante influenciada pelos componentes do meio, principalmente fontes de carbono, nitrogênio, íons

metálicos e também por outros fatores, tais como pH, temperatura, densidade de inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (18).

O estudo dos componentes e das condições de cultivo e produção de enzimas por micro-organismos é de grande importância para a redução dos custos de produção. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos (19), portanto, o desenvolvimento de processos para aumentar o rendimento de produção de proteases e que também sejam de baixo custo é de grande interesse do ponto de vista comercial (20).

Este trabalho teve como objetivo selecionar o melhor produtor de collagenase entre as cepas de *Streptomyces* spp. da região amazônica, determinar o melhor tempo de produção da enzima pelo micro-organismo selecionado, e determinar as variáveis que influenciam o processo de produção da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos e Meio de Manutenção

Foram utilizadas 45 cepas de *Streptomyces* spp. provenientes de líquens da região Amazônica e obtidas da Coleção de culturas do Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As cepas foram conservadas segundo Castellani (21) e o meio de manutenção e esporulação foi o ISP-2 (22), modificado pela retirada da glicose e ajuste do pH para 6,0 durante 7 dias a 30°C.

Seleção de uma cepa de *Streptomyces* spp. produtora de collagenase

Para a seleção da cepa de *Streptomyces* sp. com potencial collagenolítico, foi feito um pré-inóculo, onde as cepas foram cultivadas por 48h, 28°C, 200 rpm em meio líquido ISP-2 (22) modificado pela retirada da glicose, sendo o meio constituído, para um volume final de 50 ml de: extrato de levedura (0,4% p/v), extrato de malte (1,0% p/v) e pH= 6,0. Após as 48 horas, 10^6 esporos/ml foram inoculados em 50 ml de meio de produção descrito por Nickerson e Mohan (23), constituído por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l); K_2HPO_4 (1,5 g/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g/l); CaCl_2 (0,025 g/l) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), suplementado com 1% (p/v) de gelatina e pH 6,0. A produção foi realizada durante 96 horas à temperatura de 28°C sob agitação de 200 rpm. Após este período, a cultura foi centrifugada à 1.100 xg por 15 min, filtrada e o extrato bruto foi utilizado para as análises posteriores.

Alíquotas de 100 µl dos extratos brutos foram adicionadas em poços de 10,6 mm de diâmetro em placas de Petri com 10 ml de um meio contendo ágar (1,5% p/v) e gelatina (1% p/v), para a detecção da atividade gelatinolítica (24). Cada placa foi incubada por 18h, a 37°C. A capacidade de hidrolisar gelatina foi demonstrada pela formação de halos transparentes sobre a superfície do ágar, revelados com solução contendo cloreto de mercúrio segundo Lacaz (25) constituído de: 12 g de cloreto de mercúrio, 16µl de ácido clorídrico concentrado para um volume final de 100 ml de água, e expressos em milímetros. Em seguida, os extratos brutos também foram submetidos à determinação collagenolítica utilizando o azocol como substrato.

Determinação da atividade collagenolítica

A determinação da atividade collagenolítica foi realizada usando o método desenvolvido por Chavira et al. (26) modificado, onde o azocolágeno (*Azocoll*[®], Sigma, St.

Louis MO, USA) foi suspenso em solução tampão Tris-HCl (0,1 M pH 7,2), para a concentração final de 5 mg/ml. Posteriormente, 150µl do extrato bruto e 150µl do tampão Tris- HCl (0,1M, 1 mM pH 7,2), foram misturados com 270µl da solução do *Azocoll*[®] e mantidos em banho-maria por 18h à 37°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas à 10.000 xg por 15 min à 4°C. A absorbância da solução sobrenadante foi medida em 520 nm usando um espectrofotômetro (Micronal B582). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima por ml que produz um aumento na densidade ótica de 0,1 em 18h a 520 nm.

Curva de crescimento e produção da collagenase pela cepa selecionada de *Streptomyces* sp.

A produção da enzima foi realizada em Erlenmeyer com capacidade de 250 ml contendo 50 ml do meio de produção descrito por Nickerson; Mohan (23), onde a cepa selecionada como melhor produtora de collagenase foi incubada durante 96 h à temperatura de 28 °C sob agitação de 200 rpm e pH 6,0. Em intervalos de 12 horas retirava-se um Erlenmeyer para determinação da biomassa, atividade collagenolítica e pH.

Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi realizada segundo El-Refai et al, (27), onde o meio fermentado pela cepa de *Streptomyces* sp. selecionada foi filtrado em membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade com peso previamente conhecido e mantido em estufa à 70°C até atingir peso constante. A biomassa foi expressa em g/l.

Seleção da melhor condição para a produção de collagenase pela cepa selecionada de *Streptomyces* sp.

Os efeitos da concentração do substrato (gelatina), como única fonte de carbono e nitrogênio, pH, agitação e temperatura foram avaliados para a produção de collagenase pela cepa de *Streptomyces* sp. selecionada, usando um planejamento experimental completo 2⁴. O experimento foi constituído de 20 ensaios com quatro repetições no ponto central.

A produção foi realizada utilizando Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura descrito por Nickerson; Mohan (23), contendo uma concentração de 10⁶ esporos/ml. Para os ensaios, os meios foram suplementados com diferentes concentrações do substrato (gelatina), ajustados em diferentes valores de pH e foram incubados em diferentes valores de temperatura e agitação orbital. Após 72h o meio fermentado foi utilizado para a obtenção do extrato bruto e biomassa. Os resultados de atividade collagenolítica com Azocol e biomassa foram analisados com o programa Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc. , 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção do melhor produtor de collagenase

Dentre as cepas testadas (Tabela 1), mais de 97% apresentaram capacidade em degradar gelatina e utilizar o azocoll como substrato. A cepa *Streptomyces* sp. 1559 apresentou os maiores valores de atividade collagenolítica qualitativa e quantitativa, apresentando um halo de degradação da gelatina de 17,3 mm, e atividade collagenolítica de 29,29 U/ml. Portanto, essa cepa foi selecionada para os experimentos posteriores.

Estudos têm demonstrado a presença de enzimas no extrato enzimático de micro-organismos do gênero *Streptomyces* com capacidade de degradar gelatina e utilizar azocol

como substrato. Uesugi et al. (16) identificaram a presença de enzimas, na cultura de *Streptomyces omiyaensis* capazes de degradar gelatina extraída de pele de porco com atividade gelatinolítica. Sakurai et al. (17) obtiveram no extrato enzimático de *Streptomyces parvulus* collagenase capazes de degradar o azocol.

Como pode ser observado na Tabela 1, a cepa de *Streptomyces* DPUA 1611 não foi capaz de produzir collagenase, mesmo tendo se desenvolvido no meio ISP-2 durante o preparo do pré-inóculo. Os *Streptomyces* apresentam uma grande diversidade genética e metabólica (14). As cepas de *Streptomyces* podem apresentar comportamentos diferentes quanto à produção de metabólitos como aconteceu com a cepa DPUA 1611.

Tabela 1. Atividade colagenolítica qualitativa e quantitativa de cepas de *Streptomyces* spp isolados de líquens do estado do Amazonas.

Cepas	Atividade (U/ml)	Halo (mm)	Cepas	Atividade (U/ml)	Halo (mm)
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1543	12,178	11,80	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1582	3,222	7,90
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1545	3,511	4,40	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1583	1,689	12,70
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1547	6,444	15,70	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1584	3,400	9,30
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA1549	7,111	6,95	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1586	0,844	8,20
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1550	4,533	7,30	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1587	1,200	8,40
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA1553	5,333	9,20	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1588	3,022	7,40
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1554	13,911	9,05	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1589	12,002	11,4
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1557	23,111	9,60	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1591	3,467	6,30
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559	29,289	17,30	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1592	4,511	9,30
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1560	16,267	8,30	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1595	13,778	9,10
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1561	20,489	7,95	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1597	2,222	6,00
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1563	9,822	9,40	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1598	2,244	7,30
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1565	6,289	8,40	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1599	1,711	8,10
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1567	3,378	12,7	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1600	21,20	15,95
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1568	8,400	11,00	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1602	2,178	6,45
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1570	1,867	9,95	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1603	1,711	9,70
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1572	3,578	17,25	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1605	2,267	7,85
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1573	3,467	5,90	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1606	3,044	10,2
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1576	28,289	10,80	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1608	1,578	8,20
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1578	2,133	8,70	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1609	1,022	8,95
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1579	3,222	12,30	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1610	1,222	8,20
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1580	2,911	4,70	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1611	0,00	0,00
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1581	2,756	9,20			

Curva de pH, biomassa e de produção da collagenase por *Streptomyces* sp. DPUA 1559

Os valores de pH variaram de 6 à 9 ao longo das 96h (Figura 1). Esta variação pode ter ocorrido porque os produtos do metabolismo microbiano, inevitavelmente, levam a uma mudança no equilíbrio de íons hidrogênio e, portanto, do meio de cultura (28). A degradação de proteínas por proteases levam, principalmente a liberação de aminoácidos e outros compostos como os derivados do NH_3 em meio aquoso, aumentando progressivamente o pH (29-30).

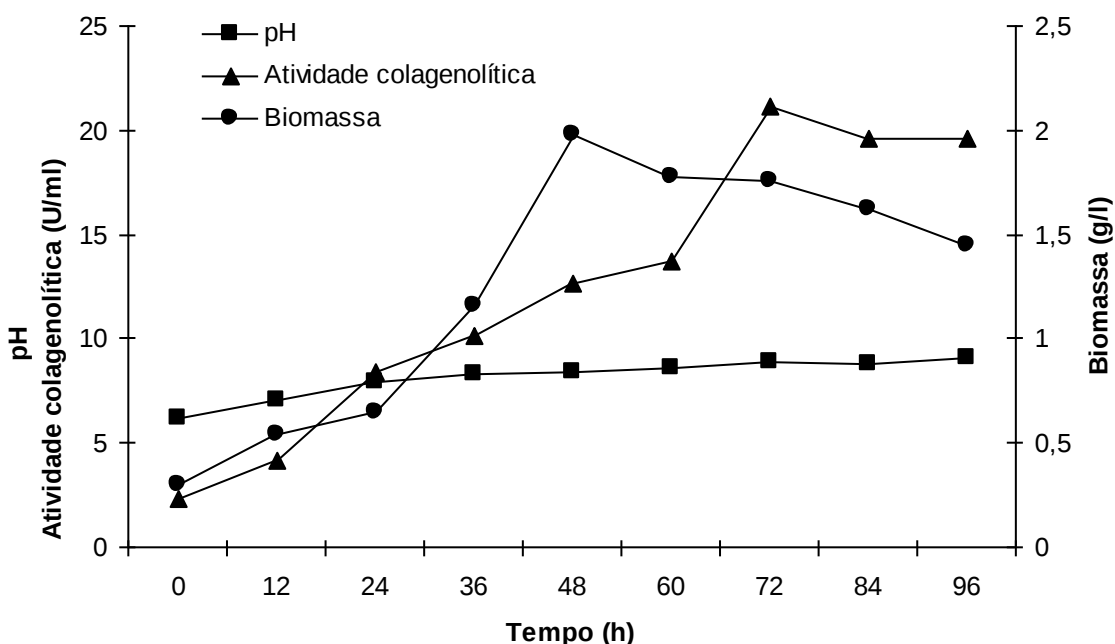


Figura 1. Curvas de pH, biomassa e atividade collagenolítica obtida do cultivo de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 em pH=6, 200 rpm, 1% gelatina, 28°C em 96h.

A produção máxima de collagenase ocorreu em pH= 8,8 e foi observado que a medida que o pH do meio foi crescendo também foi aumentando a atividade da enzima de interesse. Pode-se concluir que a melhor produção de collagenase por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 ocorreu na faixa alcalina de pH.

O crescimento exponencial do micro-organismo ocorreu por um período de tempo de 48h a partir desse tempo o crescimento foi reduzido e a cultura entrou em fase estacionária, durando 30h, como demonstrado na Figura 1.

Neste estudo, a produção da collagenase máxima ocorreu após 72h de incubação, quando as células já haviam entrado na fase estacionária, apresentando uma atividade collagenolítica de 21,13 U/ml. Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados obtidos por Azeredo et al. (31) os quais observaram a máxima produção de proteases por *Streptomyces* sp em 120h; Gibb e Strohl. (32), observaram que a produção máxima de proteases por *Streptomyces peucetius* após 100 horas; Moreira et al. (33) em estudos com *Streptomyces clavuligerus* obtiveram maior produção após 50h, em todos estes estudos a melhor produção de proteases também ocorreram na fase estacionária.

Segundo Gupta et al. (34) as proteases geralmente são sintetizadas durante a fase estacionária sendo regulada pela limitação de nutrientes no meio de cultivo, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio. Os mecanismos pelos quais o controle da produção de protease é alcançada em muitos sistemas procariontes ainda são desconhecidos (35).

Planejamento experimental para a produção de collagenase por *Streptomyces* sp. DPUA1559

A avaliação dos efeitos das variáveis que levam a uma maior produção de collagenases é de grande interesse, nesse contexto foi elaborado um planejamento experimental completo 2^4 , para testar o efeito de quatro variáveis descritas como importantes para a produção de proteases, de acordo com a literatura: pH, temperatura, concentração de substrato e agitação orbital.

Os resultados dos ensaios da produção de collagenases realizados foram analisados estatisticamente e estão representados na Tabela 2, sendo a biomassa e a atividade

colagenolítica as variáveis respostas mais importantes, por isso foram utilizadas para a análise da eficiente produção das enzimas por *Streptomyces* DPUA 1559.

Tabela 2- Planejamento 2⁴ para produção de collagenases por *Streptomyces* sp. DPUA 1559.

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	Concentração do Substrato gelatina (%)	pH	Biomassa (g/l)	Atividade colagenolítica (U/ml)
1	100	28	0,5	6,0	0,658	23,90
2	200	28	0,5	6,0	1,434	24,91
3	100	36	0,5	6,0	0,544	7,27
4	200	36	0,5	6,0	0,218	4,67
5	100	28	1,5	6,0	3,056	39,13
6	200	28	1,5	6,0	2,128	23,40
7	100	36	1,5	6,0	0,868	10,18
8	200	36	1,5	6,0	2,092	3,49
9	100	28	0,5	8,0	0,562	27,77
10	200	28	0,5	8,0	0,992	27,98
11	100	36	0,5	8,0	0,438	10,80
12	200	36	0,5	8,0	0,390	4,38
13	100	28	1,5	8,0	2,388	27,67
14	200	28	1,5	8,0	1,986	20,57
15	100	36	1,5	8,0	1,356	17,07
16	200	36	1,5	8,0	0,926	14,53
17 (C)	150	32	1,0	7,0	1,072	23,42
18 (C)	150	32	1,0	7,0	0,940	23,42
19 (C)	150	32	1,0	7,0	0,982	21,83
20 (C)	150	32	1,0	7,0	0,848	22,40

As análises são representadas através dos gráficos de Pareto (Figuras 2 e 3), onde estes gráficos representam os efeitos estimados das variáveis, e as interações sobre a biomassa e a atividade colagenolítica em decrescente ordem de grandeza. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado. A linha vertical é usada para avaliar quais efeitos são significativos. As barras que ultrapassam a linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos em um nível de confiança nível de 95% (36).

Na Figura 2 é observado os efeitos significativos das quatro variáveis estudadas, assim como as interações entre as mesmas. As variáveis e as interações foram representadas por siglas e números no eixo vertical.

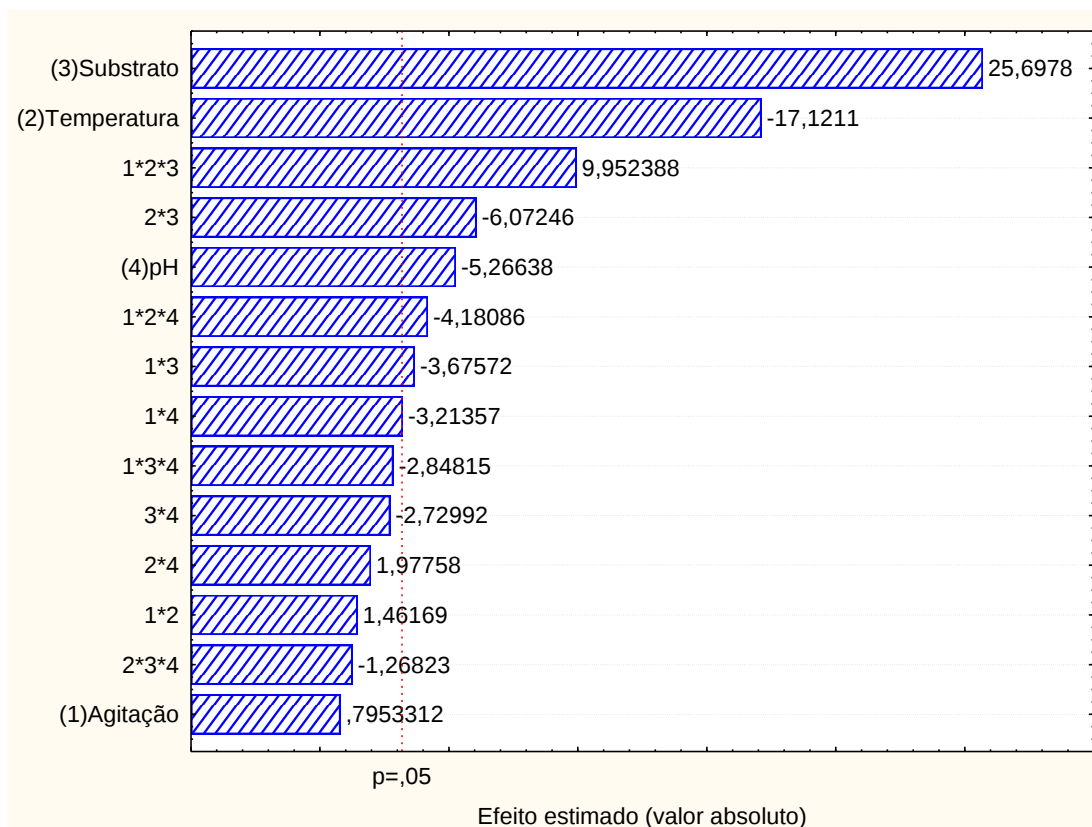


Figura 2. Gráfico de Pareto das variáveis agitação (1), temperatura (2), concentração de substrato (3) e pH (4) sobre o crescimento da biomassa do *Streptomyces* sp. DPUA 1559.

Os efeitos principais concentração de substrato, temperatura e pH foram significativos para a biomassa. A interação entre as variáveis temperatura e concentração de substrato (2*3) apresentou efeito significativo e negativo. Segundo Porto (36), quando uma interação é significativa, indica que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, o seu efeito depende da outra variável. Na interação 2x3 ocorreu um efeito antagônico entre as variáveis, mostrando que para o aumento da biomassa é necessário uma diminuição da temperatura e um aumento da concentração do substrato, ou seja, a condição adequada para a resposta biomassa foi obtida com concentração de substrato 1,5% e temperatura de 28°C.

Com relação à atividade collagenolítica, observa-se na Figura 3 que todas as variáveis tiveram um efeito significativo e entre estas variáveis a temperatura e agitação foram as que apresentaram maior efeito para a produção de collagenases pelo *Streptomyces* sp. DPUA 1559.

Análise de variáveis que interferem na produção de proteases por micro-organismos é de total importância. Por não existir um meio geral de produção, cada micro-organismo tem que ser estudado individualmente para o conhecimento das melhores condições que levem a uma máxima produção de biomoléculas de interesse (34).

Segundo Elibol et al. (28) um dos mais importantes parâmetros nos sistemas de fermentação é o nível de substrato. A produção de protease é dependente da disponibilidade tanto da fonte de carbono como de nitrogênio no meio e ambos os parâmetros exercem efeitos reguladores sobre a síntese de enzimas (37). Neste trabalho foi utilizado três diferentes concentrações de substrato (gelatina), variando de 0,5-1,5%, a maior produção de collagenase e a maior biomassa ocorreram na maior concentração de substrato testada de 1,5%.

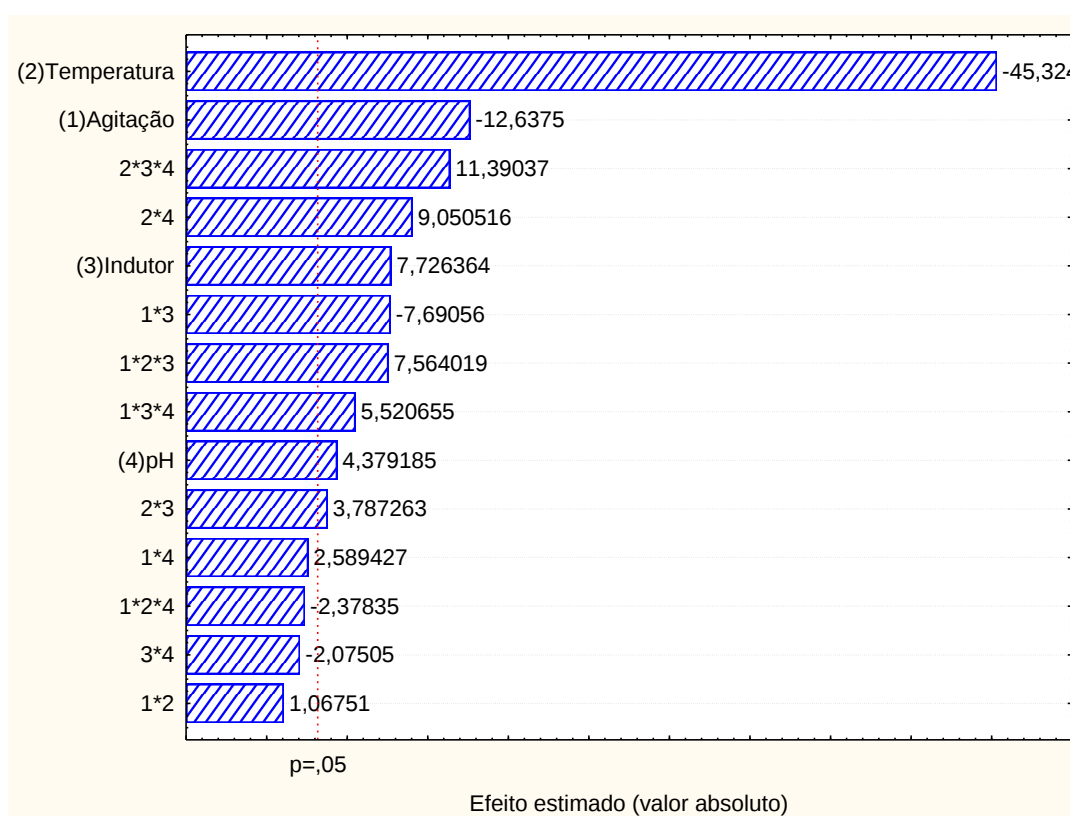


Figura 3. Gráfico de Pareto para as variáveis agitação (1), temperatura (2), concentração de substrato (3) e pH (4) sobre a produção de collagenases por *Streptomyces* sp DPUA 1559.

A temperatura é uma variável muito importante na produção de proteases por micro-organismos (38). Segundo ANANDAN et al. (39) a temperatura tem a propriedade de regularizar a síntese enzimática e também pode levar a modificações na parede celular do micro-organismo, facilitando a secreção da enzima. No presente trabalho, verificou-se que a temperatura teve um efeito negativo tanto na produção de biomassa quanto da collagenase. O rendimento máximo na produção da enzima ocorreu em 28°C que foi o menor dos níveis testados. Possivelmente, a maior produção de proteases em temperatura mais baixa, facilitou a manutenção adequada dos fluxos metabólicos no mais baixo valor de temperatura testado (40) o que levaria a um máximo aproveitamento do substrato compensando a perda da atividade da enzima em temperaturas baixas (38).

Neste estudo foram avaliados três valores de agitação 100, 150 e 200 rpm. Esta variação apresentou influência na produção da collagenase e a maior produção ocorreu no menor valor de agitação 100 rpm. O que pode ser justificado é que as enzimas apresentam sensibilidade às forças mecânicas, o que pode levar a desnaturação e conseqüentemente perda de sua atividade (28). Não houve influência da agitação no aumento da biomassa.

O pH exerceu efeito negativo na biomassa e positivo na produção de collagenase. Segundo Schrempf (41), grande parte dos *Streptomyces* tem crescimento em pH neutro ou medianamente alcalino, porém existem muitos relatos provando o crescimento de algumas cepas de *Streptomyces* em pH ácido (3,5) ou alcalino (pH 8 a 11,5).

O pH é uma variável que influencia em muitos processos enzimáticos e um deles é o transporte através da membrana celular, por isso, o pH inicial tem grande importância no início da produção de biomoléculas (42). Cada micro-organismo, em particular, apresentam um pH inicial adequando para obter uma melhor produção de protease (37 - 43).

A melhor condição obtida para a produção de collagenases neste estudo foi com uma agitação de 100rpm, pH 6,0, 1,5% de gelatina a 28°C. Sob estas condições foi obtido um valor de atividade collagenolitica de 39,13 U/ml.

CONCLUSÃO

Este estudo de produção de collagenase por cepas de *Streptomyces* spp. mostrou o grande potencial desses micro-organismos como produtores de enzima para a aplicação comercial. O uso do planejamento experimental fatorial permitiu não só a identificação das variáveis que influenciam na produção de collagenases como também suas interações visando melhorar a produção de collagenase pelo *Streptomyces* sp DPUA1559.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Abidi, F., Limam, F & Nejib, M.M, (2008). *Process biochemistry*. 43, 1202-1208.
2. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M. S & Deshpande, V.V, (1998). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62, 597-635.
3. Ravanti, V.M & Kahari, (2000). *International. Journal of Molecular Medicine*. 6, 391-407.
4. Jung, W & Winter, H, (1998). *Clinical Drug Investigation*. 15, 245-252.
5. Toyoshima, T., Matsushita, O., Minami, J., Nishi, N., Okabe, A., Italo, T, (2001). *Connect tissue*. 42, 281-290.
6. Handy, H.S, (2008). *Indian jornal of biotechnology*. 7, 333-340.
7. Sukhosyrova, E.A., Nikitina, Z.K., Yakovleva, M.B., Veshchikova, E.V & Bykov, V.A, (2003). *Bulletin of experimental biology and medicine*.135, 526-530.
8. Lima, C.A., Rodrigues, P.M.B., Porto, T.S., Viana, D.A., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F & Cunha, M.G.C, (2008). *Biochemical Engineering Journal*. 43, 315-320.

9. Nakayama, T., Tsuruoka, N., Akai, M & Nishino, T, (2000). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89, 612-614.
10. Tamai, E., Miyata, S., Tanaka, H., Nariya, H., Suzuki, M;., Matsushita, O., Hatano, N & Okabe, A, (2008). *Applied microbiology and biotechnology*. 80, 627-635.
11. Wu, QI., Li, C., Li, C., Chen, H & Shuliang, L, (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160, 129-139.
12. Kang, S.I., Jang, Y.B., Choi, Y.J & Kong, (2005). *Biotechnology and bioprocess engineering*. 10, 593-598.
13. Rippon, J.W; Peck, G.L, (1967). *The journal of investigative dermatology*. 49, 371-378.
14. Bon, E.P.S., Ferrara, M.A & Corvo, M.L, (2008) *Enzimas em biotecnologia*, editora intercência, Rio de Janeiro.
15. Petrova. D., Derekova, A & Vlahov, S, (2006). *Folia Microbiol*. 51, 93–98.
16. Uesugy, Y., Arima J., Usuki, H., Iwabuchi, M & Hatanaka, T, (2008). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784, 716–726.
17. Sakurai, Y., Inoue, H., Nishii, W., Takahashi, T., Iino, Y., Yamamoto, M & Takahashi, K, (2009). *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*. 73, 21-28.
18. Puri, S., Khalil, Q & Gupta, R, (2002). *Current microbiology*. 44, 286-290.
19. Joo, H.S & Chang, C.S, (2005). *Process biochemistry*. 40, 1263-1270.
20. Soares, F.E.F., Braga, F.R., Genier, H.L.A., Araujo, J.V., Ferreira, S.R., Araujo, J.M., Tavela, A.O., Vilela, V.L.R & QUEIRÓZ, J.H, (2010). *African journal of microbiology research*. 4, 2699-2703.
21. Castellani, A. (1967), In: *Guia prático para fungos fitopatogênicos* (Menezes, M e Assis, S.M.P., ed), 2 edição, editora: Imprensa universitária da UFPE, pp. 79-80.
22. Pridham, T. G., Aderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hesseltine, C. W & Benedict, R.G, A, (1957). *Antibiotics Manual*. 947-953.

23. Nickerson, W.J & Mohan, RR, (1953). *International Congress of Microbiology*, 6^o Congress, Roma, p 137-146.
24. Wawrzekiewicz, K., Wolski, T & Lobarzewski, (1991). *Mycopathologia*. 114, 1-8.
25. Lacaz, C. S, (1991), *Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de interesse médico*. 8^o ed. São Paulo: Savier, p. 685.
26. Chavira, R.J., Burnett, T.J & Hageman, J.H, (1984). *Analytical Biochemistry*. 136, 446-450.
27. El-Refai, (2005). *Procbio*. 40, 2325-2332.
28. Elibol, M & Moreira, A.R, (2005). *Process biochemistry*. 40, 1951-1956.
29. Lynch, H.C & Yang, Y, (2004). *Enzyme and microbial technology*. 34, 48-54.
30. Roubos, J.A., Krabben, P., De Laat, W.T.A.M., Babuska, R & Heijnen, J.J, (2002). *Biotechnology progress*. 18, 451-457.
31. Azeredo, L.A.I., Freire, D.M.G., Soares, R.M.A., Leite, S.G.F & Coelho, R.R.R, (2004). *Enzyme and microbial technology*. 34, 354-358.
32. Gibb, G.D & Strohl, G.D, (1988). *Canadian Journal of Microbiology*. 34, 187-190.
33. Moreira, K.A., Cavalcanti, T.H., Duarte, H.S., Tambourgi, E.B., Melo, E.H.M., Silva, V.L., Porto, A.L.F & Lima-Filho, J.L, (2001). *Brazilian journal of microbiology*, 32, 215-220.
34. Gupta, R., Gupta, N & Rathi, P, (2004). *Applied microbiology and biotechnology*, 64, 763-781.
35. Bascaran, V., Hardisson, C & Brana, A.F, (1990). *Applied Microbiology Biotechnology*. 34, 208-213.
36. Porto, T.S, (2008), Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
37. Haddar, A., Zouari, N.F., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M & Kamoun, S, (2010). *Journal of bioscience and bioengineering*. 110, 288-294.
38. Wang, Q., Hou, Y, Xu, Z., Miao, J & Li G, (2008). *Bioresource Technology*. 99, 1926–1931.

39. Anandan, D., Marmer, W.N & Dudley, R.L, (2007). *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 34, 339-347.
40. Groudieva, T., Kambourova, M., Yusef, H., Royter, M., Grote, R., Trinks, H & Antranikian, G, (2004). *Extremophiles* 8, 475–488.
41. Schrempf, H, (1999), In:. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, (DEMAIN, A.L & DAVIES, J.E., ed.) 2 edição, Washington: ASM Press, pp. 501-510.
42. Kalaifarasi, K & Sunitha, P.U, (2009). *African journal of biotechnology*, 8, 7035-7041.
43. Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah, N & Narsi, M, (2008). *Applied microbiology and biotechnology*. 79, 915–923.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES PRODUZIDAS POR *STREPTOMYCES* sp. DPUA 1559

Neste capítulo, é apresentada a caracterização parcial de collagenase produzidas por *Streptomyces* spp. DPUA 1559 quanto aos aspectos físico-químicos, tais como, pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH, estabilidade a temperatura, ação de inibidores, perfil eletroforético e zimograma. Os resultados estão sendo analisados para a publicação na revista internacional *Folia microbiologica*.



Fator de impacto: 0,978

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE COLAGENASES PRODUZIDAS POR *STREPTOMYCES* sp. DPUA1559

M.C.S. Barros^a · C.A. Lima^a · F.O. Silva^b ·

J.L. Lima-Filho^a · T.S. Porto^c · A.L. Porto^{a,b}

^aUniversidade Federal de Pernambuco-UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil;

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil;

^cUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Campus do Agreste, Unidade Acadêmica de Garanhuns. Av. Bom Pastor S/N Boa Vista 55296-901 - Garanhuns, PE - Brasil

Email: mcarinesb@hotmail.com , analuporto@yahoo.com.br

RESUMO Colagenases são enzimas proteolíticas de grande interesse industrial. Neste trabalho foi realizada a caracterização parcial de colagenases extracelulares produzidas por *Streptomyces* sp DPUA 1559 quanto aos aspectos físico-químicos. A produção das enzimas foi realizada utilizando meio de cultivo contendo a gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio. A colagenase apresentou pH ótimo 8,0 e estabilidade na faixa de pH 7,4 a 9,5 durante 5h. A temperatura ótima foi obtida a 37°C e 50°C, indicando a presença de duas enzimas e as quais foram estáveis na faixa de 25 a 70°C durante 5h. A atividade colagenolítica foi totalmente inibida com fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) e Pepstatina indicando assim que as duas colagenases possivelmente são serino e aspártico protease. O teste do zimograma resultou em várias bandas com valores de 108, 64, 57, 48, 45 e 43kDa, com atividade proteolítica. Esses resultados sugerem que as colagenases produzidas *Streptomyces* sp DPUA 1559 apresentam características bioquímicas adequadas para utilização na indústria farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: *Streptomyces*, colagenase, proteases, atividade enzimática.

INTRODUÇÃO

Colagenases são enzimas produzidas por células específicas do tecido conjuntivo, sua ação nas fibras do colágeno está muitas vezes envolvida em situações fisiológicas, como desenvolvimento embrionário, reparação de feridas e também em situações patológicas, como invasão de tumores e ulcerações (RAVANTI e KAHARI 2000; JAIN e JAIN 2010).

O colágeno é uma proteína estrutural insolúvel presente na pele, nos ossos, cartilagens, dentes, vasos sanguíneos, representando cerca de 30% do peso total das proteínas animais (TSURUOKA et al. 2003; UESUGI et al. 2008).

O colágeno tipo I é constituído de três cadeias polipeptídicas contendo uma repetição na sequência da tripla hélice de Gly-X-Y, onde X e Y são frequentemente ocupados pelos aminoácidos prolina e 4-hidroxiprolina, respectivamente, esta combinação estabiliza a hélice no mais alto grau sendo difícil de ser atacado por proteases mais comuns e para promover a hidrólise é necessário enzimas específicas como as colagenases (RAMSHAW et al. 1998).

Muitas bactérias têm sido estudadas para produção de colagenases como *Bacillus cereus* (MAKINEN e MAKINEN 1987), *Clostridium perfringens* (MATSUSHITA et al. 1994), *Vibrio vulnificus* (KANG et al. 2005), *Streptomyces parvulus* (SAKURAI et al. 2009), *Bacillus pumilus* (WU et al. 2010), e *Streptomyces exfoliatus* (JAIN e JAIN 2010) e algumas destas enzimas foram parcialmente caracterizadas.

A utilização comercial de colagenases é bastante variada. Podem ser encontradas na composição de pomadas para tratamento de feridas ajudando na eliminação de tecidos necrosados, remoção de cicatrizes hipertróficas (CHENG et al. 1999; MARKOVICK 2008). Na indústria de cosméticos são utilizadas em tratamentos de rugas, acne e em limpeza de pele (DOMOGATSKY 2003). Através da ação das colagenases têm se obtido peptídeos de interesse industrial e médico, levando a uma grande variedade de aplicações como em hidratantes, temperos e produtos dietéticos (RAVANTI e KAHARI 2000).

Baseando-se na importância das colagenases o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização parcial das colagenases produzidas de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolados de líquens da região Amazônica, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos. A cepa de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 de líquen da região Amazônica foi obtida da Coleção de culturas do Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A cepa foi conservada segundo Castellani (1967).

Meio de crescimento e pré-inóculo. O meio de cultura utilizado para o crescimento da cepa de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 e para o preparo do pré-inóculo foi o ISP-2 (PRIDHAM et al., 1957), modificado pela retirada da glicose. A constituição do meio, para um volume final de 50 ml, foi de: extrato de levedura (0,4% p/v), extrato de malte (1,0% p/v) e agar (2% p/v) e pH 6,0. A esterilização do meio foi realizada por autoclave a 121°C, a 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Para a produção do pré-inóculo, a cepa foi cultivada por 48h, 28°C, 200 rpm em meio líquido ISP-2 (PRIDHAM et al., 1957).

Produção de collagenases. Após as 48 horas, 10^6 esporos/mL foram inoculados em 50ml de meio de produção descrito por Nickerson e Mohan (1953), constituído por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l); K_2HPO_4 (1,5 g/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g/l); CaCl_2 (0,025 g/l) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), suplementado com 1,5% de gelatina. A produção foi realizada durante 72 horas à temperatura de 28°C sob agitação de 100 rpm. Após o período de 72h a cultura foi centrifugado à 1100 xg por 15 min e filtrado em membranas de nitrocelulose de 0,45 μm de porosidade em bomba à vácuo. O extrato bruto foi utilizado para a caracterização das collagenases presentes.

Determinação da atividade collagenolítica. A detecção da atividade collagenolítica foi medida usando uma modificação do método desenvolvido por Chavira et al., (1984). O azocolágeno (*Azocoll*®, Sigma, St. Louis MO USA) foi suspenso em solução tampão Tris-HCl (0,1 M pH 7,2), para a concentração final de 5 mg/ml. Posteriormente, 150 μl do extrato bruto e 150 μl do tampão Tris- HCl (0,1 M, pH 7,2), foram misturados com 270 μl da solução do *Azocoll*® e mantidos em banho-maria por 18h à 37°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas à 10.000 xg por 15 min à 4°C. A absorbância da solução sobrenadante foi medida em 520 nm usando um espectrofotômetro (Micronal B582). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima por ml que produz um aumento na densidade ótica de 0,1 em 18h em 520 nm.

Efeito do pH na atividade e estabilidade da collagenase. O pH ótimo da atividade da enzima foi determinado pela incubação do extrato enzimático com *Azocoll*® dissolvido, (1:10), em soluções tampões de: Citrato-fosfato (pH 4, 5, 6 e 7), Tris-HCl (pH 7,4, 8 e 9) e Bicarbonato-carbonato (pH 9,5 e 10,7) durante 18h à 37°C e posterior determinação da

atividade collagenolítica. Para o efeito do pH na estabilidade da enzima, o extrato enzimático foi incubado à 5°C com as mesmas soluções tampões anteriormente descritas e amostras foram retiradas nos tempos de 0 h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, para determinação da atividade collagenolítica.

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da collagenase. A temperatura ótima foi determinada, pela incubação do extrato enzimático com o substrato em diferentes temperaturas (25, 30, 37, 45, 50, 60 e 70°C) e posterior determinação da atividade collagenolítica. Para o estudo da estabilidade, o extrato enzimático foi incubado nas mesmas temperaturas anteriormente descritas por 5 horas, sendo retiradas alíquotas em 0 h, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h e 5h, para determinação da atividade collagenolítica.

Ensaio de inibição enzimática. A fim de estabelecer o tipo de enzima presente no extrato enzimático obtido pelo *Streptomyces* sp DPUA 1559, foi realizado o ensaio de inibição. Fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) 1mM foi usado como inibidor de serina-proteases, Pepstatina 1 mM foi usado para inibir aspártico-protease, ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) 0,1M foi usado como agente quelante inibidor de metaloproteases e ácido iodoacético 0,1M foi utilizado como inibidor específico para cisteino-protease. O extrato bruto, foi diluído nos respectivos inibidores (1:1) e mantido por 30 min à 37°C. Após este período foi realizado o teste de atividade collagenolítica.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida do sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE). A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), usando-se um gel de concentração de 4% e um de separação de 15%. Os géis foram corados por duas horas em solução de Comassie brilliant blue 0,25% e descorados em solução de metanol 45%, ácido acético 10%, até a visualização das bandas, sendo posteriormente corado com nitrato de prata segundo Oakley et al. (1980). A massa molecular das bandas foi determinada através do software LabImage 1D (Loccus Biotecnologia) utilizando-se como padrão de proteínas (GE healthcare), fosforilase b (97kDa), albumina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (21kDa) e α -lactoalbumina (14,4kDa).

Zimograma. A atividade proteolítica das bandas, no zimograma, foi demonstrada de acordo com Agren (1994) modificado. Diferentes concentrações de proteína (0,1µg -10µg) foram submetidas à eletroforese como descrito anteriormente, em condições não redutoras. Após a SDS-PAGE, os géis foram incubados sob agitação constante em solução aquosa de Triton X-100 2,5%, duas vezes, por 20 minutos, para remover o SDS. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada por três vezes, sendo posteriormente incubado em solução tampão

tris – HCl 50 mM, pH 7,5, suplementada com cloreto de cálcio 15 mM por 12 horas. Posteriormente, o gel foi corado e descorado como descrito na eletroforese.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do pH na atividade e estabilidade da enzima. O parâmetro pH exerce uma alta influência na manutenção da atividade enzimática. Seu efeito se dá por alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (RICARDO; TEXEIRA 1993). Houve alterações nos valores de atividade quando se variou os níveis de pH (Figura 1). A atividade colagenolítica máxima foi observada em pH 8,0 utilizando a solução tampão Tris- HCl 0,1M (Figura 1), indicando que a collagenase de *Streptomyces* sp DPUA 1559 pertence ao grupo das proteases alcalinas.

O resultado de pH ótimo da collagenase alcalina produzida pelo *Streptomyces* sp. DPUA 1559 obtido neste estudo, estão de acordo com resultados encontrados por Petrova et al. (2006), que obtiveram uma collagenase a partir de *Streptomyces* sp. 3B com pH ótimo de 7,5; Sakurai et al. (2009) que produziram collagenase por *Streptomyces parvulus* apresentando pH ótimo de 9,0; Ivanko et al. (2002), que encontraram no complexo enzimático de *Streptomyces* sp. 1349 collagenases com pH ótimo nas faixas de pH neutro (6-7) e alcalino (9-10); Endo et al. (1987) obtiveram collagenase de *Streptomyces* sp. C51 com pH ótimo de 8-9 e Uesugi et al. (2008) obtiveram collagenase de *Streptomyces omiyaensis* com pH ótimo na faixa de 8-9.

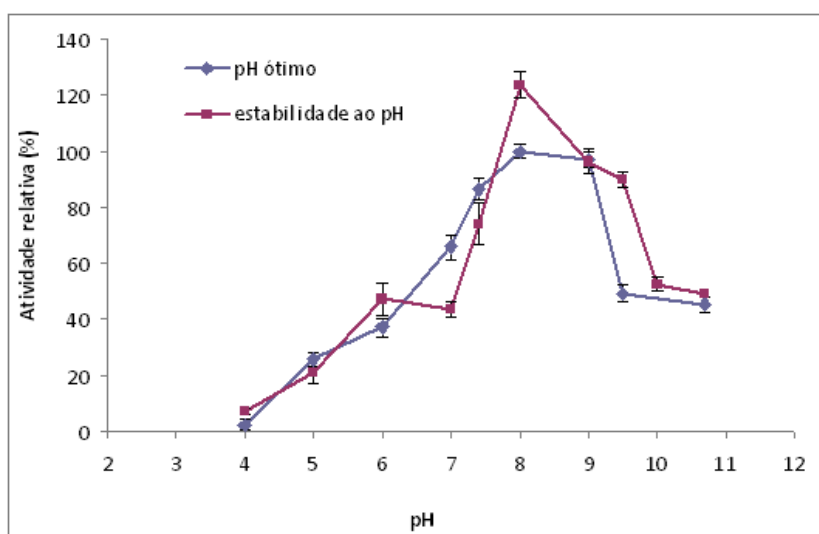


Figura 1. Efeito do pH na atividade e na estabilidade de collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA1559 em 5h.

Estes resultados demonstram que grande parte das collagenases produzidas por micro-organismos do gênero *Streptomyces* apresentam maior atividade nos pHs neutros e alcalinos. (Tabela 1).

Tabela 1 – Características das collagenases obtidas de micro-organismos.

Referência	Fonte	pH ótimo	Temp. ótima
Barros et al. 2011	<i>Streptomyces</i> sp. DPUA 1559	8,0	37 e 50°C
Ivanko et al. 2002	<i>Streptomyces</i> sp. 1349	6-7 e 9-10	37 e 60°C
Petrova et al. 2006	<i>Streptomyces</i> sp. 3B	7,5	37°C
Sakurai et al. 2009	<i>Streptomyces parvulus</i>	9,0	50°C
Endo et al. 1987	<i>Streptomyces</i> sp. C51	8-9	35-40°C
Uesugi et al. 2008	<i>Streptomyces omiyaensis</i>	8-9	50, 45 e 55°C

O efeito do pH na estabilidade da collagenase produzidas por *Streptomyces* sp DPUA 1559 está representado na Figura 1. Mais de 60% da atividade da enzima foi observada entre o pH 7,0 e 9,0 e uma perda quase total da atividade a pH 4,0. Estes resultados foram similares com os obtidos por Petrova et al. (2006), que estudaram collagenases de *Streptomyces* sp. 3B e descobriram duas isoformas de collagenase onde mais de 50% da atividade máxima foi detectada entre os pH 6,5 e 9,0 e a inativação completa no pH inferior a 4,5 e superior a 10,5.

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da enzima. A temperatura exerce grande influência na atividade das enzimas. Quando se aumenta a temperatura, a atividade enzimática também aumenta, com isso, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor. De modo geral, esta na literatura que temperaturas elevadas em mais de uma dezena de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, frequentemente levam, à perda de atividade (HALPERN, 1997).

É observado na Figura 2, dois picos de atividade enzimática correspondentes às temperaturas de 37°C e 50°C o que sugere a presença de duas enzimas. Houve também uma redução na atividade das collagenases com valores de temperatura inferiores a 30°C.

O resultado de temperatura ótima das collagenases produzida pelo *Streptomyces* sp. DPUA 1559 obtido neste estudo, corroboram com resultados encontrados por Petrova et al. (2006), que obtiveram uma collagenase a partir de *Streptomyces* sp. 3B com temperatura ótima de 37°C; Sakurai et al. (2009) utilizando *Streptomyces parvulus* obtiveram collagenase apresentando temperatura ótima de 50°C; Ivanko et al. (2002), que encontraram duas enzimas do tipo collagenases com temperaturas ótimas em 37°C e 60°C a partir do extrato produzido

por de *Streptomyces* sp. 1349; Endo et al. 1987 obtiveram collagenase de *Streptomyces* sp. C51 com temperatura ótima de 35-40°C e Uesugi et al. (2008) obtiveram collagenase de *Streptomyces omiyaensis* com temperaturas ótimas de 45, 50 e 55°C. Estes resultados demonstram que grande parte das collagenases produzidas por *Streptomyces* apresentam atividade máxima em temperaturas com valores de 37-60°C (Tabela 1).

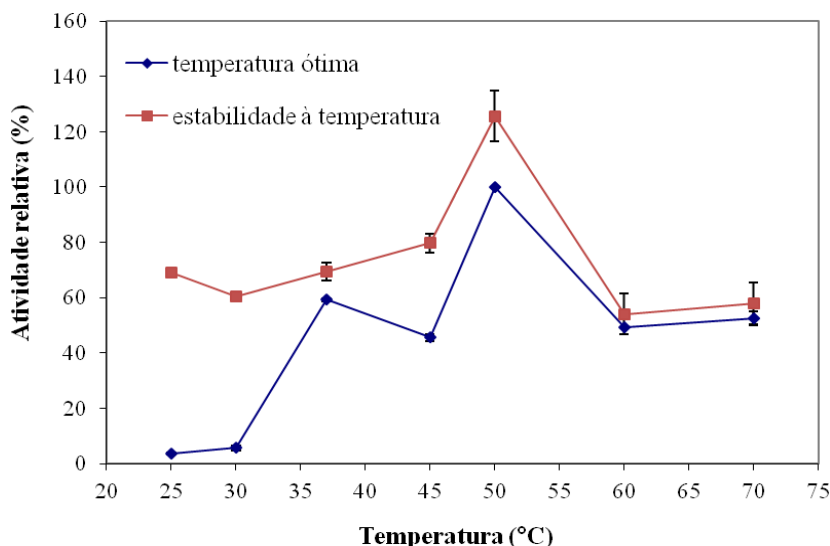


Figura 2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA1559 em 5h.

A estabilidade térmica das collagenases do *Streptomyces* sp. DPUA foi observada em toda a faixa de temperatura testada, durante 5 horas de incubação, apresentando uma retenção da atividade maior que 60% na faixa de temperaturas de 25 a 70°C (Figura 2).

Comparando os resultados do presente estudo com os da literatura verifica-se que as collagenases apresentam níveis de estabilidade a temperaturas diferentes. Sakurai et al. (2009) em seus estudos com collagenase obtida a partir de *Streptomyces parvulus*, obtiveram uma enzima estável até 50°C, acima deste valor a enzima foi se tornando instável até ser quase completamente inativada em 60°C por 30 min. Os resultados obtidos por 1h de incubação foram quase o mesmo, só com uma diferença que 45% da atividade original da enzima foi perdida em 55°C. Petrova et al. (2006) estudando duas isoformas de collagenases de *Streptomyces* sp. 3B verificaram que a enzima apresentou uma boa estabilidade em resposta a um tratamento térmico por 1 hora a 37°C e reteve 50% de sua atividade após tratamento a 42°C por 40 min e uma perda de atividade foi observada em 47°C após 20 min. Em comparação aos resultados obtidos neste estudo, é verificado que as collagenases de

Streptomyces sp DPUA 1559 apresentaram grande estabilidade a temperatura o que pode ser de grande interesse para o mercado industrial.

Ensaio de inibição enzimática. Os resultados dos ensaios de inibição estão representados na tabela 2 e mostra que as collagenases presentes no extrato bruto produzido por *Streptomyces* sp. DPUA 1559, foram totalmente inibidas pelos inibidores PMSF e Pepstatina. Esses resultados sugerem que as enzimas pertencem ao grupo das serino e aspártico proteases.

Tabela 2. Ensaio de inibição enzimática das collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA1559.

<i>Inibidores</i>	<i>Atividade collagenolítica (U/ml)</i>	<i>Inibição (%)</i>
PMSF 1mM	0	100
Pepstatina 1mM	0	100
EDTA 0,1M	16,08	0
Ácido iodo acético 0,1M	8,71	63,85
Controle	13.64	0

Eletroforese SDS-PAGE e zimograma. O extrato bruto de *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi submetido à eletroforese SDS-PAGE, a sua atividade proteolítica foi confirmada pela análise de zimograma (Figura 3). O extrato bruto apresentou várias bandas variando de 48, 45, 43, 30 e 23kDa no gel SDS-PAGE, enquanto o zimograma mostrou várias bandas com atividade proteolítica (108, 64, 57, 48, 45 e 43kDa).

A massa molar das collagenases encontradas neste estudo estão de acordo com os da literatura (Tabela 3). Kang et al. (2005) obtiveram collagenases de *Vibrio vulnificus* com 35,0kDa, do grupo das serino proteases: TSURUOKA et al. (2003) obtiveram serino collagenase de *Alicyclobacillus sendaiensis* NTAP-1 com 37,0kDa; OKAMOTO et al. (2001) em estudos obtiveram serino collagenase de *Bacillus* sp. MO-1 com massa molecular de 210kDa constituída de duas subunidades de 105kDa; Petrova et al. (2006) obtiveram collagenase de *Thermoactinomyces* sp. 21E com massa molecular de 50kDa, apresentam massas moleculares maiores do que as outras metaloproteases e serino proteases não collagenolíticas.

A presença de algumas collagenases do tipo serino com pesos moleculares elevados neste estudo mostra a característica de algumas collagenases bacterianas de apresentarem

massas molecular maiores do que outras proteases (Tabela 3). Watanabe et al. (2004) relataram que as massas moleculares de serino proteases collagenolíticas de *Geobacillus collagenovorans* e *Streptococcus gordonii* têm subunidades simples com massas moleculares muito maiores, 105kDa e 98kDa, respectivamente estando em contraste com as massas moleculares de outras serino proteases de bactérias, que geralmente variam entre 18 e 35kDa.

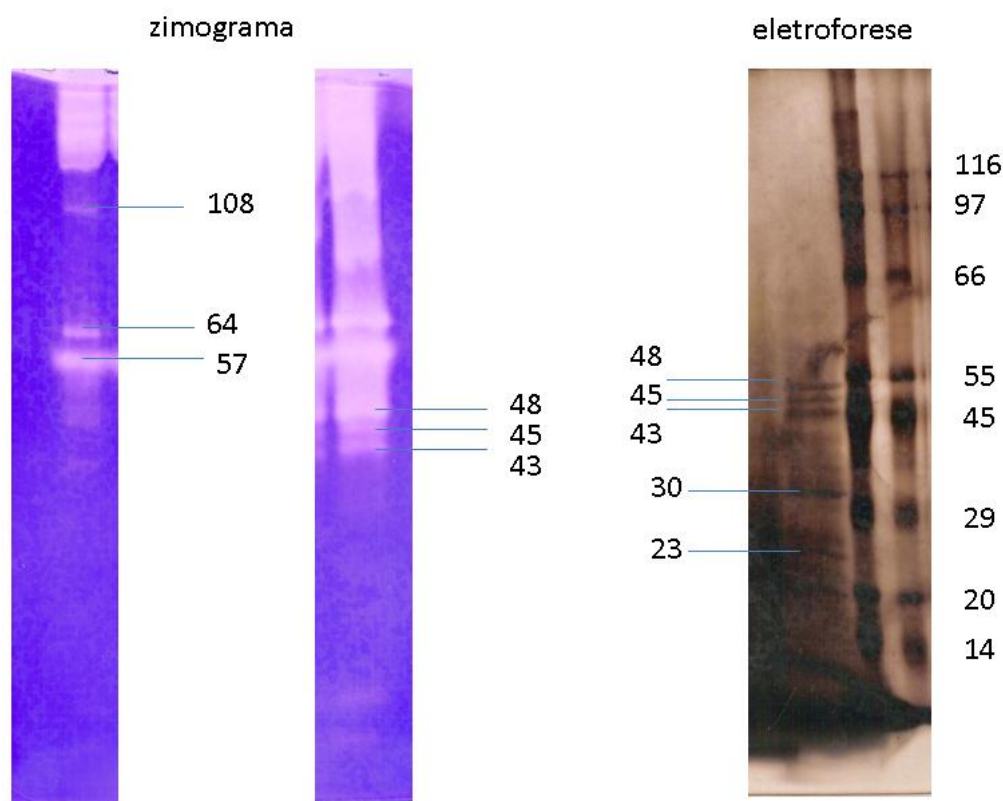


Figura 3. Eletroforese e zimograma da collagenase produzida por *Streptomyces* sp. DPUA1559. Padrão de Peso Molecular: Fosforilase b (97kDa), Albumina (60kDa), Ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (21kDa) e α -lactoalbumina (14,4kDa).

A maior massa molecular de proteases collagenolíticas de bactérias pode ser devido a presença de domínios ligantes do colágeno, uma forma sofisticada de evolução para a sobrevivência das bactérias patogênicas. A presença de domínios na collagenase ColG de *C. histolyticum*, que é o micro-organismos mais bem estudado quanto a produção de collagenases, se ligam a todos os tipos de fibras colágenas, independentemente do seu diâmetro (Toyoshima et al. 2001).

Tabela 3. Massa molecular de proteases collagenolíticas extracelulares de diferentes espécies bacterianas.

Bacteria	Tipo	MM (kDa)	Fonte
<i>Alicyclobacillus sendaiensis</i> NTA-1	Serino protease	37	Tsuruoka et al. 2003
<i>Vibrio vulnificus</i>		35,0	Kang et al. (2005)
<i>Streptococcus gordonii</i>		98	Juarez et al. 1999
<i>Bacillus</i> sp 21E		210 (2 x 105)	Okamoto et al. 2001
<i>Thermoactinomyces</i> sp. 21E		50	Petrova et al. 2006

Em geral, micro-organismos como as bactérias que produzem collagenases, são invasores de hospedeiros e presumivelmente, as enzimas contribuem para a patogenicidade, permitindo que os organismos penetrem a barreira do tecido conjuntivo. Um importante exemplo deste tipo de invasão foi demonstrado em 1961 por Mandl com a degradação do tecido conjuntivo durante a infecção por *Clostridium histoliticum* (PETROVA, DEREKOVA e VLAHOV 2006).

3.5 CONCLUSÃO

As collagenases de *Streptomyces* sp DPUA 1559 são alcalinas e apresentaram uma ampla faixa de estabilidade ao pH e à temperatura, o que é interessante para aplicação industrial. Esses resultados sugerem que as collagenases produzidas *Streptomyces* sp DPUA 1559 apresentam características bioquímicas adequadas para utilização no mercado industrial.

3.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento do CNPq e a bolsa de doutorado concedida pela CAPES.

3.7 REFERÊNCIAS

Agren MS. (1994) Gelatinase activity during wound healing. *British Journal of Dermatology*, 131:634-40.

Castellani A (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile water. Further researches. *J Tropical Med Hygiene*, 70: 181-184.

Chavira RJ, Burnett TJ, Hageman JH (1984) Assaying proteinases with Azocoll. *Anal Biochem*, 136:446-50.

Cheng H, Sun G, Guan Z (1999) Experimental study clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars. *Zhonghua zheng xing wai ke zhi*, 15: 202-205.

Domogatsky S (2006) Highly selective proteolytic enzymes preparation for debridement of necrotic tissue from bum wounds. Disponível em: <<http://www.crd.org/Eventos/bio2003-proteolityc-enzymes>>. Acesso: 12/07/2006.

Endo A, Murakawa S, Shimizu H, Shiraishi Y (1987) Purification and Properties of Collegenase from a *Streptomyces* Species. *The J of Biochem*, 102:163-170.

Halpern MJ (1997) Bioquímica, 1 edição, editora Lidel. Lisboa, Portugal, p. 233-303.

Ivanko OV, Varbanets' LD, Valahurova OV (2002) Collagenase activity of *Streptomyces* sp. 1349. *Mikrobiol Z*, 64:21-27.

Jain R, Jain PC (2010) Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliates* CFS 1068 using poultry feather. *India j of experimental biol*, 48: 174-178.

Juarez ZE, Stinson MW (1999) An extracellular protease of *Streptococcus gordonii* hydrolyzes type IV collagen and collagen analogues. *Infect and immunity*, 67:271-278.

Kang SI, Jang YB, Choi YJ, Kong JY (2005) Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H, *Biotechnol and bioprocess eng*, 10:593-598.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.

Mandl L (1961) Collagenases and elastinases. *Adv in enzymol*, 23:163-264.

Markovick NA (2008) Application of proteolytic enzymes and their inhibitors in cosmetic and medicine. www.scicosmeticsoc.ru/en/journal/1/3/html. Acesso dia: 15/01/2008.

Makinen KK, Makinen PL (1987) Purification and properties of an extracellular collagenolytic protease produced by the human oral bacterium *Bacillus cereus* (Strain Soc 67)*. *The j of biol chem*, 262:12488-12495.

Matsushita O, Yoshihara K, Sei-Ichi K, Minami J, Okabe A (1994) Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120-Kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J of bacteriol*, 176:149-156.

Nickerson WJ, Mohan RR (1953) Studies on the nutrition and metabolism of *Streptomyces*. In: Symposium on Actinomycetales, *International Congress of Microbiol*, 6^o Congress, Roma, pp 137-146.

Okamoto M, Yonejima Y, Tsujimoto Y, Suzuki Y, Watanabe K (2001) A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp. Strain MO-1. *Appl microbiol and biotechnol*, 57:103-108.

Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem*, 105(2), p.361-3.

Pridham TG, Aderson P, Foley C, Lindenfelser LA, Hesseltine CW, Benedict RG (1957) A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiotics Manual*, p. 947-953.

Petrova D, Dekerova A, Vlahov S (2006) Purification and Properties of Individual Collagenases from *Streptomyces* sp. Strain 3B. *Folia Microbiol*, 51:93–98.

Petrova DH, Shishkov SA, Vlahov SS (2006) Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp, 21E: purification and some properties, *J of basic microbiol*, 46:275-285.

Ramshaw JA, Shah NK, Brodsky B (1998) Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides, *J of Struct Biol* , 122:86-91.

Ravanti L, Kahari VM (2000) Matrix metalloproteinases in wound repair. *Intern J of Mol Med*, 6:391-407.

Ricardo CP, Teixeira, A (1993) *Enzimas*, 4 edição, Lisboa: Editora Plátano S.A.

Sakurai Y, Inoue H, Nishii W, Takahashi T, Iino Y, Yamamoto M, Takahashi K (2009) Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 73:21-28.

Toyoshima T, Matsushita O, Minami J, Nishi N, Okabe A, Italo T (2001) Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagen exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo. *Connect tissue*, 42:281-290.

Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H, Oyama H, Oda K, Nishino T (2003) Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* Strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression. *Appl and Environm Microbiol*, 69:162-169.

Uesugi Y, Arima J, Usuki H, Iwabuchi M, Hatanaka T (2008) Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. *Biochim et Bioph Acta*, 1784:716–726.

Watanabe K (2004) Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl microbiol and biotechnol*, 63:520-526.

Wu QI, Li C, Li C, Chen H, Shuliang L (2010) Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:129-139.

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO DE COLAGENASES DE *STREPTOMYCES* sp. DPUA 1559 UTILIZANDO O SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO

Neste capítulo, é apresentada a extração de collagenases a partir do extrato bruto produzido por *Streptomyces* spp. DPUA 1559 de líquen pertencente ao Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), utilizando o sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato. Os resultados estão sendo trabalhados para a publicação na revista internacional *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.



Fator de impacto: 1.004

**EXTRAÇÃO DE COLAGENASES DE *STREPTOMYCES* sp. DPUA 1559
UTILIZANDO O SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO**

Márcia Carine da Silva Barros¹; Milena Fernandes da Silva²; José Luiz de Lima Filho¹; Tatiana Souza Porto³; Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,2}.

¹Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Lins do Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil;

²Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil;

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus do Agreste, Unidade Acadêmica de Garanhuns. Av. Bom Pastor S/N Boa Vista 55296-901 - Garanhuns, PE – Brasil.

RESUMO Neste trabalho, foi realizada a extração de collagenases extracelulares de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato. Dois planejamentos experimentais completos (2^4 e 2^2) foram usados, onde variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas, foram estudadas. Quatro variáveis, descritas na literatura como importantes para o SDFA (massa molar do PEG, concentração do PEG e do sal e pH) foram escolhidas para verificar quais apresentariam efeito significativo na extração das collagenases. Os melhores resultados da extração de collagenases a partir do extrato bruto produzido por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 foram obtidos utilizando 12,5% (m/ m) de PEG 8000, 10,0% (m / m) fosfato e pH 8,0, apresentando assim um coeficiente de partição 0,36, rendimento em atividade de 167,2% e fator de purificação de 2,53. Os resultados demonstraram que o SDFA PEG/fosfato foi seletivo para extração de collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1559.

Palavras-chave: SDFA, collagenases, proteases, extração enzimática, *Streptomyces*

1. INTRODUÇÃO

Colagenases são enzimas proteolíticas que hidrolizam a estrutura helicoidal do colágeno nativo em pequenos fragmentos. Ao contrário das colagenases de mamíferos, as colagenases de origem microbiana possuem a vantagem de atacar vários sítios ao longo da cadeia da molécula do colágeno [1-2]. São enzimas de grande interesse comercial, utilizadas nas mais diversas áreas industriais. Na indústria de alimentos podem ser utilizadas no amaciamento de carnes; na indústria de curtumes para o processamento do couro; na medicina em pomadas para limpeza de feridas necrosadas, remoção de cicatrizes hipetróficas de queimaduras [3, 4,5-6].

Diversos micro-organismos são capazes de produzir colagenases [7,8,9-10] e os do gênero *Streptomyces* têm sido bem relatados quanto à produção e a purificação destas enzimas a partir de seus extratos brutos [11-12].

O desenvolvimento de técnicas e métodos de separação de proteínas, como as colagenases, tem sido um importante pré-requisito para o crescimento nas indústrias de biotecnologia [13], pois a maior parte do valor de produção encontra-se no processo de purificação, chegando a representar até 80% do custo do produto final, com isso, necessita-se da busca de técnicas em larga escala, que sejam econômicas, eficientes e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula. [14-15].

Dentre as técnicas utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas, a extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas (SDFA) oferece muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais, como utilização de material de baixo custo, com possibilidade de reciclagem do polímero, curtos tempos de processamento [16-17]. Este sistema apresenta elevado teor de água (80-90% m/m), o que proporciona um efeito não-deletério sobre a estrutura da proteína [18], mantendo a atividade biológica após a extração.

A separação de biomoléculas em SDFA depende da natureza do polímero e de sua massa molar, concentração do polímero e do sal, temperatura e pH do sistema, juntos com o tamanho, carga e hidrofobicidade da molécula, que são as principais variáveis que interferem no coeficiente de partição. A utilização de planejamentos experimentais é uma ótima ferramenta para se conhecer os principais fatores relacionados com cada tipo de extração e tipo de biomolécula que se quer separar [19].

O SDFA tem sido bastante utilizados para extração de diversas enzimas como: Penicilina acilase [20]; Pepsina [21]; α -galactosidade [22]; Papaína [23] e Tripsina [24] e neste trabalho o objetivo foi extrair collagenases a partir do extrato bruto produzido por *Streptomyces* sp DPUA 1559 através do SDFA PEG/fosfato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

A cepa de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolada de líquen na região Amazônica foi obtida da Coleção de culturas do Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A cepa foi conservada segundo Castellani [25].

2.2 Meio de crescimento e pré-inóculo

O meio de cultura utilizado para o crescimento da cepa de *Streptomyces* sp. DPUA 1559 foi o ISP-2 [26], modificado pela retirada da glicose. A constituição do meio, para um volume final de 50 ml, foi de: extrato de levedura (0,4% p/v), extrato de malte (1,0% p/v) e agar (2% p/v). Para o preparo do pré-inóculo foi utilizado o meio ISP-2, descrito anteriormente, modificado pela retirada da glicose e do ágar.

Para a produção do pré-inóculo, a cepa foi cultivada por 48h, 28°C, 200 rpm em meio líquido ISP-2 [26] modificado pela retirada da glicose.

2.3 Produção de collagenases

Uma concentração de 10^6 esporos/ml foi inoculada em 50 ml de meio de produção descrito por Nickerson e Mohan [27], constituído por: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,025 g/l); K_2HPO_4 (1,5 g/l); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,015 g/l); CaCl_2 (0,025 g/l) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g/l), suplementado com 1,5% de gelatina (VETEC) e pH 6,0. A produção foi realizada durante 72 horas à temperatura de 28°C sob agitação de 100 rpm. Após o período de 72 h a cultura foi centrifugado à 1100 g por 15 min filtrado em membranas de nitrocelulose de 0,45 μm de porosidade em bomba à vácuo. O extrato bruto foi utilizado para a extração das collagenases presentes.

2.4 Extração líquido-líquido em SDFA

Para a extração das collagenases, os sistemas foram preparados com polietileno glicol (PEG), das marcas Fluka e Amresco, em diferentes massas molares (1500, 4000, 8000, 10000 g/mol) e uma solução contendo os sais fosfato de potássio dibásico anidro (K_2HPO_4) e fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4), em diferentes valores de pH (6,0, 7,0, 8,0 e 9,0). Em tubos graduados de 15 ml, 1,0g do extrato bruto contendo as collagenases, foram misturadas com o PEG, (na forma de solução estoque 50% (m/m) e com uma solução 40% (m/m) de sais fosfato. Em seguida, foi adicionada a água deionizada para ajustar a concentração final desejada dos componentes, de tal forma que, a massa final do sistema fosse de 5 g. Após isso, a mistura foi agitada em vórtice por 1 minuto. Após 1h de decantação, as amostras das fases (superiores e inferiores) foram retiradas e analisadas quanto à atividade

enzimática, concentração de proteínas totais e volume. Todo o experimento foi realizado em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.5 Planejamento experimental para a extração de collagenases em SDFA

Para os experimentos de extração das collagenases foram utilizados dois planejamentos estatísticos completos (Tabelas 1 e 2), do tipo 2^4 e 2^2 , sempre com 4 repetições no ponto central segundo [28], onde foram estudadas as variáveis: massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de sais fosfato e pH.

Para as análises estatísticas dos resultados foram utilizadas 3 variáveis resposta: coeficiente de partição, fator de purificação e recuperação em atividade enzimática nas fases superior e inferior do sistema. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as 3 respostas.

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com nível de significância de $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados com o "Statistica 8.0" (Statsoft Inc., 2008).

Tabela 1- Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento 2^4 para extração das collagenase em SDFA.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (- 1)	Central (0)	Superior (+ 1)
Massa molar do PEG (g/mol)	1500	4000	8000
Concentração do PEG %	12,5	15	17,5
pH	6	7	8
Concentração do fosfato %	10	12,5	15

Tabela 2- Níveis das variáveis utilizadas no primeiro planejamento 2² para extração das collagenase em SDFA com concentração do PEG de 12,5% e concentração de fosfato de 10%.

Variáveis	Níveis		
	Inferior (- 1)	Central (0)	Superior (+ 1)
Massa molar do PEG (g/mol)	4000	8000	10.000
pH	7	8	9

2.6 Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento em atividade

O coeficiente de partição foi calculado pela razão entre a atividade volumétrica na fase superior e na fase inferior.

$$K = \frac{A_s}{A_i} \quad (1)$$

Onde: A_s e A_i são as atividades das collagenases (U/ml) nas fases superior e inferior, respectivamente.

O fator de purificação foi calculado pela razão da atividade específica da amostra na fase inferior e a atividade específica no extrato bruto.

$$P_f = \frac{\frac{A_i}{C_i}}{\frac{A_{EB}}{C_{EB}}} \quad (2)$$

Onde o A_i e A_{EB} são as atividades enzimáticas em U/ml na fase inferior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; C_i e C_{EB} são as concentrações de proteína total em mg/ml da fase inferior e extrato bruto, respectivamente.

O rendimento em atividade das collagenases foi determinado pela razão entre a atividade volumétrica das fases multiplicada pelos seus volumes e atividade volumétrica na fase inferior multiplicada pelo seu volume no extrato bruto.

$$Y = \left(\frac{A_I \times V_I}{A_{EB} \times V_{EB}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde o A_I e A_{EB} são as atividades enzimáticas em U/ml na fase inferior e no extrato bruto (antes da partição), respectivamente; V_I e V_{EB} são os volumes da fase inferior e do extrato bruto em ml, respectivamente [20].

2.7 Determinação da atividade collagenolítica

A detecção da atividade collagenolítica foi medida usando uma modificação do método desenvolvido por Chavira *et al* [29]. O azocolágeno (*Azocoll*[®], Sigma, St. Louis MO USA) foi suspenso em solução tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,2), para a concentração final de 5 mg/ml. Posteriormente, 150µl da amostra (extrato enzimático) e 150µl do tampão Tris- HCl (0,1M, pH 7,2), foram misturados com 270µl da solução do *Azocoll*[®] e mantidos em banho-maria por 18h à 37°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas à 10.000 xg por 15 min à 4°C. A absorbância da solução sobrenadante foi medida em 520 nm usando um espectrofotômetro (Micronal B582). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima por ml que produz um aumento na densidade ótica de 0,1 em 18h em 520 nm. Atividade específica foi calculada como a razão entre a atividade enzimática (U) e da proteína total na amostra (mg/ml) e expressos em U/mg.

2.8 Determinação do conteúdo protéico

As dosagens das proteínas foram realizadas através do método de Bradford [30] modificado, que utiliza como corante o "Coomassie Brilliant Blue", para detectar quantidades mínimas de proteínas em líquidos biológicos. A curva de calibração foi feita a partir de soluções estoques de soroalbumina bovina em diferentes concentrações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento fatorial 2⁴

Foi realizado um planejamento experimental completo 2⁴, onde variáveis que influenciam o sistema de duas fases aquosas, foram estudadas. Foram escolhidas quatro variáveis, descritas na literatura como importantes para o SDFA (massa molar do PEG, concentração do PEG e do sal e pH).

Os resultados dos ensaios de extração de collagenases obtidos foram analisados estatisticamente e estão representados na Tabela 3, sendo coeficiente de partição, recuperação e aumento de pureza as respostas mais importantes, por isso foram utilizadas para a análise da eficiente extração das collagenases pelo *Streptomyces* DPUA 1559.

Os testes que não formaram duas fases aquosas (Tabela 3, ensaios 1 e 5) são encontrados abaixo da curva binodal obtidos com PEG 1500 g/mol. Concentrações abaixo da curva binodal para PEG 1500 foram selecionados para este estudo porque as concentrações para a formação de fases deste sistema são muito elevadas, o que aumentaria a viscosidade do PEG 8000, e afetaria a extração de collagenases. Portanto, sistemas com PEG 1500 não formaram fases.

O coeficiente de partição (K) é uma grandeza adimensional importante para a análise de um sistema bifásico. Ele indica para que lado uma biomolécula de interesse particionou. Valores elevados de K (>1) indicam que a biomolécula particionou mais para a fase PEG e valores baixos de K (<1), vai indicar que a biomolécula particionou mais para a fase sal. O valor de K não indica se a biomolécula foi purificada, pois junto à biomolécula de interesse, os contaminantes presentes no meio podem também ter particionado juntamente [14].

Tabela 3. Condições e resultados do planejamento experimental 2⁴ escolhido para a extração de collagenase por PEG / fosfato em SDFA.

Ensaio	M _{PEG} ^a	C _{PEG} ^b	pH	C _{FOS} ^c	K ^d	Y _{PEG} ^e	Y _{FOS} ^f	PF ^g
1	1500	12,5	6	10,0	-	-	-	-
2	8000	12,5	6	10,0	0,29	23,0	75,6	0,65
3	1500	17,5	6	10,0	0,82	67,0	35,9	0,66
4	8000	17,5	6	10,0	0,44	36,0	56,9	0,55
5	1500	12,5	8	10,0	-	-	-	-
6	8000	12,5	8	10,0	0,36	49,1	167,2	2,53
7	1500	17,5	8	10,0	0,08	8,6	73,5	1,27
8	8000	17,5	8	10,0	0,49	67,4	122,2	1,32
9	1500	12,5	6	15,0	1,44	27,3	23,5	0,43
10	8000	12,5	6	15,0	0,85	37,5	64,1	0,70
11	1500	17,5	6	15,0	3,00	77,7	23,9	0,24
12	8000	17,5	6	15,0	3,33	69,2	20,8	0,22
13	1500	12,5	8	15,0	0,98	61,6	87,7	1,08
14	8000	12,5	8	15,0	1,22	62,4	85,6	0,95
15	1500	17,5	8	15,0	2,22	63,6	28,7	0,54
16	8000	17,5	8	15,0	2,81	96,7	37,3	1,55
17 ^h	4000	15,0	7	12,5	0,44	46,5	114,3	0,82
18 ^h	4000	15,0	7	12,5	0,74	78,6	106,8	0,86
19 ^h	4000	15,0	7	12,5	0,56	54,1	96,1	0,65
20 ^h	4000	15,0	7	12,5	0,41	58,7	143,2	1,14

^aMassa molar do PEG (g/mol); ^bConcentração do PEG (%); ^cConcentração de fosfato (%); ^dCoeficiente de partição; ^eRendimento da atividade na fase superior (%); ^fRendimento da atividade na fase inferior (%); ^gFator de purificação na fase inferior; ^hRepetição do ponto central – não formação de sistema bifásico.

Na Tabela 3, mostra que na maioria das condições estudadas as collagenases migraram na fase sal. Em todos os seis ensaios onde as collagenases migraram para a fase PEG (ensaios 9, 11, 12, 14, 15 e 16), os sistemas foram constituídos pelas maiores concentrações de sal. Isso indica que as collagenases particionaram para a fase PEG devido à ocorrência de um efeito denominado de *salting out* onde, com o aumento da concentração de sal ocorre uma disputa dos íons sal e das proteínas pela água, fazendo com que as proteínas prefiram a fase rica em PEG devido à força de repulsão causada pela presença do sal [31-32].

O fenômeno de *salting out* foi também observado por Porto et al [33] quando utilizaram o SDFA PEG/citrato para particionar lectina produzida a partir de sementes de

Canavalia grandiflora e observaram que a enzima foi mais transferida para a fase PEG em valores de concentrações maiores de sal. O efeito *salting out*, porém, vai depender do tipo de sal utilizado no sistema, pois irá depender da tendência de seus íons de se tornarem hidratados. Os íons do eletrólito adicionado irão desidratar a proteína hidrofílica, competindo pela sua água de hidratação [34].

Nos demais ensaios, onde as collagenases particionaram mais para a fase sal, verifica-se que foram os que tiveram menores concentrações de sal. Esses resultados corroboram com os obtidos por Rosso et al. [35] que ao utilizarem o SDFA para extrair collagenase a partir de *Penicillium aurantiogriseum*, obtiveram um maior particionamento da enzima para a fase inferior rica em sal fosfato.

A Tabela 4 mostra os efeitos das quatro variáveis, assim como as interações entre elas. Os efeitos principais, da concentração de PEG (2), pH (3) e da concentração de fosfato (4), foram os mais significativos para o coeficiente de partição.

A interação entre as variáveis, concentração de fosfato e concentração de PEG (2*4) apresentou efeito significativo e positivo, indicando que o aumento simultâneo de ambas variáveis proporcionou um aumento do coeficiente de partição. Quando uma interação é significativa entre duas ou mais variáveis, indica que uma variável não atua sozinha sobre as respostas, seu efeito dependerá da outra variável. Este efeito de interação foi evidenciado no gráfico de interpretação geométrica (Figura 1).

Os resultados dos efeitos das variáveis envolvidas na interação são mais bem interpretados utilizando o diagrama de interpretação geométrica. A Figura 1 mostra a interação existente entre as variáveis, concentração de fosfato e concentração de PEG (2*4). Nota-se que ocorreu aumento no coeficiente de partição (K) com o aumento da concentração de fosfato e com o aumento da concentração de PEG, o que não é interessante para a extração neste trabalho, pois as collagenases tiveram uma maior partição para a fase sal.

Tabela 4. Efeitos estatísticos para respostas de acordo com o planejamento experimental 2⁴.

Variáveis	K ^a	Y ^b	PF ^c
1 (M _{PEG}) ^d	2,08	4,41*	5,26*
2 (C _{PEG}) ^e	13,62*	-1,29	-0,002
3 (pH) ^f	-3,38*	3,73*	7,2*
4 (C _{PHOS}) ^g	22,574*	-1,97	-1,57
1*2 ^h	1,10	-2,55	-2,95
1*3 ^h	3,29*	1,09	3,32*
2*3 ^h	-3,32*	-0,65	0,29
1*2*3 ^h	0,28	-0,116	-0,37
1*4 ^h	-0,16	-3,32*	-2,48
2*4 ^h	9,62*	-2,42	-1,54
3*4 ^h	-1,28	-1,08	-0,90
2*3*4 ^h	-0,77	-0,93	1,52
1*2*4 ^h	3,23*	1,73	5,08*
1*3*4 ^h	0,39	-1,85	-1,75

^aCoefficiente de partição; ^bRendimento da atividade; ^cFator de purificação; ^dMassa molar do PEG; ^eConcentração de PEG; ^fpH; ^gConcentração de fosfato; ^hInterações entre as variáveis. Valores estatisticamente significativos à um nível de confiança de 95%.

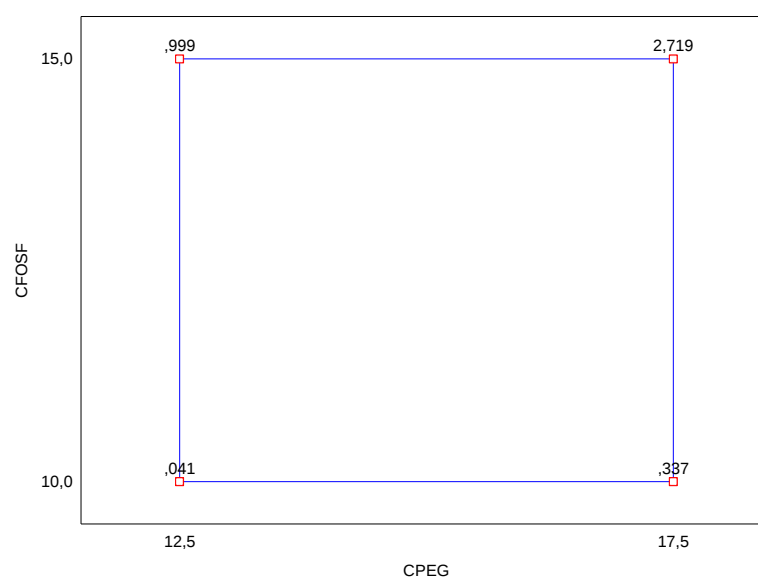


Figura 1. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos concentração do PEG e concentração de fosfato, tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K).

O pH foi uma das variáveis que também teve um efeito significativo para o coeficiente de partição (Tabela 1). Esse efeito foi negativo o que indicou que quanto maior o valor do pH, menor será o valor de K. A partição de proteínas, em um sistema bifásico, é um fenômeno influenciado principalmente pelas características da biomolécula em questão e também dos componentes que formam o sistema [14].

Para a variável rendimento na fase inferior do sistema, a massa molar do PEG(1) e pH(3) foram as variáveis de primeira ordem que apresentaram efeitos significativos. A massa molar de PEG foi o efeito que mais se destacou como significativo dos efeitos principais. O seu efeito positivo indicou que quanto maior a massa molar do PEG, maior foi o valor do rendimento em atividade das collagenases.

O que pode ter levado a um aumento no valor do rendimento em sistemas com maiores valores de massa molar do PEG foi devido à possível ocorrência do efeito de volume de exclusão, onde o volume ocupado pelo polímero aumenta com o aumento da massa molar, levando a uma diminuição na quantidade de espaço disponível para as moléculas na fase superior. Nesse fenômeno, as biomoléculas tem a tendência de partição para a fase inferior [14]. As características hidrofóbicas dos contaminantes podem ter interagido melhor com a fase superior rica em PEG levando a uma melhora na atividade das collagenases presentes na fase inferior do sistema.

O pH foi outra variável significativa para o rendimento com efeito positivo, indicando que com o aumento do pH proporcionou um aumento no rendimento (Y). Lembrando que o efeito do pH no coeficiente de partição teve um efeito negativo, pode-se concluir que com o aumento do pH, os contaminantes podem ter adquirido uma carga negativa sendo mais atraídos para a fase PEG. As collagenases podem ter pontos isoelétricos iguais ou superiores ao valor do pH testado o que fez com que elas permanecessem com carga positiva ou até mesmo com carga nula, consequentemente, as enzimas permaneceram na fase sal.

A única interação que mostrou efeito significativo para o rendimento (Y) foi o da massa molar do PEG e concentração de fosfato (1*4) e este efeito de interação foi evidenciado no gráfico de interpretação geométrica. A Figura 2 mostra a interação existente entre massa molar do PEG e concentração de fosfato. Nota-se que ocorreu uma diminuição do rendimento (Y) indicando um efeito antagônico destas duas variáveis. Nesta interação é indicado que é necessário aumentar a massa molar de PEG para que haja o efeito de exclusão e diminua a concentração de sal para que não haja o efeito *salting out* e com isso a biomolécula fique na fase sal, levando a uma melhora no rendimento.

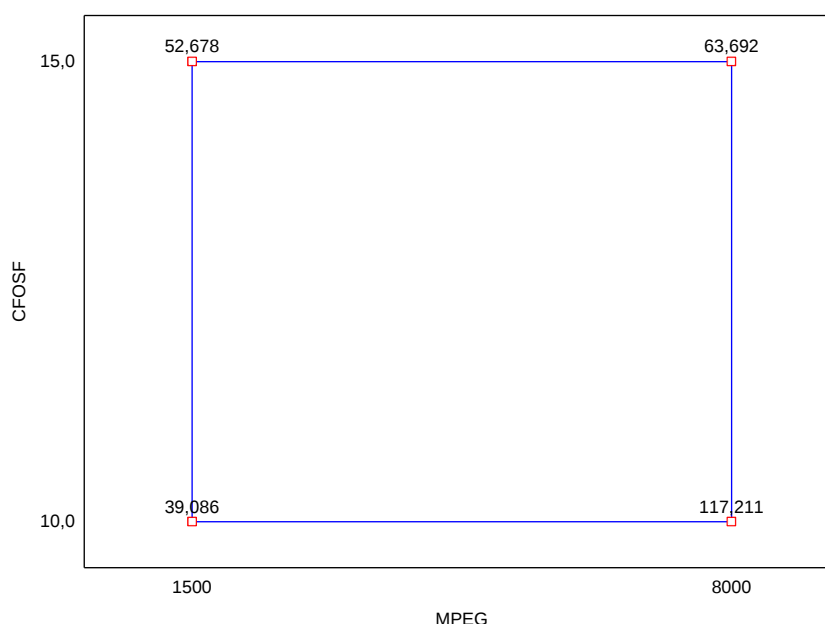


Figura 2. Diagrama de interpretação geométrica dos efeitos massa molar do PEG e concentração de fosfato, tendo como variável resposta o rendimento (Y).

O melhor resultado de rendimento para as collagenases foi de 167,2%, encontrado no ensaio com menor valor de concentração de PEG (2) e concentração de fosfato (4). Valores acima de 100% também foram encontrados durante a extração de collagenases por *Penicillium aurantiogriseum* em sistema PEG/fosfato por Rosso et al. [35]. Rendimentos maiores de 100% são comuns e pode ser explicados pela eliminação de inibidores durante o processo de purificação e pela composição do sistema, que poderia favorecer a atividade enzimática [36].

Para a variável fator de purificação, os efeitos estatisticamente mais relevantes foram pH (3) e massa molar do PEG (1), onde aumentando estas variáveis ocasionou a elevação no FP, mostrando a importância do efeito de volume excluído no fator de purificação quando se aumenta a massa molar do PEG. Também o aumento do pH pode aumentar a carga negativa dos contaminantes como explicado no item 3.1.2, levando a uma maior partição destes para a fase superior do sistema levando a um aumento do fator de purificação. O maior valor de FP encontrado foi de 2,53 (ensaio 6 na Tabela 4).

A melhor combinação das variáveis independentes para a extração de collagenases pelo sistema PEG/fosfato foi a do sistema constituído de massa molar do PEG (8000g/mol), concentração de PEG (12,5%), concentração de fosfato (10%) e pH (8) o qual apresentou coeficiente de partição de 0,36, rendimento da atividade de 167,2% e fator de purificação de 2,53. Estas condições foram selecionadas para o segundo planejamento, o qual buscou determinar as melhores condições de extração.

3.2 Planejamento fatorial 2²

Um segundo planejamento experimental 2² foi realizado para investigar a região perto da melhor condição do primeiro planejamento (Tabela 5). Foram fixados os valores de concentração de PEG e concentração de fosfato e variado os valores de massa molar do PEG e pH.

Os resultados mostraram que a única variável que influenciou significativamente foi massa molar do PEG com relação ao coeficiente de partição, sendo o efeito positivo (Tabela 6). Isso mostra que aumentando a massa molar do PEG, há uma tendência a aumentar o coeficiente de partição. Para o rendimento e fator de purificação nenhuma variável foi significativa, indicando que nenhuma variação nos níveis das variáveis melhorou a extração

das collagenases. A melhor condição para a extração de collagenases por este SDFA PEG/fosfato permaneceu sendo nas condições correspondentes aos ensaios do ponto central.

Tabela 5. Condições e resultados do delineamento experimental 2^2 escolhido para a extração de collagenase por PEG / fosfato em SDFA.

Ensaio	M _{PEG} ^a	pH	K ^b	Y ^c	PF ^d
1	4000	7	0,57	148,3	1,24
2	10000	7	1,60	68,9	0,58
3	4000	9	0,58	200,9	1,85
4	10000	9	0,82	154,4	1,14
5 ^e	8000	8	0,57	136,5	2,46
6 ^e	8000	8	0,50	181,5	2,10
7 ^e	8000	8	0,39	151,3	2,51
8 ^e	8000	8	0,21	181,5	3,08

^aMassa molar do PEG (g/mol); ^b Coeficiente de partição; ^cRendimento da atividade (%);

^dFator de purificação da fase inferior; ^eRepetição do ponto central.

Tabela 6. Cálculos dos efeitos estatísticos para as respostas de acordo com o planejamento experimental 2^2 .

Variáveis	K ^a	Y ^b	PF ^c
1 (M _{PEG}) ^d	4,08*	-2,79	-1,6
2 (pH) ^e	-2,47	3,06	1,4
1*2 ^f	-2,55	0,73	-0,05

^aCoeficiente de partição; ^bRendimento da atividade; ^cFator de purificação; ^dMassa molar do PEG; ^epH; ^fInterações entre as variáveis. Valores estatisticamente significativos à um nível de confiança de 95%.

CONCLUSÕES

O uso do planejamento fatorial permitiu não só a identificação das variáveis que influenciam na extração de collagenases pelo sistema de duas fases aquosa PEG/fosfato, como também suas interações visando melhorar a extração de collagenase pelo extrato bruto produzido por *Streptomyces* sp DPUA1559.

Os melhores resultados de extração (coeficiente de partição 0,36, o rendimento de atividade de 167,2% e fator de purificação de 2,53) foram obtidos por meio de 12,5% (m /m) de PEG 8000, 10,0% (m /m)) fosfato e pH 8,0. Os resultados demonstraram que o SDFA PEG/fosfato foi seletivo para as collagenases em estudo que tiveram uma maior afinidade pela fase rica em sal.

REFERÊNCIAS

1. Handy, H.S (2008) Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*: Production, purification and characterization. Indian j biotechnol. v: 333-340.
2. Hu, Y., Webb, E., Sing, J., Morgan, B and Gainor, J (2002) Rapid determination of substrate specificity of *Clostridium histolyticum* β -collagenase using na immobilized peptide library. The J. Biol Chemistry. 277: 8366-8371.
3. Tran, L.H and Nagano, H (2002) Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. J. H. Econom Japan. 12:1083-1187.
4. Coelho, M.A.Z., Salgado, A.M and Ribeiro, B.D (2008) Tecnologia enzimática, Editora EPUB, Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ.
5. Cheng, H., Sun, G and Guan, Z (1999) Experimental study clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars. Z. zheng xing wai ke zhi. 15:202-205.

6. Hoyama, E., Schellini, S.A., Pellizon, C., Marques, M.E.A., Padovani, C.R. and Rossa, R (2005) Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. A. brasileiros de dermatol. 80.
7. Sukhosyrova, E.A., Nikitina, Z.K., Yakovleva, M.B., Veshchikova, E.V and Bykov, V.A (2003) Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. Immunol microbiol. 135:526-530.
8. Lima, C.A., Rodrigues, P.M.B., Porto, T.S., Viana, D.A., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F and Cunha, M.G.C (2008) Production a collagenase from *Cândida albicans* URM3622. Biochemical Eng J. 43:315-320.
9. Krepel, C.J., Gohr, C.M., Walker, A.P., Farmer, S.G and Edmiston, C.E (1992) Enzymatically active *Peptostreptococcus magnus*: association with site of infection. J. of clinical microbial. 30:2330-2334.
10. Kang, S.I., Jang, Y.B., Chol, Y.J and Kong, J.Y (2005) Purification and properties of a collagenolytic protease produced by marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H. Biotechnol bioprocess eng, 10:593-598.
11. Petrova. D., Derekova, A and Vlahov, S (2006) Purification and Properties of Individual Collagenases from *Streptomyces* sp. Strain 3B. Folia Microbiol. 51:93–98.
12. Sakurai, Y., Inoue, H., Nishii, W., Takahashi, T., Iino, Y., Yamamoto, M. and Takahashi, K (2009) Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. Biosc Biotechnol Biochem. 73:21-28.
13. Costa, S. A., Pessoa-Jr., A and Roberto, I. C (2000) Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. J. Chromatog B. 743:339-348.
14. Pessoa-Jr A and Kilikian, B.V (2005) Purificação de produtos biotecnológicos. Editora Manole, São Paulo, Brasil, p. 176 – 279.

15. Zimmer, K.R., Borre, G.L., Trentin, D.S., Junior, C.W., Frasson, A.P., Graeff, A.A., Gomes, P and Macedo, A.J (2009) Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. R. Liberato. 10:123-137.
16. Shanchang, V.P and Alxelsson, C.G (1976) J. Biochem. 60:17-22.
17. Rabelo, A., Tambourgi, E and Pessoa-Jr, A (2004) Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. J. of chromatog B. 807:61-68.
18. Pico, G., Romanini, D., Nerli, B and Farruggia, B (2006) Polyethyleneglycol molecular mass and polydispersivity effect on protein partitioning in aqueous two-phase systems. J. Chromatog B. 830:286-292.
19. Porto, T.S. (2004) Extração da pró-toxina Épsilon e de uma protease a partir de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/ citrato. Ph.D. Dissertação. Universidade Federal de São Paulo, USP, São Paulo.
20. Cavalcanti, M.T.H., Porto, T.S., Neto, B.B., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F and Pessoa-Jr, A (2006) Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. J. Chromatog B. 833:135-140.
21. Imelio, A., Marini, A., Spelzini, D., Pico, G and Farruggia, B (2008) Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: Moléculas mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio. J. Chromatog B. 873:133-138.
22. Naganagouda, K and Mulimani, V.H (2008) Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. Process biochemistry. 43:1293-1299.
23. Ling, Y, Q., Nie, H. L., Su, S.N., Branford-White, C and Zhu, L.M (2010) Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology. Sep. purify technol. 73:343-348.

24. Tubio, G., Pico, G.A and Nerli, B.B (2009) Extraction of tripsin from bovine pâncreas by applying polyethyleneglicol/sodium citrate aqueous two-phase systems. *J. Chromatog B.* 877:115-120.
25. Castellani, A (1967), In: *Guia prático para fungos fitopatogênicos* (Menezes, M e Assis, S.M.P., ed), 2 edição, editora: Imprensa universitária da UFPE, pp. 79-80.
26. Pridham, T. G., Aderson, P., Foley, C., Lindenfelser, L. A., Hesseltine, C. W and Benedict, R.G, A (1957). *Antibiotics Manual.* 947-953.
27. Nickerson, W.J and Mohan, RR (1953). *International Comgress of Microbiology*, 6º Congress, Roma, p 137-146.
28. Barros Net, B., Scarminio, I.C and Bruns, R.E. (2002) *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.* Editora da Universidade de Campinas- UNICAMP, Campinas, SP, 2ª Ed, p. 401.
29. Chavira, R.J., Burnett, T.J and Hageman, J.H (1984). *Anal Biochem.* 136:446-50.
30. Bradford, M. M. A (1976) rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
31. Trindade, I.P., Diogo, M.M., Prazeres, D.M.F and Marcos, J.C (2005) Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chrom. *J. Chromatog A.* 1082:176-184.
32. Leuchau, F., Ling, T.C and Lyddiatt, A (2009) Selective partition of plasmid DNA and RNA in aqueous two-phase systems by the addition of neutral salt. *Sep. Purif. Technol.* 68:114-118.
33. Porto, C.S., Porto, T.S., Nascimento, K.S., Teixeira, E.H., Cavada, B.S., Lima-Filho, J.L and Porto, A.L.F (2011) Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. *Biochem Eng J.* 53:165–171.

34. SHAW, D.J. (1992) Introduction to colloid and surface chemistry, 4th Ed, London.
35. Rosso, B.U., Lima, C.A., Porto, T.S., Nascimento, C.O., Pessoa-Jr, A., Porto, A.L.F and Cunha, M.G.C (2009) Collagenase partitioning in poly (ethylene glycol) phosphate aqueous two-phase system. XVII Simpósio nacional de bioprocessos, RN/Natal.
36. Mayerhoff, Z., Roberto, I and Franco, T (2004) Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. Biochemical engineering journal, v.18, p. 217-223.

5 – CONCLUSÕES FINAIS

Após a realização dos experimentos, foi possível concluir que:

- Entre as cepas de *Streptomyces* spp estudadas, a do *Streptomyces* sp. DPUA 1559 foi à cepa que com maior atividade colagenolítica;
- O melhor tempo para a produção de collagenase por *Streptomyces* sp DPUA 1559 nas condições de 200rpm, 28°C, 1,0% da concentração de substrato (gelatina) e pH 6.0 foi de 72h;
- A análise do planejamento estatístico 2^4 demonstrou que todas as variáveis estudadas (Temperatura, agitação, concentração de substrato e pH), influenciaram na produção de collagenase por *Streptomyces* sp. DPUA 1559;
- Os melhores resultados para a produção de collagenases em cultura submersa foram obtidos quando se utilizou uma agitação de 100 rpm, pH 6.0, temperatura de 28 °C e 1,5% de concentração de substrato;
- As collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 apresentaram atividade máxima em pH 8,0 e temperaturas de 37°C e 50 °C;
- As collagenases mostraram-se estáveis na faixa de pH entre 7,0-9,0 e em toda a faixa de temperatura estudada por 5h;

- As collagenases produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 foram totalmente inibidas pela ação dos inibidores PMSF e pepstatina e estes resultados sugerem que as collagenases pertencem ao grupo das serino e aspártico proteases;
- O perfil eletroforético do extrato bruto apresentou proteínas com massas moléculas entre 48, 45, 43, 30 e 23kDa e o zimograma demonstrou várias bandas com atividade proteolítica: 108, 64, 57, 48, 45 e 43kDa.
- Os melhores resultados de extração de collagenases em SDFA produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1559 (coeficiente de partição 0,36, o rendimento de atividade de 167,2% e fator de purificação de 2,53) foram obtidos por meio de 12,5% (w / w) de PEG 8000, 10,0% (w / w) fosfato e pH 8,0, mostrando que o SDFA PEG/fosfato foi seletivo para as collagenases em estudo que tiveram uma maior afinidade pela fase rica em sal.
- *Streptomyces* sp. DPUA 1559 demonstrou grande potencial como produtor de collagenases o que pode ser de grande interesse para o mercado enzimático.

6 – ANEXOS

6.1 Normas da revista **Applied Biochemistry and Biotechnology**.



Fator de impacto: 1.42

Submissions may be made online using Springer's Editorial Manager electronic submission site at <http://abab.edmgr.com>. First-time users will need to Register before submitting a manuscript. If you experience any problems, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

Manuscripts

- Type manuscript in English, double-spaced on numbered pages with 1- to 1.5-inch margins. Please prepare the article as a Microsoft Word document. See the Computer Graphics section for figure specifications.
- A cover letter must accompany the submission giving the rationale for publication in Applied Biochemistry and Biotechnology, particularly with respect to the originality, scientific merit and importance to the field of Applied Biochemistry and Biotechnology. Author(s) also are required to provide names and contact information (mailing address, phone and fax numbers, and e-mail address) of at least three experts in the field as potential reviewers for the manuscript. Please do not suggest anyone who may have a conflict of interest in reviewing your manuscript, such as former advisors, students, or recent collaborators.

Abstracts

Abstracts should be 100–200 words.

Index Entries

Include 5–10 index entries/key words.

Artwork

- Number figures consecutively with Arabic numerals, callouts (if any) should be lowercase letters. Include figure captions. All figures must be cited in text; figures will be placed as close as possible to the first text citation.

Include figure captions on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. All illustrations, including chemical structures, must be provided in professional-quality, finished form ready for direct reproduction without revision by us.

- Photographs should be of high quality and with strong contrasts to withstand some reduction. Please indicate the magnification by a rule on the photograph. Additional specifications apply regarding Computer Graphics and Color Art.
- Computer Graphics: If your submission includes Computer Graphics, acceptable software formats are: Adobe Illustrator and Adobe Photoshop v5 and up. File formats are as follows: EPS (Encapsulated Postscript), TIFF, JPEG (high-quality, low-compression) and those native software formats listed above. Unfortunately we cannot accept Microsoft PowerPoint files at this time. dpi specifications: line art should be no less than 1200 dpi; halftone scans should be 300 dpi.
- Color Art: Color art cannot be accepted unless the author is willing to assume the additional production costs involved; quotes given on request.

Nomenclature

Authors should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. All abbreviations should be fully defined in the text.

Tables

Type on separate pages. Number consecutively with Arabic numerals in order of mention in the text. Provide titles for all tables.

References

Cite in the text by italic Arabic numerals in parentheses, set on the text line, numbered in the order they appear. List at the end of the paper in consecutive order. Please follow the style indicated below:

- Journal reference: 1. Haselbeck, A. and Hösel, W. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 42, 207–219.
- Chapter in book: 2. Gastra, W. (1984), in Methods in Molecular Biology, vol. 2: Nucleic Acids (Walker, J. M., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 333–341.
- Book reference: 3. Franks, F. (1993) Protein Biotechnology, 2nd ed., Humana, Totowa, NJ.

- Report/Document: 4. Macgregor, S. (1993), PhD thesis, University of Hertfordshire, Hatfield, UK.
- Online: 5. Cancer Facts and Figures 2006. Available from: www.cancer.org. Accessed December 31, 2006.

Page Charges

There are NO page charges for accepted articles.

Reprints

Reprints and/or a final PDF file are available to authors at standard rates when ordered prior to publication.

6.2 Normas da revista Folia microbiologica.



Fator de impacto: 0,978

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

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. 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

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

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.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- Word template (zip, 154 kB)

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 before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:
 Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
 Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
 Bold for vectors, tensors, and matrices.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. 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 et al. 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

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- 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

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

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

- EndNote style (zip, 3 kB)

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.

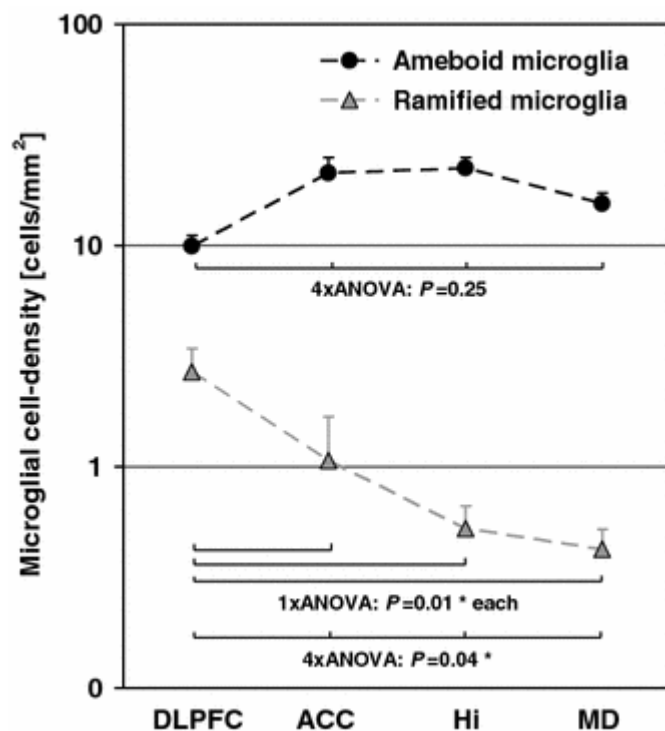
ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

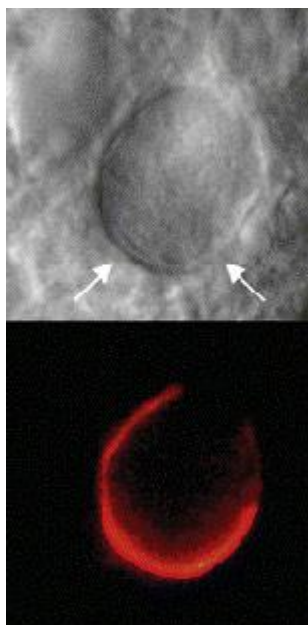
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the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

Line Art



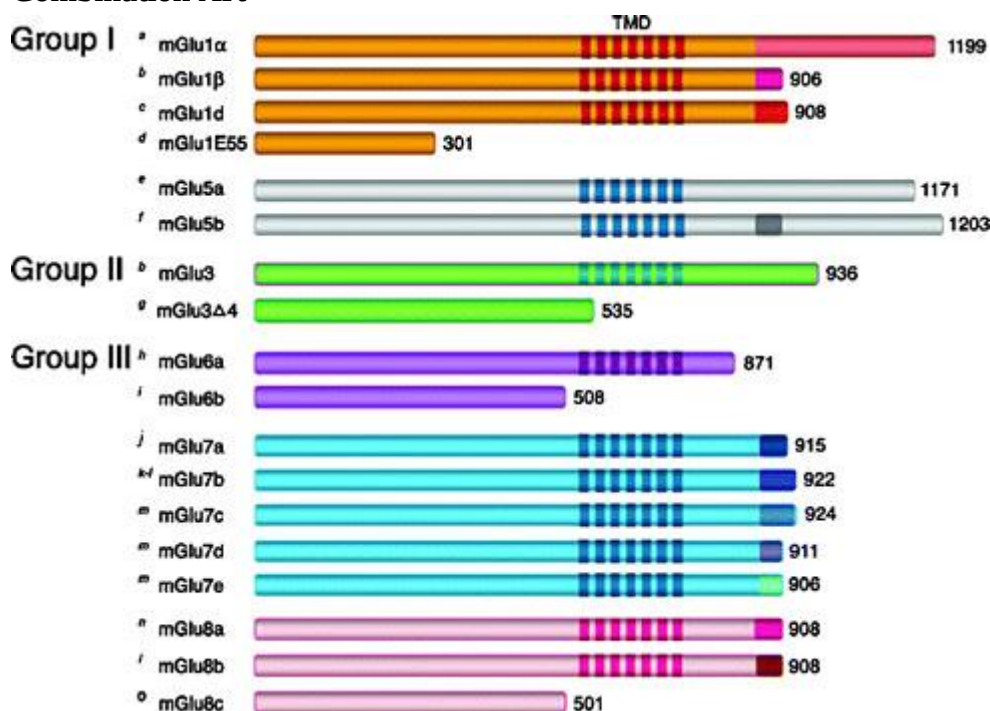
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should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

- 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 (color-blind 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

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

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), .wrl (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)

INTEGRITY OF RESEARCH AND REPORTING

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: 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 and offprints. 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 now 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 Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- 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, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Color figures will always be published in color in the online version. In print, however, they will appear in black and white.

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.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

6.3 Normas da revista **Biotechnology and Bioprocess Engineering.**



Fator de impacto: 1.004

TYPES OF MANUSCRIPTS

Research Articles are research reports of new findings. These papers should not exceed 30 double-spaced pages of text (not including the title and reference pages) and contain a precise description and interpretation of research. Reviews are critical assessments of relevant topics of contemporary interest. These papers should not exceed 60 double-spaced pages of text.

RESEARCH ARTICLES

Title Page

The title page of the article should be followed in the order of title, the authors's name and affiliations and the full correspondence address including telephone, fax, e-mail, etc. The main title should be concise, descriptive and informative to the subject of manuscript and should not exceed more than 150 characters. The running title should be restricted to 50 characters.

Abstract and Keywords

Provide an abstract which states concisely the objectives and the results of the paper in not

more than 250 words. It must be a brief and factual account of contents, conclusions, and relevance of the findings with an emphasis on what readers will gain from the manuscript. Do not cite any reference in the abstract. A list of 4-6 keywords for a subject index should be included on this page.

Text Body

(1) The recommended format and the capitalization styles of major headings are as follows: Abstract, Keywords,

INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS AND DISCUSSION, CONCLUSION, Acknowledgements, NOMENCLATURE, REFERENCES.

(2) Leave a space between word and parenthesis. Special words of Latin or French origin should be in italic (e.g., *in vitro*, *et al.*).

(3) References to published work should be indicated at the appropriate place using brackets (e.g., [2,6-8]), numbered consecutively, and a list of references in numerical order should be provided at the end of the manuscript.

(4) Sources of materials and instruments should be clearly presented together with the names of the appropriate cities and countries.

(5) Units: The SI system should be used for all dimensional quantities. Leave a space between numbers and units except °C and % (e.g., 40 mg/l, 50%, 10 h).

(6) Equations and symbols: Main symbols used in equations and text should be in italic. Superscripts and subscripts should not (e.g., $Deff$, kLa , Yx/s). Equations must be numbered consecutively using Arabic numbers.

(7) Tables: Type each table on a separate sheet of paper. The table title should have the first letter of the first word capitalized. Details of all necessary additional information can be included in the table footnotes. Preferred font is Arial or Times New Roman with 10 or 12 pt. Table should not contain vertical linings and the captions should be understandable without referring the text.

(8) **Figures:** Graphs, figures, and other illustrations should be drawn on separate sheets of paper. The uniformity in size of the figures should be maintained carefully. BBE encourages both gray and color illustration as TIFF/EPS files. Use 600 dpi/1200 dpi for illustrations for better clarity. When a figure consists of more than one plot, designate each plot as (A), (B), (C), etc. on the upper left-hand side of the plot and refer to it in the text as Fig. 4(A), Fig. 4(B), etc. All figures and lettering must be of a size which remain legible after a 50% reduction of the original. In the figure caption, only the first letter of the first word in each sentence should be capitalized. Photographs will be accepted if essential to the paper, though an additional charge will be levied. A list of figure captions including explanations of legends should be supplied on a separated sheet at the end of the manuscript.

(9) **Nomenclature:** Symbols used in the text or in equations should be collated and identified with definitions and dimensions. The SI system should be used for all dimensional quantities. Roman symbols are first listed alphabetically, then followed by Greek symbols, superscripts, and subscripts.

References

All references in this list should be cited at some point in the text. Abbreviate the journal titles as in Chemical Abstracts or Biological Abstracts. References should be presented in the following style :

(1) Journal Articles

Wu, Y. M., V. Kumaran, D. Benten, and S. Gupta (2007) Potential of bioengineering processes for therapeutic re-population of the liver with cells. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 1-8.

(2) Books

Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., pp. 23-38. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

(3) Edited Books

Hamer, G. (1985) Chemical engineering and biotechnology. pp. 356-368. In: I. J. Higgins, D. J. Best, and J. Jones (eds.). *Biotechnology: Principles and Applications*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.

(4) Proceedings/Abstracts

Meyer, H. P., H. J. Kuhn, S.W. Brown, and A. Fiechter (1984) Production of human

leucocyte interferon by E. coli. Proceedings of 3rd European Congress on Biotechnology. September 10-14. Munich, Germany.

(5) Dissertations

Han, K. (1992) A Study of Acetic Acid Formation in Escherichia coli Fermentation. Ph.D. Thesis. University of California, Irvine, CA, USA.

(6) Patents

Prudden, J. F. (1977) Method and agent for treating inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. US Patent 4,006,224.

(7) Web URL

Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Submission of manuscript. <http://bbe.or.kr>.

Note: Manuscripts in which references are not in this format will be returned without review.

REVIEWS

Reviews are critical assessments of relevant topics of contemporary interest. Reviews should have a short title and descriptive subtitles. It should present novel ideas and interpretations of established observations. These papers should not exceed 60 double-spaced pages of text. Review articles are commissioned by the Editor and authors desire to submit review articles should consult with the Editor beforehand. Reviews should have a title page, abstract, and references in the same style as Research Articles. The main body should be sectioned at the author's discretion.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of an article is understood to imply that the article is original and unpublished and is not being considered for publication elsewhere. All papers will be critically read by three reviewers who will be selected for their competence in the subject of matter of the paper.

BBE encourages the electronic submission of the manuscripts via on-line submission system (<http://www.editorialmanager.com/bben>). The cover letter for submission should include names and addresses of authors, the manuscript title, e-mail address and the phone/fax

numbers of the corresponding author, and a brief statement upon the significance of the submitted article. Submitting manuscript can be supplied as an attached file, which is prepared by a popular word processor (Microsoft Word is recommended). Manuscripts should be typed double-spaced on A4 format. In addition, authors should provide a list of three potential reviewers (names/e-mail), none of whom should be affiliated with the authors' institution(s).

COPYRIGHT

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis); that it is not under consideration for publication elsewhere; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as – tacitly or explicitly – by the responsible authorities at the institution where the work was carried out. The author warrants that his/her contribution is original and that he/she has full power to make this grant. The author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors. Transfer of copyright to the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer becomes effective if and when the article is accepted for publication. After submission of the Copyright Transfer Statement signed by the corresponding author, changes of authorship or in the order of the authors listed will not be accepted by the Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer. The copyright covers the exclusive right (for U.S. government employees: to the extent transferable) to reproduce and distribute the article, including reprints, translations, photographic reproductions, microform, electronic form (offline, online) or other reproductions of similar nature.

An author may self-archive the English language version of his/her article on his/her own website and his/her institution's knowledge is given to the original source of publication and a link must be accompanied by the following text: "The original publication is available at springerlink.com".

All articles published in this journal are protected by copyright, which covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article (e.g., as offprints), as well as all translation rights. No material published in this journal may be reproduced photographically or stored on microfilm, in electronic data bases, video disks, etc., without first obtaining written permission from the publishers. The use of general descriptive names, trade names,

trademarks, etc., in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal is believed to be true and accurate at the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publishers can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Special regulations for photocopies in the USA: Photocopies may be made for personal or in-house use beyond the limitations stipulated under Section 107 or 108 of U.S. Copyright Law, provided a fee is paid. All fees should be paid to the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, Tel.: +1-978-7508400, Fax: +1-978-6468600, <http://www.copyright.com>, stating the ISSN of the journal, the volume, and the first and last page numbers of each article copied. The copyright owner's consent does not include copying for general distribution, promotion, new works, or resale. In these cases, specific written permission must first be obtained from the publishers.

ETHICAL GUIDELINE

BBE adopts the "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" (<http://www.icmje.org>) produced and updated by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The Editors expect that new and variant organisms, viruses and vectors described in BBE journals will be made available, under written request and for their own use, to all qualified members of the scientific community. If delays in strain or vector distribution are anticipated or if they are available from sources other than the authors, this should be indicated. The Editors encourage authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. In the case of materials that have been distributed by individuals, authors should indicate the laboratory strain designations and name and address of the donor as well as the original culture collection identification number, if any.

Subscription information

ISSN print edition: 1226-8372

ISSN electronic edition: 1976-3816

Volume 15 (6 issues) will appear in 2010

Cancellations must be received by September 30 to take effect at the end of the same year.

Changes of address: Allow for six weeks for all changes to become effective. All communications should include both old and new addresses (with postal codes) and should be

accompanied by a mailing label from a recent issue. According to § 4 Sect. 3 of the German Postal Services Data Protection Regulations, if a subscriber's address changes, the German Federal Post Office can inform the publisher of the new address even if the subscriber has not submitted a formal application for mail to be forwarded. Subscribers not in agreement with this procedure may send a written complaint to Customer Service Journals within 14 days of publication of this issue.

Microform editions are available from: ProQuest. Further information available at <http://www.il.proquest.com/uni>

Electronic edition

An electronic version is available at springerlink.com.

Production

Printed in Korea Springer-Verlag is part of Springer Science + Business Media

6.4 Produção 2007-2011.

6.4.1 Trabalhos Apresentados em Eventos Científicos na forma de pôster

- Barros, M.C.S; Porto, T.S; Lima, G.S.A; Lima-Filho, J.L; Porto, A.L.F. Screening of Actinomicetos sp. for the production of collagenase. I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental e IV Jornada Científica do LIKA, nos dias 06 e 07 de novembro de 2008, LIKA/UFPE.
- Barros, M.C.S; Lima, C.A; Porto, T.S; Lima-Filho, J.L; Lima, G.S.A; Porto, A.L.F. Seleção de Amostras de *Streptomyces* spp do Amazonas para produção de Colagenase. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, realizado no período de 02 a 05 de agosto de 2009, na cidade de Natal/RN-Brasil.

6.4.2 Resumos simples publicados em eventos

- Barros, M.C.S; Porto, T.S; Lima, G.S.A; Lima-Filho, J.L; Porto, A.L.F. Screening of Actinomicetos sp. for the production of collagenase. I Simpósio Nacional em Diagnóstico e Terapêutica Experimental e IV Jornada Científica do LIKA, nos dias 06 e 07 de novembro de 2008, LIKA/UFPE.

6.4.3 Trabalhos completos publicados em eventos

- Barros, M.C.S; Lima, C.A; Porto, T.S; Lima-Filho, J.L; Lima, G.S.A; Porto, A.L.F. Seleção de Amostras de *Streptomyces* spp do Amazonas para produção de Colagenase. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, realizado no período de 02 a 05 de agosto de 2009, na cidade de Natal/RN-Brasil.
- Barros, M. C. S; Porto, T.S; Lima-Filho, J.L; Teixeira, M.F.S; Lima, G.S.A; Porto, A. L. F. Produção e caracterização parcial de colagenase por *Streptomyces* sp. DPUA. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, 19 à 22 de Setembro, Foz do Iguaçu – PR.