

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO (PROPESQI)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

EFEITO DO BANHO ULTRASSÔNICO NA ATIVIDADE CATALÍTICA DE
UMA COLAGENASE OBTIDA DE UMA *Streptomyces sp.* UFPEDA3421:
IMOBILIZAÇÃO EM FILME POLISSACARÍDICO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Recife, 2021

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

**EFEITO DO BANHO ULTRASSÔNICO NA ATIVIDADE CATALÍTICA DE
UMA COLAGENASE OBTIDA DE UMA *Streptomyces sp.* UFPEDA3421:
IMOBILIZAÇÃO EM FILME POLISSACARÍDICO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia
Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada
à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

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

Recife, 2021

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Barreiro, Maria Ercília Lima.

Efeito do banho ultrassônico na atividade catalítica de uma colagenase obtida de uma *Streptomyces* sp. UFPEDA3421: imobilização em filme polissacarídico com potencial aplicação biomédica / Maria Ercília Lima Barreiro. - Recife, 2021. 64f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2021.

Orientação: Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

Inclui referências.

1. Purificação; 2. Protease; 3. Filme quitosana. I. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

**EFEITO DO BANHO ULTRASSÔNICO NA ATIVIDADE CATALÍTICA DE
UMA COLAGENASE OBTIDA DE UMA *Streptomyces sp.* UFPEDA3421:
IMOBILIZAÇÃO EM FILME POLISSACARÍDICO COM POTENCIAL
APLICAÇÃO BIOMÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Biociências, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à
Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Presidente)
Universidade de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

Prof^a. Dr^a. Juanize Matias Batista (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Priscila Gubbert (Suplente interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Raquel Pedrosa Bezerra (Suplente externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RESUMO

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar a ligação peptídica entre aminoácidos com aplicações primordiais no setor farmacêutico e industrial. Portanto, a produção de proteases com características eficientes de interesse biotecnológico a partir de novas cepas é bastante significativa. Dados os usos potenciais das collagenases e sua alta demanda, há interesse em encontrar novas fontes de enzimas collagenolíticas com propriedades promissoras. Nesse contexto, os actinomicetos têm se mostrado uma alternativa apropriada para a produção de proteases, uma vez que estes produzem grandes quantidades, principalmente extracelularmente, o que possibilita uma viabilidade de purificação menos onerosa. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento bioquímico e biofísico da atividade catalítica de uma protease purificada de *Streptomyces parvulus* e suas características sob efeito do ultrassom de baixa frequência, além de imobilização em filmes de polissacarídeos. A técnica de produção sob fermentação em estado submerso foi usada para obtenção do líquido metabólico contendo a enzima, seguida por procedimento de cromatografia de troca aniônica usando QAE Sephadex G50. A caracterização da enzima purificada foi realizada em diversos parâmetros como pH, temperatura, em presença de inibidores, detergentes, efeito do ultrassom e imobilização do filme de quitosana. Após análise eletroforética, a protease purificada apresentou massa molecular aproximada de 78,0 KDa, além de um rendimento de 31% e 11,8 vezes de purificação. A protease foi estável entre pH 4-9, apresentou pH ótimo 7,5, foi estável em temperatura de 0-50°C, e apresentou temperatura ótima em 45°C. Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} aumentaram a atividade enzimática, e a mesma foi inibida por PMSF. O ultrassom no tratamento ou pré-tratamento das reações enzimáticas mostrou-se favorável e aumentou a atividade em torno de 65% para a temperatura ótima de 45°C. A enzima purificada foi imobilizada com sucesso em um filme de quitosana, com efetividade de 65%, mas não em um filme de polissacarídeo de *Cassia grandis*. Assim, o presente trabalho demonstrou resultados promissores de uma protease com atividade collagenolítica no campo da Biotecnologia ao comprovar o efeito positivo induzido pelo ultrassom e a capacidade de ligação/imobilização em filme de quitosana com perspectiva futura de aplicação na área biomédica.

Palavras-chave: Purificação, protease, filme quitosana, atividade catalítica.

ABSTRACT

Proteases are the hydrolytic enzymes which hydrolyzes peptide bond between proteins with paramount applications in pharmaceutical and industrial sector. Therefore, production of proteases with efficient characteristics of biotechnological interest from novel strain is significant. Given the potential uses of collagenases and their high demand, there is an interest in finding new sources of collagenolytic enzymes with novel properties. Actinomycetes have been shown to be appropriate choice for producing collagenolytic protease and detergent-compatible enzymes, since they produce large quantities, mainly extracellularly, of these which enables purification. So, the present study aimed to evaluate the biochemical and biophysical catalytic activity behavior of a protease purified from *Streptomyces parvulus* and its features under ultrasound effect and immobilization in polysaccharide films. This study investigated the purification and biochemical characterization of the protease produced by *S. parvulus*. The production technique under submerged state fermentation was used followed by anionic exchange chromatography procedure using QAE Sephadex G50. Characterization of the purified enzyme was carried out for several parameters like pH, temperature, inhibitors, detergents, ultrasound effect and chitosan film immobilization. The purified protease has a molecular weight of 78.0 KDa, a yield of 31% and 11.8 fold. The partially purified protease was stable between pH 4-9, optimum pH at 7.5, stable between temperature of 0-45°C, and showed optimum temperature at 45°C, exhibited enhanced activity with Ca^{2+} and Mg^{2+} , and was inhibited by PMSF. US in the treatment or pre-treatment of enzymatic reactions showed to be favorable and increase the activity around 65% for the optimum temperature 45°C. Besides, the US improved the enzyme reactions for all assays. The purified enzyme was successfully immobilized in chitosan film but not in Cassia grandis polysaccharide film. Thus, the present work demonstrated the promising results of a protease with collagenolytic activity in the field of Biotechnology by proving the positive effect induced by ultrasound. Thus far, there is no report on the subcritical immobilization of proteases in Chitosan film, besides with collagenolytic activity under Ultrasound effect and its biofunctional activity.

Keywords: Purification, protease, chitosan film, catalytic activity.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS.....	11
1.1.1. Objetivo geral	11
1.1.2. Objetivos específicos.....	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1. PROTEASE.....	12
2.1.1. COLAGENASE	14
2.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PROTEASE COLAGENOLÍTICA. 16	
2.2.1. <i>Streptomyces</i> sp.	17
2.3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES.....	19
2.4. IMOBILIZAÇÃO EM GEL POLISSACARÍDICO	21
2.4.1. <i>Cassia grandis</i>	22
2.4.2. QUITOSANA.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO I	31
Effects of low frequency ultrasound-assisted hydrolysis on collagenolytic activity of a protein purified from <i>Streptomyces parvulus</i> : Purification and characterization	32
Abstract	33
1. Introduction	34
2. Methodology	36
3. Results and Discussion.....	42
4. Conclusion	56
Acknowledgements.....	57
5. References	57
International Journal of Biological Macromolecules.....	58
Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from <i>Aspergillus tamaraii</i> URM4634	58

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. *Streptomyces sp.* utilizados na produção de diferentes enzimas 18

CAPITULO 1

Tabela 1. Screening of metal ions, protease inhibitor and surfactants on purified enzyme activity from *Streptomyces parvulus*47

Tabela 2. Analysis to address the effect of ultrasound on enzymatic catalysis 51

LISTA DE FIGURAS

Referencial Teórico

- Figura 1.** Esquema de classificação de proteases baseado em sítio de atuação, mecanismos de ação de relação estrutural 13
- Figura 2.** Representação resumida de processo de degradação do colágeno por protease collagenolítica. [A] Estrutura tripla-hélice de colágeno; [B] Colagenase associando-se a molécula de colágeno para degradação; [C] Fibra de colágeno degradada e [D] Pepídeos e aminoácidos liberados pela ação de protease collagenolítica em fibra de colágeno “[C]”16
- Figura 3.** Sementes de *Cassia grandis* em diferentes ângulos: [A] Vista frontal, mostrando rafe; [B] Vista apical, mostrando fio e micrópila; [C] Corte transversal, mostrando cotilédones.24
- Figura 4.** Etapas na produção de quitosana a partir do aproveitamento de resíduos do pescado.25
- Figura 5.** Filme polissacarídico de quitosana.....26

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Purification chromatogram of a protease obtained from *S. parvulus* using QAE-Sephadex G50 ion exchange resin.....43
- Figura 2.** Effect of pH on enzyme activity. A) Analysis of optimum pH at a range of 2-10. B) Analysis of pH stability at a range of 2-12. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays 45
- Figura 3.** Effect of temperature on enzyme activity. A) Letter A presented the optimum temperature at a range of 10-100°C. B) Temperature stability at a range of 10-100°C. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays46

Figura 4. Analysis of catalytic activity of a protease with collagenolytic activity obtained from *S. parvulus* using QAE-Sephadex G50 ion exchange resin through Ultrasound performance. (A) Thermo analysis of catalytic activity in presence of ultrasound – Temp. at 30°C and 40°C. (B) Thermo analysis of catalytic activity in presence of ultrasound – Temp. at 45°C and 50°C. (C) All lines after ultrasound effect on enzyme activity. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays. Studies on assisted ultrasound in enzymatic reactions always aim to accelerate the reaction rate. Enzymatic reactions assisted by ultrasound are credible for both liquid-solid and liquid-liquid systems (Costa-Junior et al., 2020)...51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH	- Quitosana
HCL	- Ácido clorídico
CaCl ₂	- Cloreto de cálcio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
MgSO ₄	- Sulfato de magnésio
MnSO ₄	- Sulfato de manganês
FeSO ₄	- Sulfato de ferro
CuSO ₄	- Sulfato de Cobre
ZnSO ₄	- Sulfato de zinco
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
PMSF	- Fluoreto de fenilmetilsulfonil
DTT	- Ditionitrito
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
PBS	- Polibutileno succinato

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais focos de pesquisa no ramo da biotecnologia são as enzimas, pois são extremamente necessárias para a realização de processos bioquímicos nos organismos vivos, sendo estudadas desde o fim dos anos 1700 (NELSON; COX, 2014). São moléculas consideradas biocatalisadoras naturais, ou seja, podem apresentar especificidade por um substrato em especial, e desta forma vem sendo aplicadas em diversos segmentos industriais: Têxtil, de papel e celulose, alimentício e de bebidas, farmacêutico e veterinário, dentre outros (SRIVASTAVA, MISHRA & UPADHYAY, 2020). Dentro das enzimas encontra-se as collagenases, têm sido descritas na utilização em diversos segmentos biotecnológicos e biomédicos, envolvendo áreas como: medicinal, farmacêutico, alimentício, cosmético e têxtil. Quanto à aplicação médica, há relatos na literatura de sua aplicação no tratamento de úlceras e queimaduras, na aceleração da cicatrização de feridas por pressão, na produção de peptídeos bioativos com atividades antioxidante e antimicrobiana, além de possuírem um importante papel no sucesso de cirurgias para transplantes de alguns órgãos (BHATTACHARYA *et al.*, 2019).

Collagenases podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, este último destaca-se por ser facilmente replicável e produzido em larga escala (SOUZA *et al.*, 2015). Entre os micro-organismos produtores de enzimas, as bactérias se destacam por uma variedade de razões, incluindo altas taxas de crescimento levando a curtos tempos de fermentação, a capacidade de crescer utilizando várias fontes de nutrientes, além de produzir e excretar várias enzimas hidrolíticas, principalmente proteases (Parrado *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2009). O gênero *Streptomyces* possui grande vantagem dentre os microrganismos produtores de enzimas collagenolíticas, uma vez que a sua engenharia genética, tem demonstrado grande habilidade em sintetizar esse tipo de protease

apresentando características de termo-estabilidade e maior rendimento (ABDELRAOF et al., 2019).

O processo de produção de collagenase microbiana na fase *downstream* é composto pelas fases de separação, concentração, purificação e acabamento. A etapa de purificação é baseada em métodos relacionados aos aspectos moleculares gerais, tais como, carga elétrica, tamanho, solubilidade e hidrofobicidade. Neste contexto, a cromatografia de troca iônica apresenta grande valor purificando enzimas, tendo como princípio a separação dos compostos de uma mistura de acordo com diferenças nas suas propriedades específicas (NELSON; COX, 2014), utilizando uma resina com material poroso para retenção de partículas e ligações covalentes a grupos trocadores iônicos, obtendo-se por um produto purificado. Considerando a posterior aplicação da biomolécula de interesse, o aprimoramento ligado à redução de custos nos processos de *up* e *downstream* é substancialmente importante, especialmente se tratado de proteases com possibilidade de aplicação na indústria alimentícia ou farmacêutica, setores que exigem completa purificação (WARD, 2019).

Além do foco na produção das proteases, diversos processos têm sido desenvolvidos para otimizar a atividade das mesmas, devido ao seu vasto potencial de aplicações biotecnológicas. Um desses métodos é o uso do Ultrassom de ondas curtas (ABADÍA-GARCÍA et al., 2016). A tecnologia de ultrassom, como uma nova tecnologia de processamento e melhoramento, tem atraído muita atenção na extração assistida de componentes bioativos e na hidrólise enzimática assistida. Em reações enzimáticas o ultrassom pode agir alterando as condições do meio, e perturbando as ligações fracas, induzindo mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (WANG et al., 2018). Nos últimos anos, o ultrassom tem sido usado com sucesso em um grande número de bioprocessos na área da biotecnologia, tais como no melhoramento (*upregulation*) da

hidrólise enzimática (biocatálise). Tais métodos podem oferecer alta eficiência de bioconversão enzimática e produção de novos peptídeos biologicamente ativos.

Por fim, a aplicação de um bioativo é o principal alvo da indústria e do melhoramento de produção, neste sentido, a necessidade de obter enzimas collagenolíticas imobilizadas em biofilmes degradáveis proporciona seu direcionamento ao tratamento de feridas, devido aos processos de retardo na atividade cicatricial tecidual. Desta forma, é fundamental a busca por fontes de collagenases, o aprimoramento na metodologia de obtenção da mesma e a análise do potencial aplicação do ultrassom na enzima purificada, bem como análise do potencial de imobilização em filme polissacarídico visando o melhoramento da performance enzimática na aplicação industrial, sobretudo biomédica.

2. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do ultrassom na atividade catalítica da enzima collagenase previamente purificada, bem como realizar o estudo cinético da enzima dissolvida em filme polissacarídico com potencial biomédico

1.1.2. Objetivos específicos

- Produzir, isolar e purificar uma enzima com atividade collagenolítica obtida de *S. parvulus*;
- Caracterizar a enzima através de propriedades físico-químicas, análise de massa molecular através de eletroforese em SDS-PAGE e inibidores enzimáticos;
- Avaliar o efeito do ultrassom (em diferentes frequências e tempo de exposição) na atividade collagenolítica da enzima;
- Imobilizar a enzima em filme polissacarídico de sementes de *Cassia grandis* e Filme de Quitosana (produzida de carapaça de camarão);

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PROTEASE

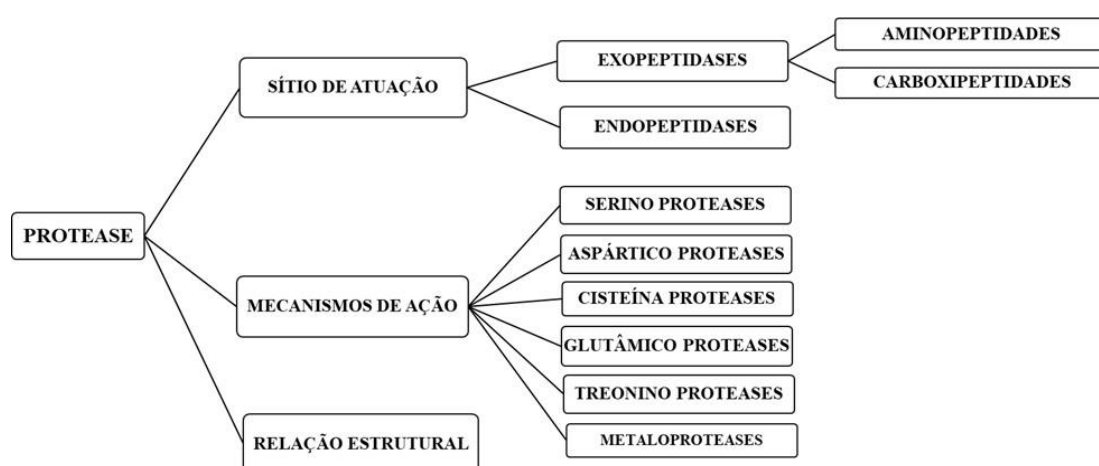
Proteases constituem o grupo de enzimas mais explorados comercialmente, uma vez que estas enzimas podem ser utilizadas nas mais diversas condições de temperatura e pH, ser potencialmente alteradas para ajuste de estabilidade e especificidade e possuem meia-vida maior que catalisadores químicos industriais (ADRIO; DEMAIN, 2014). Entretanto, a especificidade das enzimas proteolíticas é a característica que confere a estas 60% do mercado de enzimas atual (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Sua possibilidade de se ligar a um substrato em particular, juntamente a outras propriedades relacionadas acima permitem a proteases aplicabilidade em setores industriais como alimentício atuando principalmente na alteração/correção da textura e aparência de alimentos, na indústria do processamento do couro e têxtil em geral, em processos de biorremediação, recuperação de íons metálicos e na área farmacêutica e medicinal onde estão presentes na fabricação de medicamentos, agentes tópicos, kits para diagnóstico entre vários outros (RAO *et al.*, 1998; Martínez-Medina *et al.*, 2019; BAJAJ *et al.*, 2013). Este último caso merece atenção pois requer grau de pureza, especificidade e eficiência elevados, em relação a outros setores industriais.

Proteases são hidrolases, ou seja, enzimas responsáveis pela catálise de reações hidrolíticas em ligações peptídicas resultando na liberação de peptídeos e aminoácidos (SHARMA *et al.*, 2018). Por serem enzimas altamente específicas possuem diversas particularidades e são classificadas e ordenadas de acordo com tal. Podem ser categorizadas de acordo com seu sítio de atuação, em endopeptidases, aquelas que clivam proteínas a partir do centro, e exopeptidases, aquelas que clivam ligações peptídicas presentes nos terminais da cadeia de carbonos da proteína (PHILIPPS-WIEMANN, 2018). Estas podem ainda ser categorizadas de acordo com o terminal a ser clivado, sendo Aminopeptidase (proteases que atuam no N-terminal da cadeia polipeptídica) e

Carboxipeptidases (responsáveis pela clivagem e liberação de aminoácidos ou peptídeos no C-terminal) (GURUMALESH *et al.*, 2019) em geral, enzimas do mesmo tipo catalítico são inibidas pelos mesmos tipos de moléculas.

Enzimas proteolíticas podem ainda ser categorizadas quanto a sua especificidade, ou mecanismo de ação, definido por características estruturais de seu sítio ativo ou ainda posição de resíduo e/ou ligante metálico. Desta forma são agrupadas em serina, aspártico, cisteína, glutâmico, treonina ou metalo proteases (YIKE, 2011). Outro fator importante em relação à classificação das proteases são as relações estruturais, também relacionado a seu mecanismo de ação destas proteases (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Um resumo das classificações de enzimas proteolíticas e seus mecanismos de ação podem ser observadas na **Figura 1**.

Figura 1. Esquema de classificação de proteases baseado em sítio de atuação, mecanismos de ação de relação estrutural.



Fonte: SRIVASTAVA, N., MISHRA, P. K., UPADHYAY, S. N. (2020), adaptado.

2.1.1. COLAGENASE

Colágeno e peptídeos de colágeno são biomateriais de grande interesse industrial. Estão associados à indústria alimentícia, farmacêutica, e de cosméticos, estando presente em vários outros produtos vinculados à área da saúde humana e animal. Na literatura é possível encontrar uso de peptídeos de colágeno em imunoterápicos (GAO, 2019), tratamento de hipertensão (ZHUANG *et al.*, 2012), fabricação de hidratantes e cosméticos relacionados à desaceleração do fotoenvelhecimento (YAGODA; GUNS, 2014), alimentação parenteral (USAMAH, 2019), tratamento de úlceras (YAMANAKA, 2017), atividade antimicrobiana (GÓMEZ-GUILLÉN, *et al.*, 2011) anticâncer e antioxidante (NASRI, 2019). A produção destes peptídeos biologicamente ativos é realizada a partir de hidrólise enzimática, sendo assim é notório o interesse em pesquisas por enzimas capazes de degradar o colágeno.

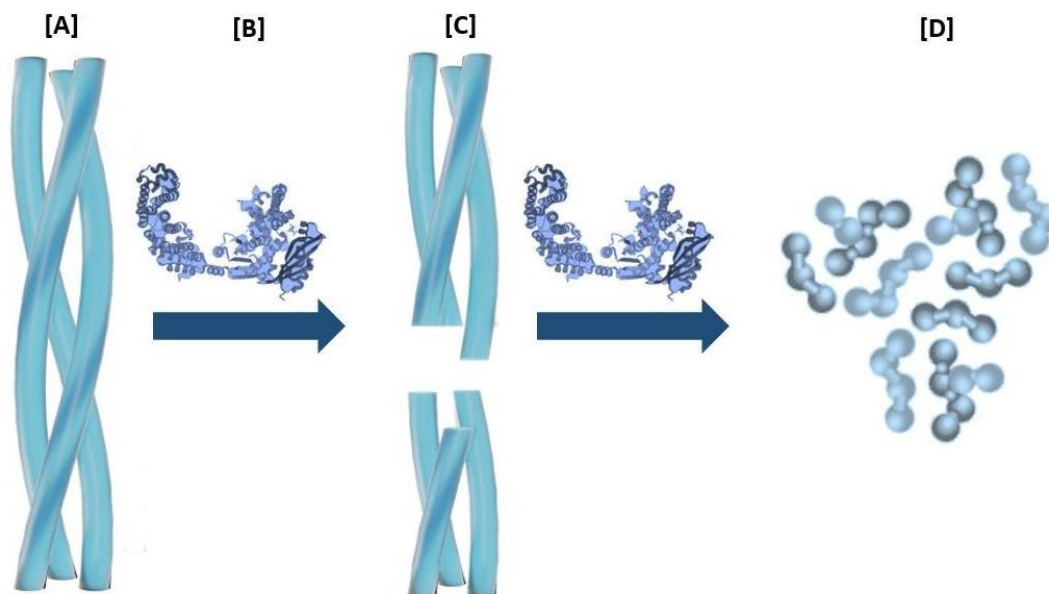
Colagenases são proteases responsáveis pela clivagem do colágeno, tanto nativo quanto desnaturado, atuando assim na manutenção de tecidos e órgãos (OLIVEIRA, 2017), uma representação da clivagem do colágeno pode ser observada na **figura 2**. Além da produção de peptídeos, proteases com ação colagenolítica também são empregadas diretamente na indústria, em processos de cicatrização, de epitelização por debridamento e degradação de placas fibrosas formadas por enfermidades como doença de Peyronie (JORDAN, 2008). Podem ainda funcionar como bio-restauradores atuando na remoção de resíduos orgânicos (BHAGWAT; DANDGE, 2018), na indústria alimentícia atuando como amaciantes em carnes e diminuindo as chances de contaminação microbiana, e na indústria têxtil como amaciante do couro, facilitando a penetração de corante (BHAGWAT *et al.*, 2016; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Colagenases podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal ou microbiana. Dentre as colagenases de origem animal, destacam-se os subprodutos do pescado,

especialmente a nível de fígado, estômago, intestino, cecos pilóricos, pâncreas, hepatopâncreas e gordura mesentérica (OLIVEIRA, 2017). Já em plantas, proteases colagenolíticas são comuns nas espécies *Ficus carica* e *Zingiber officinale* (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Devido a seu complexo sistema que restringe a atividade a sítios específicos do colágeno e aos custos de produção e manutenção, há predileção por collagenases proveniente de microrganismos (WANDERLEY, 2017).

Collagenases de origem microbiana são menos específicas, capazes de degradar colágeno em mais de um local (WANDERLEY, 2017). Atualmente o microrganismo responsável pela maior produção de collagenase a nível industrial é *Clostridium sp.*, entretanto sua natureza patogênica e produção de toxinas pode limitar a aplicação das enzimas (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Dentro desta perspectiva, o uso de metodologias de purificação é uma etapa crucial para o emprego destas enzimas na indústria, especialmente no campo da saúde e alimentação (NELSON; COX, 2014). Ainda assim, proteínas colagenolíticas obtidas a partir de microrganismos apresentam vantagens em relação àquelas provenientes de animais ou plantas, uma vez que apresentam alto rendimento, maior produtividade, e facilidade no controle das condições de produção (BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Figura 2. Representação resumida de processo de degradação do colágeno por protease colagenolítica. [A] Estrutura tripla-hélice de colágeno; [B] Collagenase associando-se a molécula de colágeno para degradação; [C] Fibra de colágeno degradada e [D] Pepitídeos e aminoácidos liberados pela ação de protease colagenolítica em fibra de colágeno “[C]”.



Fonte: Bhagwat & Dandge (2021), adaptado.

2.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PROTEASE COLAGENOLÍTICA

Colagenases são encontradas em diversos organismos, todavia, microrganismos são notórios quanto a produção para aplicação industrial, devido a facilidade para produção em larga escala, de manipulação genética, e a sua diversidade bioquímica, sendo capazes de produzir proteases com alto rendimento e características que facilitam seu emprego nas mais variadas áreas (RAO *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 201).

Além disso, dentre os microrganismos produtores de proteases as bactérias aparecem em evidência por demonstrarem especificidade mais ampla, além de poder degradar colágeno nativo ou desnaturado, ampliando sua eficiência e aplicação (ALIPOUR, et al. 2016). *Clostridium* sp. foi a primeira conhecida pela produção de colagenase, sendo conhecida na literatura por até seis metalo-endopeptidase capazes de agir sobre o colágeno nativo isoladas a partir da sua fermentação, fazendo deste um dos gêneros mais estudados (HARAZONO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018). Entretanto sua natureza patogênica limita a aplicação industrial da enzima, especialmente no ramo farmacêutico e/ou biomédico, uma vez que a liberação de toxinas por este microrganismo

é não só um risco, mas também impõe a necessidade de maiores etapas de purificação, aumentando os custos do processo. Desta forma, são investigadas alternativas não patogênicas ou menos patogênicas capazes de produzir collagenases com eficiência e de maneira econômica (BANGWAT & DANDGE, 2019).

Outros gêneros em destaque são *Pseudoalteromonas sp.*, que embora também seja considerada patogênica apresentou produção de collagenase capaz de degradar colágenos Tipo I e gelatina (BHATTACHARYA *et al.*, 2019); *Bacillus sp.* também tem ganhado espaço na indústria, já sendo considerado um dos gêneros que mais contribuem com a produção industrial de collagenase (SONG *et al.* 2021) e *Streptomyces sp.* (HARAZONO *et al.*, 2020; SARKAR, G., SUTHINDHIRAN, K., 2020).

2.2.1. *Streptomyces sp.*

Streptomyces sp. é uma bactéria Gram-positiva, pertencente à família Streptomycetaceae e ordem Actinomycetales. Podem ser encontradas em água marinha, doce e no solo. Neste último encontra-se comumente relacionado a plantas, desempenhando papel na degradação de produtos, crescimento das plantas, fixação de nitrogênio (GOPALAKRISHNAN, S., SRINIVAS, V., PRASANNA, S. L., 2020). O gênero também está relacionado a produção de biomoléculas de interesse industrial e comercial, principalmente para uso na agricultura para controle de pragas e medicina como antibióticos (SALWAN & SHARMA, 2020). Segundo a literatura, é comum a espécies de bactérias relacionadas ao crescimento e saúde de plantas, a produção de celulases e proteases, em razão da mineralização de macronutrientes importantes para o vegetal, como nitrogênio, fósforo e potássio (LIMA *et al.*, 1998; OPALAKRISHNAN, S., SRINIVAS, V., PRASANNA, S. L., 2020).

A busca por metabólitos secundários de microrganismos resulta em grande número de moléculas biologicamente ativas e agentes terapêuticos. Pesquisas referentes ao genoma

de espécies de *Streptomyces* revelam seu potencial para obtenção de diversas biomoléculas, das quais menos de 5% foram identificadas (SALWAN & SHARMA, 2020). Na **tabela 1** estão elencadas algumas pesquisas realizadas nos últimos anos utilizando *Streptomyces sp.* na produção de enzimas.

Tabela 1. *Streptomyces sp.* utilizados na produção de diferentes enzimas

ESPÉCIE/CEPA	ENZIMA	REFERÊNCIA
<i>Streptomyces sp.</i> DPUA 1576	Protease fibrinolítica	(Silva <i>et al.</i> , 2015)
<i>Streptomyces sp.</i> DMMM60	l-methionine γ -lyase (MGL)	(Abdelraof <i>et al.</i> , 2019)
<i>Streptomyces sp.</i> GS-1	Protease alcalina	(Sarkar, G., Suthindhiran, K., 2020)
<i>Streptomyces sp.</i> Al-Dhabi-49	Lipase e Protease	(Al-Dhabi <i>et al.</i> , 2020)
<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i> VIT-SP4	Pectinase	(Govindaraji, P. K., Vuppu, S., 2020)
<i>Streptomyces sp.</i> KP314280 (20r)	α -amylase	(Ousaadi <i>et al.</i> , 2021)
<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> ME742	Xilanase	(Khangkhachit <i>et al.</i> , 2021)
<i>Streptomyces sp.</i> SBLWN_MH2	Lipase	(Mohamed, M. A., Awada, H. M. Mostafab, E. E., 2021)
<i>Streptomyces sp.</i> MS-S2	Xilanase e Celulase	(Danso <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: A autora.

O potencial de *Streptomyces sp.* na obtenção de bioativos indica a amplitude de possibilidades do uso destas espécies. *S. antibioticus*, por exemplo, demonstra um potencial industrial na área biomédica pela produção de Quercetina 3-O-glicosídeo e Tirosina (SHOLKAMY *et al.* 2020; ORENES-PINERO *et al.* 2016). Em circunstâncias diferentes, *S. parvulus* foi capaz de produzir amilases, lipases, celulasas e proteases

(SHAIK, M., SANKAR, G. G., RAJITHA, M. I. P. 2017). Dada diversidade genética e prospecção do gênero relacionado a potencialidade na produção de bioativos, especialmente nas áreas da agricultura e medicina, é legítimo o direcionamento destas espécies na produção de produção de proteases colagenolíticas (SALWAN & SHARMA, 2020).

2.3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES

As etapas de *downstream* que compreendem o processo de purificação e caracterização de proteases são de extrema relevância para uma aplicação biomédica ou farmacêutica. Enzimas proteolíticas, especialmente aquelas obtidas a partir de microrganismos necessitam passar por tais processos e comprovar não só sua pureza como sua adequação a indústria de interesse (GURUMALESH *et al.* 2019).

Enzimas proteolíticas podem ser purificadas por técnicas relacionadas a características físico-químicas como carga elétrica, massa molar, solubilidade e hidrofobicidade. De acordo com a literatura vigente, normalmente são empregadas etapas de precipitação e/ou cromatografias. A primeira pode ser obtida por meio da adição de um determinado sal em processo conhecido como *salting-out*; A segunda compreende uma diversidade de padrões, sendo estes designados a partir das particularidades da enzima de interesse, assim temos cromatografias baseadas no tamanho, massa molar ou carga elétrica da protease (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A precipitação de proteínas em geral é um dos métodos mais tradicionais no processo de concentração, no entanto não pode ser considerado um método de purificação propriamente dito visto que não resulta em proteínas puras, contudo podem ser aplicadas no início do processo de purificação como forma de preparação para as etapas seguintes (ZUÑIGA, 2003). Esta técnica vale-se do aumento ou diminuição da força iônica a partir da variação na concentração de sais ou solventes orgânicos. A utilização de sais promove um efeito

conhecido como *salting-out*, caracterizado pela neutralização das cargas elétricas superficiais pela adição de sais, reduzindo a solubilidade da proteína, que são “excluídas” da fase aquosa da solução e precipitam-se no fundo do recipiente. A precipitação destas biomoléculas também pode ocorrer pela adição de solventes orgânicos, estes, por sua vez, atuam diminuindo a constante dielétrica do meio, que resulta na agregação das moléculas proteicas por interação eletrostática de superfícies carregadas com sinal oposto (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

Entre os métodos de purificação propriamente ditos, a cromatografia destaca-se sendo amplamente utilizado para purificação de proteínas (GUGGISBERG *et al.*, 2012). Todas as etapas do processo *downstream* deve levar em consideração as características da enzima de interesse, sendo um pré-requisito na utilização de coluna cromatográfica. Resumidamente, a cromatografia é realizada sob aplicação de uma determinada amostra contendo a molécula de interesse. Estas moléculas ficam, a princípio, retidas pela coluna a são eluídas em diferentes momentos a depender de sua adsorção na matriz, essa eluição normalmente ocorre pela adição de um eluente. A coleta de etapas diferentes da coluna permite a separação da molécula de interesse de outros componentes do meio que não apresentaram capacidade de ligação a coluna ou foram eluídos em outras fases. Esta técnica vem sendo amplamente aplicada no estudo e na purificação de collagenases (FAYAD, S., MORIN, P., NEHMÉ, R., 2017).

A cromatografia de exclusão molecular, por exemplo, baseia-se na massa molecular das proteínas, onde as moléculas menores que os poros da matriz cromatográfica são eluídas mais lentamente em relação as maiores, resultando assim na fragmentação da amostra em eluições com moléculas de diferentes tamanhos (DUONG-LY GABELLI, 2014). Já a cromatografia de troca iônica baseia-se na carga elétrica na superfície da molécula e sua interação com a matriz, destaca-se em relação à outras devido

a sua facilidade de aplicação em larga escala, elevada resolução e capacidade de adsorção (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020) As resinas utilizadas neste modelo cromatográfico podem ser trocadoras de ânions (possuem carga positiva), como o dietilaminoetil (DEAE)-celulose e resinas trocadoras de cátions (possuem carga negativa), como o carboxi-metil (CM)-celulose. No geral, para escolha da matriz que vai compor a coluna, devem ser considerados os seguintes critérios: estabilidade mecânica e química, capacidade de adsorção, tamanho e forma do poro, superfície e desidade da matriz e tamanho da partícula de interesse (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A cromatografia de interação hidrofóbica por sua vez, é normalmente utilizada como complementar por ser menos seletiva e funciona levando em consideração a adsorção por hidrofobicidade (MUCA *et al.*, 2020)

2.4. IMOBILIZAÇÃO EM GEL POLISSACARÍDICO

A imobilização de proteases é uma alternativa bastante explorada a instabilidade iminente destas enzimas em determinadas condições reacionais. A utilização de uma matriz polimérica solidificada na imobilização de proteases é uma técnica que, além de manter e aumentar a estabilidade enzimática também, aumenta a eficiência e potencialmente reduz os custos de produção e aplicação uma vez que a matriz possa ser reutilizada (VITOLLO *et al.* 2015).

Os materiais para formação de matriz polimérica para imobilização de proteínas podem ser de origem inorgânica ou orgânica, sendo este último ainda classificado como naturais ou sintéticos. Compostos orgânicos sintéticos exibem maior variedade físico-química possibilitando formação de suporte específico para a enzima de interesse. Entretanto, compostos orgânicos naturais geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradados, não causando danos ao meio ambiente (MENDES *et al.*, 2011;

ALBUQUERQUE et al., 2017). A seleção de matriz polimérica para imobilização de colagenases devem levar em consideração as determinadas propriedades físico-químicas: Área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e custo (MENDES et al., 2011).

2.4.1. *Cassia grandis*

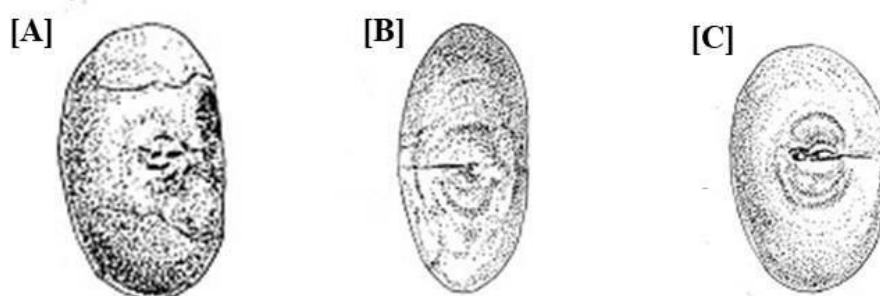
Cassia grandis é uma árvore de tamanho médio com folhagem pinada e flores cor de rosa em uma copa larga e inclinada (OLIVEIRA et al., 2005). Pertence a família Leguminosae e à subfamília Caesalpinioideae, nativa das florestas tropicais da América Central e Antilhas, amplamente encontrada na zona da mata do Estado de Pernambuco, Brasil. Suas sementes possuem forma elíptica ou ovóide, faces achatadas, tegumento castanho-canela claro, ligeiramente áspero, opaco, de consistência dura e pleurograma ausente. Cotilédones planos, amarelo âmbar claro e dispostos obliquamente, com alto potencial para reserva de nutrientes, dentre estes uma galactomanana, constituída principalmente de galactose e manose (UBIERGO, P; LAPP, M. 2007; JOSHI; KAPOOR, 2003). Na figura 3 podemos observar a representação de sementes de *Cassia grandis*.

Polissacarídeos isolados de fontes naturais têm despertado atenção nos campos de bioquímica e farmacologia (YANG et al., 2009) graças a bioatividade, biocompatibilidade, baixo custo e disponibilidade desses materiais no meio ambiente (C. W. VENDRUSCOLO, 2009). A exemplo, Galactomananas extraídos do endosperma de numerosas plantas (particularmente Leguminosae) são polissacarídeos generalizados na natureza capazes de formar soluções altamente viscosas e estáveis em baixas concentrações devido a seu alto peso molecular, caráter não iônico e solubilidade em água (M.A. POLLARD et al, 2010), estas características permitem sua aplicação nas indústrias

alimentícia, farmacêutica, biomédica, cosmética, têxtil e do papel. Muitos estudos têm relatado o uso potencial de galactomanana como espessantes (A.L. BORURBON et al, 2010) parte de sistemas mistos como hidrogéis, estabilizadores de emulsão na preparação de filmes e filmes comestíveis em si com barreira aprimorada, bem como propriedades mecânicas que estendem e melhoram a vida útil dos alimentos (MARTINS et al, 2012).

Estudos demonstram que sementes de *Cassia grandis* são fontes rentáveis de galactomanana e seu potencial na formação de filmes para imobilização de compostos bioativos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). A utilização de biofilmes com qualidade físico-químicas similares a da galactomanana junto a enzimas com alta atividade biológica pode ter diversas aplicações nos campos da biotecnologia, biomedicina e farmácia, servindo inclusive como alternativa para indivíduos com dificuldade de engolir formas farmacêuticas sólidas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Além dos benefícios biotecnológicos e industriais da utilização de sementes de *Cassia grandis* para obtenção de biofilme, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de tecnologias para a redução do impacto ambiental na produção de fármacos são uma tendência mundial, desta forma consolida-se a priorização de material orgânico e nativo.

Figura 3. Sementes de *Cassia grandis* em diferentes ângulos: [A] Vista frontal, mostrando rafe; [B] Vista apical, mostrando fio e micrópila; [C] Corte transversal, mostrando cotilédones.

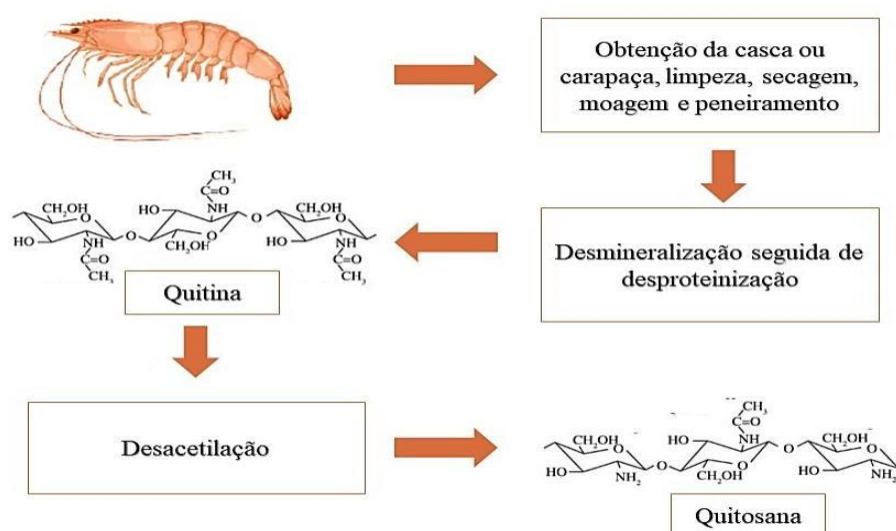


Fonte: Ubiergo, P; Lapp, M. (2007), adaptado.

2.4.2. QUITOSANA

Quitosana (CH), um polissacarídeo extraído da casca do camarão e caranguejo, tem boa propriedade de formação de filme e diversidade biológica propriedades que são usadas em aditivos alimentares, têxteis e campos de materiais. O potencial de aplicação da quitosana é multidimensional, as propriedades singulares da quitosana fazem com que esta seja bastante versátil quanto à sua aplicabilidade na área biomédica e farmaceutica, por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico (BENTO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2007). Além disso, a prospecção do uso de materiais de descarte da indústria pesqueira para obtenção de quitina a partir de processos de desmineralização, desproteínização e descoloração para posterior produção de quitosana por desacetilação em larga escala oferece alternativa rentável e ecológica (ABREU et al., 2013). Na figura 4 encontra-se disposto esquema do processo de produção de quitosana a partir de subprodutos da indústria da pesca.

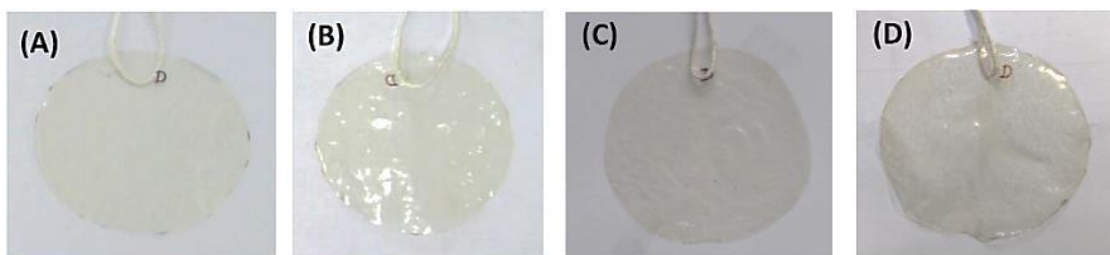
Figura 4. Etapas na produção de quitosana a partir do aproveitamento de resíduos do pescado.



Fonte: Abreu et al. (2013), adaptado.

Filmes à base de quitosana são de boa bacteriostase, transparência e sólidos, mas os filmes compostos de quitosana pura são limitados pelas propriedades mecânicas e de barreira (W. ZANG et al, 2019). Até agora, alguns filmes à base de quitosana incorporado com vários produtos bioativos naturais, como os óleos essenciais, proteínas e polipeptídeos, polissacarídeos e polifenóis foram relatados como alternativa para melhorar as propriedades mecânicas, de barreira, anti-atividade oxidante e antibacteriana (Z. ZAREIE *et al.*, 2020). Diante desta perspectiva, a utilização de biofilme a base de quitosana, Figura 5, oferece diversas possibilidades na aplicação de enzimas de interesse biotecnológico.

Figura 5. Filme polissacarídico de quitosana.



Fonte: Cahú et al. (2018), adaptado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADÍA-GARCÍA, L., EDUARDO CASTAÑO-TOSTADO, LECH OZIMEK, SERGIO ROMERO-GÓMEZ, CÉSAR OZUNA, SILVIA L. AMAYA-LLANO. Impact Of Ultrasound Pretreatment On Whey Protein Hydrolysis By Vegetable Proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 37, Part A, October 2016, Pages 84-90.

ABDELRAOF, M. *et al.* Statistically optimized production of extracellular l-methionine γ -lyase by *Streptomyces* Sp. DMMM60 and evaluation of purified enzyme in sub-culturing cell lines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 18, 2019.

ABREU, F. O. M. S. *et al.* Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. *Polímeros* [online]. 2013, v. 23, n. 5 [Acessado 29 Novembro 2021] , pp. 630-635. Disponível em: <<https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.042>>. Epub 14 Nov 2013. ISSN 1678-5169. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.042>

ABOOD, A. *et al.* Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza and its application in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 116, 2018.

ADRIO, J. L. DEMAINE, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes *Biomolecules*. V.4, nº 1, p. 117-139. 2014.

AL-DHABI, A. *et al.* Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 27, Issue 1, 2020.

ALIPOUR, H. *et al.* Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 6, Issue 11, 2016.

BHATTACHARYA, S. *et al.* U32 collagenase from *Pseudoalteromonas agarivorans* NW4327: Activity, structure, substrate interactions and molecular dynamics simulations. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 204–209, 2013.

BHAGWAT, P. K. & DANDGE, B. P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, V. 15. p. 43–55. 2018.

BHAGWAT, P. K. *et al.* Purification, properties and application of a collagenolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. SUK. RSC. 2016.

DANSO, B. *et al.* Valorisation of wheat straw and bioethanol production by a novel xylanase- and cellulase-producing *Streptomyces* strain isolated from the wood-feeding termite, *Microcerotermes* species. *Fuel*, Volume 310, Part A, 2022.

DUARTE, A. S., CORREIA, A., ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases - A review. *Crit Rev Microbiol*. 42(1):106-26. 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2014.904270.

DUONG-LY, K. C., & GABELLI, S. B. Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, 105–114. 2014.

FAYAD, S., MORIN, P., NEHMÉ, R. Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. *Journal Of Chromatography A*. 2017.

GAO, S. et al. Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide -induced immunosuppression in BALB/c mice. *Journal of Functional Foods*. V. 60. 2019.

GOVINDARAJI, K., VUPPU, S. Characterisation of pectin and optimization of pectinase enzyme from novel *Streptomyces fumigatiscleroticus* VIT-SP4 for drug delivery and concrete crack-healing applications: An eco-friendly approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Volume 27, Issue 12, Pages 3529-3540. 2020.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. V.128. p. 254-257. 2019.

GUGGISBERG, DOMINIK & RISSE, M.C. & HADORN, RUEDI. Determination of Vitamin B-12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column. *Meat science*. 2011. DOI: 90. 279-83. 10.1016/j.meatsci.2011.07.009.

HARAZONO, K., ATSUMI, Y., SHIRASAKA, N. Safety evaluation of collagenase from *Streptomyces violaceoruber*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020.

JORDAN, G. H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: A prospective, single-center, non-placebo-controlled study. *J Sex Med*. V. 5. p. 180-187.

KHANGKHACHITA, W. et al. Production of thermostable xylanase using *Streptomyces thermocarboxydus* ME742 and application in enzymatic conversion of xylan from oil palm empty fruit bunch to xylooligosaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 37, 2021.

LIMA, L.H.C., MARCO, J.L., FELIX, J.R., Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (Eds.), *Controle Biológico*. 11 Jaguariuna: EMBRAPA-Meio Ambiente, pp. 263-304. 1998.

MARTÍNEZ-MEDINA, G. A. et al. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, p. 221–246. 2019.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., CASTRO, H. F., GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Revisão. Quím. Nova* 34 (5). 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000500019

MOHAMEDA, M. A., HASSAN M. A., MOSTAFA, E. E. Purification, catalytic, kinetic, thermodynamic characterization and stability profile of alkalophilic lipase from *Streptomyces* sp. SBLWN_MH2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 37, 2021.

MUCA, R. et al. Effects of negative and positive cooperative adsorption of proteins on hydrophobic interaction chromatography media. *Journal of Chromatography A*, v.1625. 2020.

NASRI, M. Bioactive Peptides from Fish Collagen Byproducts. 2019. DOI: 10.1002/9781119383956.ch13.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. p. 89-95. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLIVEIRA, GIORDANI DE *et al.* Purificação e caracterização de alfa-galactosidases de sementes de *Platymiscium pubescens* Micheli. *Revista Árvore* [online]. 2005, v. 29, n. 4 [Acessado 29 Novembro 2021], pp. 535-543. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000400005>>. Epub 28 Set 2005. ISSN 1806-9088. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000400005>.

OLIVEIRA, V. M. et al. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet*. V. 11, Nº 3. p. 243-255, 2017.

OPALAKRISHNAN, S., SRINIVAS, V., PRASANNA, S. L. *Streptomyces*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, cap. 15. 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-823414-3.00005-8

ORENES-PINERO, E., Garcia-Carmona, F. Sanchez-Ferrer, A. Kinetic characterization of diphenolase activity from *Streptomyces antibioticus* tyrosinase in the presence and absence of cyclodextrins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47, 143–148. 2007.

OUSAAADI, M. I. *et al.* Valorization and optimization of agro-industrial orange waste for the production of enzyme by halophilic *Streptomyces* sp. *Environmental Research*. Volume 201, 2021.

PESSOA-JR, A. et al. Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V.; PESSOA-JR, A. (Coord.). *Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial*. 2ª ed. São Paulo: BLUCHER, p.67-103, 2020.

PHILIPPS-WIEMANN, P. et al. Proteases—general aspects. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Elsevier- Academic Press. p. 257–266. 2018.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*. V. 62, nº3, p. 5997-635. 1998.

SALWAN, R., SHARMA, V. Bioactive compounds of *Streptomyces*: Biosynthesis to applications. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 64. Cap. 15. 2020. DOI: 10.1016/B978-0-12-817903-1.00015-2

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 4, n. 2, p. 0181–0188, 2018.

SARKAR, GARGI & K, SUTHINDHIRAN. Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25. 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101590.

SHAIK, M., SANKAR, G. G., RAJITHA, M. I. P. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. Vol 15, 1, Pg 87-94, 2017.

SHARMA, P. DUTTA, J., THAKUR, D. Chapter 21 - Future Prospects of Actinobacteria in Health and Industry. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications.* Pg. 305-324. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00021-7

SHOLKAMY *et al.* Antimicrobial quercetin 3-O-glucoside derivative isolated from *Streptomyces antibioticus* strain ess_amA8. *Journal of King Saud University – Science.* 2020.

SILVA, O. S. *et al.* Novel Protease from *Aspergillus tamaraii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Advances in Enzyme Research*, v. 4, n. 4, p. 125–143. 2016.

SONG, Y. *et al.* Identification and antioxidant activity of bovine bone collagen-derived novel peptides prepared by recombinant collagenase from *Bacillus cereus*. *Food Chemistry*, Volume 349, 2021.

SOUZA, P. M. *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* vol.46 no.2 São Paulo Apr./June, 2015

SRIVASTAVA, NEHA & MISHRA, P.K. & UPADHYAY, S.N.. (2020). Proteases: an unexplored enzyme for biomass conversion. 10.1016/B978-0-12-821010-9.00008-5.

SUPHATHARAPRATEEP, W. *et al.* Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *New Biotechnology*, Volume 28, 6, 2011.

UBIERGO, P., E LAPP, M. Caracterização morfológica de sementes de algumas espécies dos gêneros *Cassia* L. e *Senna* Mill. (*Leguminosae* Juss.). *Rev. Fac. Agron.* vol. 24 no. 3 Caracas set. 2007.

USAMAH, A. *et al.* Sun-082 effects of oral collagen peptides on nutritional status of peritoneal dialysis patients. *Kidney International Reports.* v. 4, n. 7. S188-S189. 2019.

VITOLO, M. Enzimas: as proteínas catalisadoras. *In: VITOLO, M.; PESSOA JR., A.; SOUZA, G. M.; CARVALHO, J.C.M.; STEPHANO, M.A.; SATO, S. Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial.* São Paulo: Editora Blucher, Cap. 5, p.203-228. 2015.

WANDERLEY, M. C. A. *et al.* Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology.* v. 48, n.1. 2017.

YAGODA, M. R. *et al.* A Nutritional Supplement Formulated with Peptides, Lipids, Collagen and Hyaluronic Acid Optimizes Key Aspects of Physical Appearance in Nails, Hair and Skin. *Nutrition & Food Sciences.* v.5. 2014.

YAMANAKA, H. *et al.* A multicenter, randomized, controlled study of the use of nutritional supplements containing collagen peptides to facilitate the healing of pressure ulcers. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism.* v. 8. p. 51-59. 2017.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. *Mycopathologia.* v. 171, n. 5. p. 299-323. 2011.

ZHUANG, Y. *et al.*, Antihypertensive Effect of Long-Term Oral Administration of Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) Collagen Peptides on Renovascular Hypertension. *Mar Drugs.* 2012. DOI: 10.3390/md10020417

ZUÑIGA, A. D. G. *et al.* Revisão: Técnicas Usadas No Processo De Purificação De Biomoléculas Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos. 2003. DOI: 10.5380/cep.v21i1.1149

L.Yang,L.Zhang,Chemicalstructuralandchainconformationalcharacterizationofsome bioactivepolysaccharidesisolatedfromnaturalsources,Carbohydr.Polym.76(2009)34 9361

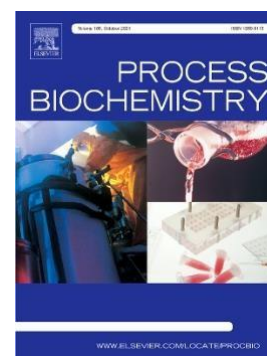
C.W.Vendruscolo,C.Ferrero,E.A.G.Pineda,J.L.M.Silveira,R.A.Freitas,M.R.Jimenez- Castellanos,T.M.B.Bresolin,Physicochemicalandmechanicalcharacterizationofgalact omannanfromMimosascabrella:effectofdryingmethod,Carbohydr.Polym.76(2009)8 693.

M.A.Pollard,B.Eder,P.Fischer,E.J.Windhab,Characterizationofgalactomannansisolate dfromlegumeendosperms ofCaesalpinioideaeandFaboideaesubfamiliesbymultidetec tionaqueousSEC,Carbohydr.Polym.79(2010)70–84.

CAPÍTULO I

Artigo a ser submetido na Revista

Process Biochemistry



**Effect of low frequency ultrasound-assisted hydrolysis on collagenolytic activity of
a protein purified from *Streptomyces parvulus*: Purification and characterization**

Effects of low frequency ultrasound-assisted hydrolysis on collagenolytic activity of a protein purified from *Streptomyces parvulus*: Purification and characterization

Maria Ercilia L. Barreiro¹, Kethylen Barbara Barbosa Cardoso^{1,2}, Juanize Matias Batista², Walter Soares Azevedo¹, Thiago Pajeú Nascimento², Thiago Barbosa Cahú³, Ranilson de Souza Bezerra³, Ana L. F. Porto², Romero M. P. Brandão-Costa¹.

¹Laboratory of Advances in Protein Biotechnology (LABIOPROT), Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco - UPE, PE, Brazil.

²Department of Animal Morphology and Physiology, Laboratory of Bioactive Products, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, PE, Brazil.

³Department of Biochemistry, Enzymology Laboratory, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego.
1235, Recife, PE 50670-901, Brazil

* Corresponding author:

Prof. Dr. Romero Brandão, Ph.D.

Laboratory of Advances in Protein Biotechnology (LABIOPROT), Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco - UPE, PE, Brazil.

E-mail address: romero.brandao@upe.br

Abstract

Proteases are a large group of enzymes in high demand due to their wide and different biotechnological applications mainly in biomedical field. In recent years, ultrasound (US) has been used successfully in a several number of Bioprocesses in the area of biotechnology, such as in the improvement (upregulation) of enzymatic hydrolysis (biocatalysis). The objective of this work was to purify an enzyme from *Streptomyces parvulus* and to characterize through physic-chemical applications including ultrasound effect. The purified protease has a molecular weight of 78.0 KDa, a yield of 31% and 11.8 fold. The partially purified protease was stable between pH 4-9, optimum pH at 7.5, stable between temperature of 0-45°C, and showed optimum temperature at 45°C, exhibited enhanced activity with Ca^{2+} and Mg^{2+} , and was inhibited by PMSF. US in the treatment or pre-treatment of enzymatic reactions showed to be favorable and increase the activity around 65% for the optimum temperature 45°C. Besides, the US improved the enzyme reactions for all assays. The purified enzyme was successfully immobilized in chitosan film but not in *Cassia grandis* polysaccharide film. Thus, the present work demonstrated the promising results of a protease with collagenolytic activity in the field of Biotechnology by proving the positive effect induced by ultrasound.

Keywords: enzyme; biotechnology; catalytic efficiency; application; production.

1. Introduction

The actinomycetes are a large group of filamentous bacteria that are adapted for growth in soil by forming a ramifying network, called a mycelium. Within this group the predominant isolates belong to the genus *Streptomyces*, which produce a well-developed branched mycelium on agar plates, resulting in a compact colony. In the vegetative phase, the filaments often lack cross-walls (substrate mycelium) and thus have several copies of the chromosome. When the colony ages, a characteristic aerial mycelium is formed, in response to unknown signals involving nutrient limitation, which subsequently fragment and/or sporulate by the synchronous formation of cross-walls in the multinucleate sporophores followed by separation of the individual cells directly into spores.

Proteases are very important group of industrial enzymes and are used extensively in various industries including leather, textiles, detergents, cheese, meat tenderization, baking, dehairing, brewery, organic synthesis and waste water treatment (Sun et al., 2019). These enzymes are used in the recovery of silver ions from used photographic film and in digestive aids. Alkaline proteases are important group of enzymes that specifically hydrolyze proteins into peptides and amino acids and involved catalysis of peptide synthesis.

Several processes have been developed to optimize the activity of proteases, due to its vast potential for biotechnological applications. This happens, since in the enzymatic reaction the traditional catalysis can present disadvantages, such as low enzyme utilization rate, low substrate conversion rate, long reaction time and extensive energy consumption (Soares et al., 2019). Thus, it is directly related, for example, to the inadequate conformation of the protein, reducing the susceptibility to attack enzyme-substrate bonds (Wang et al., 2018). Ultrasound has its effects mainly through a phenomenon called cavitation. Cavitation is the formation, growth and sometimes the

implosion of microbubbles created in a liquid when the ultrasound waves try to propagate through it (Luo et al., 2019).

Previous studies demonstrated high-frequency and low-intensity ultrasound (>1 MHz, <1 W/cm²) are often used to characterize the physical and chemical properties of proteins structural changes, such as conformational changes. Similarly, low-frequency and high-intensity ultrasound (20–100 kHz, 10–1000 W/cm²) are often used to analyze the impact of instrument on chemical engineering technology. Among the emerging technologies in food processing, high pressure processing, high pressure homogenization, microwaves and ultrasound were already proposed to promote enzyme activation and stabilization. (Soares et al., 2020).

Enzyme immobilization refers to a process that confines or localizes the enzyme in a certain defined region of space whilst retaining the catalytic activity, and which can be used repeatedly and continuously [52,53]. The most common procedures include enzyme entrapment, protein cross-linking or covalent coupling on a solid support [54], which can be understood as a form of chemical enzyme modification [50]. To define the success of immobilization it is necessary to consider: the enzyme, the support (matrix) and the mode of attachment of the enzyme to the support.

Chitosan has been widely studied regarding its properties as a biomaterial with bacteriostatic, hemostatic, nontoxic and healing effects. Polysaccharide composites such as chitosan-based membranes are suitable for many applications as biomedical devices and their utilization can be profitable, especially when their raw ingredients are by-products of other processes. The choice of natural polymers or related carbohydrate groups used as constituents in polysaccharide-containing composites allows their unique properties to be combined, producing products that are more compatible with novel

biotechnological/biomedical approaches. Such composite membranes are more likely to have desirable properties for wound healing applications (Cahú et al., 2017).

Ultrasound technology, as a new processing and improvement technology, has attracted a lot of attention in assisted extraction of bioactive components and in assisted enzymatic hydrolysis. One of these methods is the use of short-wave ultrasound (Wang al., 2018). The frequency of ultrasound is one of the most important points that affect the efficiency of the reaction, therefore, the development of a more efficient method to accelerate the speed of the enzymatic reaction and overcome the above inconveniences is in great demand (Costa-Junior et al., 2020).

Thus, this research aimed to address the action of ultrasound on catalytic efficiency, seeking favorable results to the biotechnological process.

2. Methodology

2.1 Microorganism and fermentation medium

The microorganism used in this research was *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was isolated from lichens in the Amazon Region and belongs to the DPUA culture collection (Department of Parasitology, Federal University of Amazonas), kindly provided by Prof. Maria Francisca Simas Teixeira. The isolated microorganism was maintained in ISP-2 medium (Pridham et al., 1957) with 10% glycerol at -20°C.

To produce collagenolytic protease, the MS-2 medium was used (Porto et al., 1996), pH 7 autoclaved at 121°C/1atm, for 20 minutes. Erlenmeyer's (250 mL) containing 100 mL of culture medium were used, with the inoculum corresponding to 10^8 CFU/mL.

2.2 Protease activity

Protease activity was measured as described by Ginther [22]. Assay mixtures of 1.0 mL containing 0.2 M Tris-HCl pH 7.2, 1.0 mM CaCl₂, 1% Azocasein and 150 μ L of collagenase purified, were incubated at 37 °C for 1 h. After stopping the reaction by adding 1.0 mL of 10% trichloroacetic acid, samples were centrifuged at 8000 xg for 15 min, and 0.8 mL of the supernatant was transferred into a second tube containing 0.2 mL of 1.8 M NaOH. Finally, samples were blended in a vortex mixer, and the absorbances were measured at λ 420 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme responsible for a 0.1 increase per hour in the absorbance.

2.3 Collagenolytic activity

The collagenase activity was performed using the Azocoll method described by Chavira et al (1984). Azocoll was washed and suspended in a 0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 1.0 mM CaCl₂ up to a final concentration of 2.0 mg/mL. Thereafter, 50 μ L of sample and 950 μ L of buffer were mixed with 5 mg of Azocoll suspension in a 1.0 mL reaction tube and incubated at 37 °C in a water bath at 60-minute. After, samples were chilled in ice for 5 min to stop the reaction and centrifuged at 8000 g and 4 °C for 20min. The absorbance of the supernatant was measured at λ 550 nm by means of a UV- VIS spectrophotometer. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme per mL of sample that led, after 60 min of incubation, to an absorbance increase of 0.001 at λ 550 nm, because of the formation of azo dye-linked soluble peptides. The specific activity was calculated as the ratio of the enzymatic activity to the total protein content of the sample, and expressed in U/mg.

2.4 Protein determination

The protein content of the samples was determined by the methods of Smith et al. (1985), using bovine serum albumin as standard.

2.5 Ion-Exchange chromatography: Purification process

Purification of the protease with collagenolytic activity was based on a two-step procedure. The crude extract was initially precipitated with 70% concentration of acetone. The precipitated fraction was collected by centrifugation at 10,000 rpm, 4°C for 20 min. The supernatant was discarded, and the pellet was collected and re-suspended in the minimal volume of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5. To obtain the protease with collagenolytic activity, an anionic chromatography on QAE-sephadex G-50 resin was used to separate protein fractions eluted by Tris-HCl buffer pH 7.5 added by 0.15 M NaCl on a 1.0 x 12cm glass column. The protein profile of separation was evaluated at 215 nm and 280 nm.

2.6 Characterization of a purified protease from *S. parvulus* by physic-biochemical parameters

Effect of temperature and pH

The influence of pH on the enzyme activity of protease was determined with azocasein 1% (w/v) as substrate. The activity was determined at varying pH values ranging from 2.0 to 10.0 at 30°C for 10 min using different buffer systems. The pH stability studies were performed by pre-incubating the purified enzyme without substrate in pH values ranging from 2.0-12.0 at 25°C for 2 h and the residual proteolytic activity was determined under standard assay conditions.

The effect of temperature on protease activity was determined by estimating the protease activity at pH 7.5 within a temperature range of 10–100°C for 30h using

Azocasein as substrate. The thermal stability of the protease was determined by pre-incubation of crude enzyme preparation (pH 7.5) at different temperatures (10-100 °C) for 30 min without substrate. The residual proteolytic activity was determined under standard assay conditions.

Effect of metal ions, Surfactants, and Inhibitors.

The impacts of various metal ions (5 and 10mM) on enzyme activity were determined by pre-incubating the enzyme preparation for 30 min at 25°C in different ionic solutions: $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Ca^{2+}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mg^{2+}), $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Mn^{2+}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{2+}), $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+}) and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn^{2+}). Thereafter, protease assay was performed at 45°C and pH 7.5. Relative activity was determined by considering the activity of the enzyme without any metallic ions as 100%.

The type of protease was determined by using the following inhibitors: ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), phenylsulfonyl fluoride (PMSF), Pepstatin A, Iodoacetic acid, DTT and b-mercaptoethanol. Protease was pre-incubated with each inhibitor, 5.0 and 10mM, in 0.1 mM tris-HCL buffer (pH 7.5) for 30 min at 25°C. The control was pre-incubated without any inhibitor and the residual activity was calculated.

The effect of different surfactants: 5 and 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween-20 (Polyoxy ethylene sorbitanmonooleate), Tween-80 (polyethylene glycol sorbitanmonooleate) were assessed on the proteolytic activity of the enzyme produced by *S. parvulus*. The enzyme was preincubated for 1 h in the above surfactants at 25°C and pH 7.5. A control was kept with the enzyme and the substrate without detergents and the value of the control activity was considered as 100%.

2.7 Characterization of catalytic properties by Ultrasound exposure

Technique was achieved according to Ovsianko et al., (2005) with modifications. Briefly, for the ultrasound treatment, microtubes (1000uL) containing the purified enzyme were distributed in a plastic shelve and placed in the center of ultrasonic water bath (Unique 1850A, Indaiatuba, Brazil), with internal dimension of 30x15x10 cm, ultrasound frequency of 40 kHz and potency of 155 Watts RMS. The samples were completely immersed in the water and the exposure time corresponded to 60 min in different temperatures (30 – 50°C). The experiments comprised too the submission of enzyme activity in the presence of best conditions achieved in the section of biochemical characterization. All assays were done in triplicate.

2.8 SDS-PAGE

The purified protease was submitted to molecular weight analysis by SDS-PAGE using separation in 10% gel and stacking in a 5% gel, according to the method of Laemmli (1970). The gel was stained using 0.5% Blue R-250 in methanolic solution and destained by 20% acetic acid solution. Molecular Weight Marker Kit, lyophilized powder, for Molecular Weights 14,000-169,000 was purchased from Sigma-Aldrich.

2.9 Fabrication of chitosan (CH) film and enzyme immobilization procedure

Films were prepared by the solution-casting technique according to Cahu et al., (2017). Two percent chitosan (w/v) was dissolved in 1% acetic acid solution (w/v) and kept at room temperature in glass flasks for 24 h to remove air bubbles. Then, an aliquot of 0.25 mL of chitosan solution was placed in circular polystyrene molds and kept in an oven at 50°C for solvent evaporation. After 1 h, the films were washed with 70% alcohol in 0.3M NaOH solution to neutralize and remove acetate residues and then washed with

70% ethanol (v/v) in water until neutral. The films were dried again for 10 min and kept in sealed, sterile dishes until use.

Films containing purified protease were prepared similarly, but after the final washing and drying, 0.25 mL of a purified protease solution (1.0 mg/mL) were added and the films were dried again. The capacity of the films to release their components was determined by immersing the different films in PBS at 37 °C, and then, protein measurements and protease activity were determined by spectrophotometer method. The degree of releasing (%) was calculated measuring the initial protein content of dry films and after being immersed in PBS for 1 h. Five samples were analyzed in each test and all testing occurred at room temperature (approximately 25 °C).

Enzyme immobilization on chitosan was performed according to Elchinger et al. (2015). Briefly, once 96-well microplate was coated, the chitosan films were neutralized using Milli-Q water and then 0.1 M sodium phosphate buffered (pH 8.0). The film was activated by 200 μ L of glutaraldehyde solution (27.5 mM) in 0.1 mM sodium phosphate buffered (pH 8.0) for 2 h at room temperature. Next, each well was supplemented with 200 μ L of enzyme solution at appropriate concentration and incubated for 12 h at 4°C. The plate was then washed with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH8.0) and dried at room temperature for two days. The supernatant solutions (before the reaction, during the reaction, after the reaction and washing solutions) were evaluated by the BCA assay using BSA as a standard. The amount of enzyme immobilized on the film was calculated by subtracting the amount of protein in the supernatant before and after immobilization. Protease activity was determined according to the method described previously.

2.10 Statistical analysis

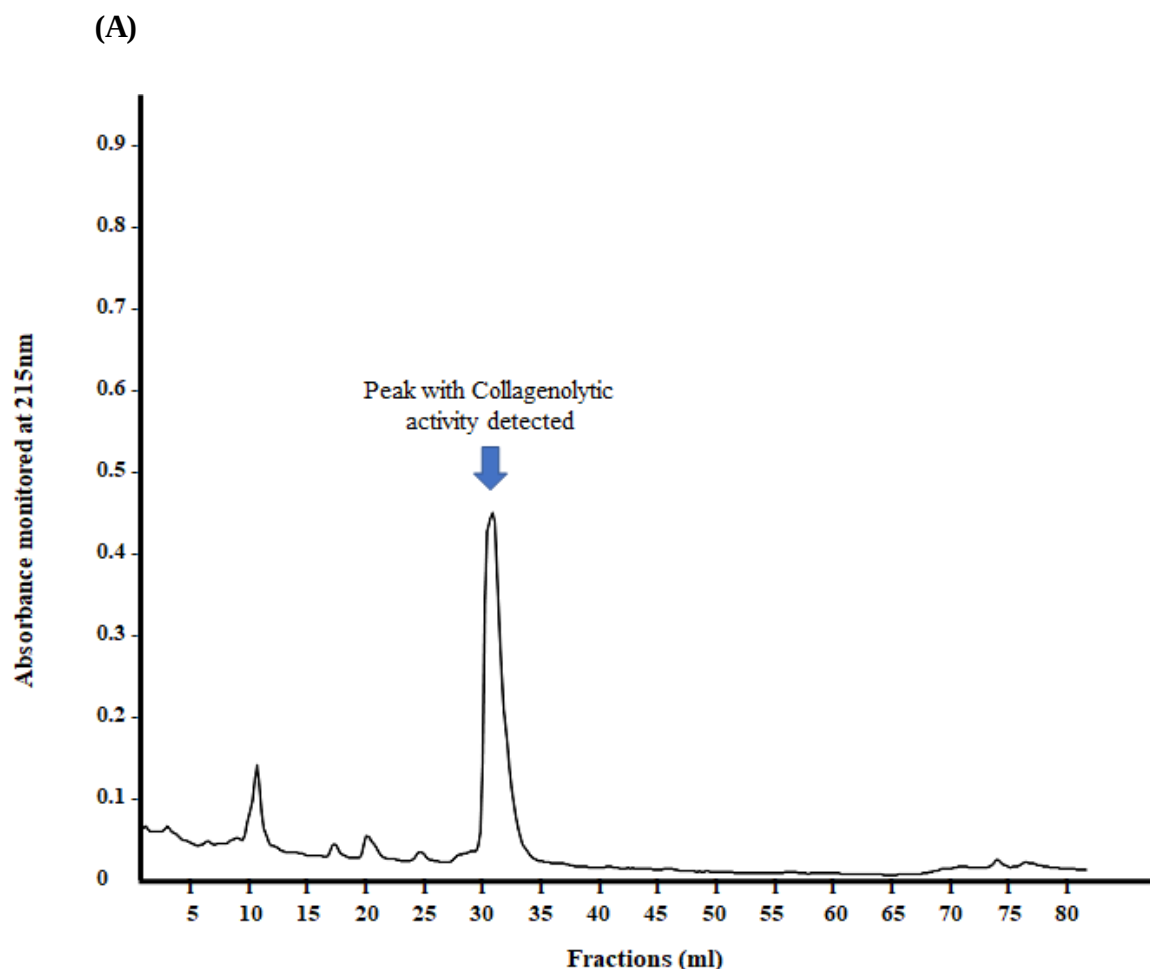
Statistical analyses were done by standard deviation of triplicate assays.

3. Results and Discussion

3.1 Isolation, steps of purification and SDS-PAGE of a protease with collagenolytic activity obtained from *S. parvulus*.

Streptomyces is a great producer of proteolytic enzymes. It is assumed that extracellular proteases produced in actinomycetes participate in the assimilation of the extracellular proteinaceous nitrogen sources. In this work, a protease was isolated and purified from *Streptomyces parvulus* using two-steps of separations techniques. *Streptomyces* species produce multiple proteases in the culture medium.

Figure 1 shows the purification process of a protease with collagenolytic activity obtained from *Streptomyces parvulus* through submerged fermentation technique. An anionic resin of QAE-Sephadex G50 was used and revealed a single peak with activity.



(B)

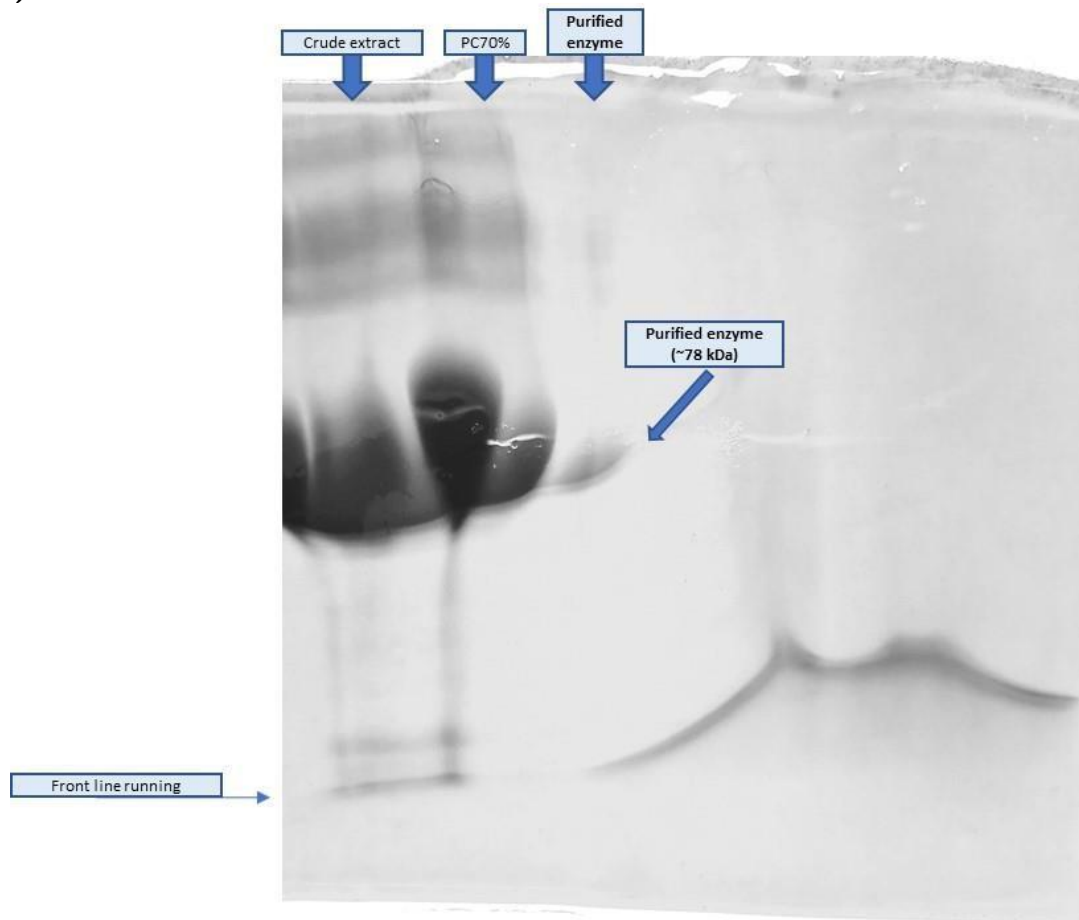


Figure 1. (A) Purification chromatogram of a protease obtained from *S. parvulus* using QAE-Sephadex G50 ion exchange resin. **(B)** SDS-PAGE 10% of an enzyme purified from *S. parvulus*. Silver stained technique was used to visualize the protein bands.

Purification is very important step in order to study the biochemical, biophysical and structural characteristics as well as applications of the specific collagenases. Very few reports are available on microbial collagenase purification where, collagenases from *Bacillus licheniformis* F11.4, *Pseudomonas* sp. SUK, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas marinoglutinosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Rathayibacter* sp., *Penicillium aurantiogriseum* URM4622, *Bacillus cereus* MBL13, *Clostridium histolyticum*, *ibrio vulnificus*, *Thermoactinomyces* sp. E21, *Alicyclobacillus sendaiensis*, *Bacillus pumilus* Col-J were purified and characterized (Baehaki et al., 2012; Bhagwat et al., 2016; Hamdy,

2008; Hanada et al., 1973; Kato et al., 1992; Labadie and Hebraud, 1997; Lima et al., 2013; Liu et al., 2010; Matsushita et al., 1999; Miyoshi et al., 1998; Petrova et al., 2001; Tsuruoka et al., 2003; Wu et al., 2010). Numerous procedures have been used for the purification of microbial collagenases such as ammonium sulfate precipitation, dialysis, ultrafiltration, ion exchange chromatography, immobilized metal affinity chromatography, gel filtration chromatography, amylose affinity chromatography and removal of N-terminal tag (Bhagwat et al., 2016; Ducka et al., 2009).

The purification of enzyme preparations was controlled by electrophoresis in gradient polyacrylamide gel SDS-PAGE 10%. It was shown that enzyme migrated as a single band (fig. 1B). The band of protease corresponds to an apparent mol. WT of 78 kDa.

3.2 Analysis of physical-biochemical parameters on enzyme activity

pH and temperature effect on protease activity

The biochemical characteristics of the purified enzymes have been analyzed, including their capacity to complement the action in presence of several conditions. Through pH analysis, the optimum pH of purified protease was assayed between pH 7-8. The highest activity was observed at pH 7.5 (Fig. 2). Similar result was reported by Srividya, [38] with a pH of 8.0 to be the optimal for fungal proteases activity of *Streptomyces sp.* The protease produced appeared to be alkaline, which is expected for proteases produced by *Streptomyces* [29].

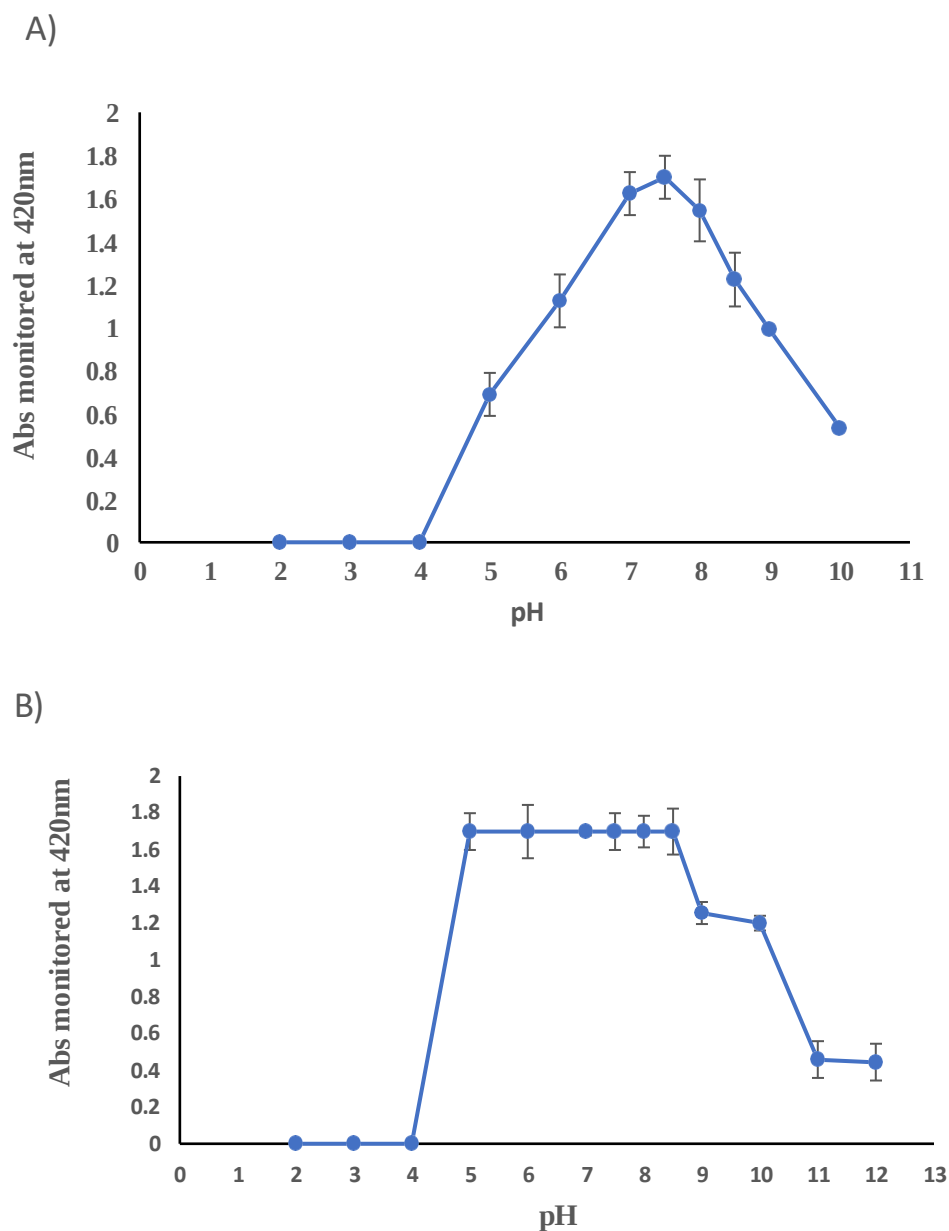


Figure 2. Effect of pH on enzyme activity. A) Analysis of optimum pH at a range of 2-10. B) Analysis of pH stability at a range of 2-12. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays.

The effect of temperature on the activity of protease was determined at various temperatures ranging from 10–100°C. The optimum enzyme activity of purified protease was at 45°C. Increase in temperature affected protease activity with the least at 60°C.

Reports of Ja'afaru et al. [11] had similar observations as temperature of 45°C was optimal for protease activity from *Streptomyces albidoflavus*. Protease exhibited valid stability over the temperature ranging between 10-50°C (Fig. 3); the optimal temperature was at 45 °C.

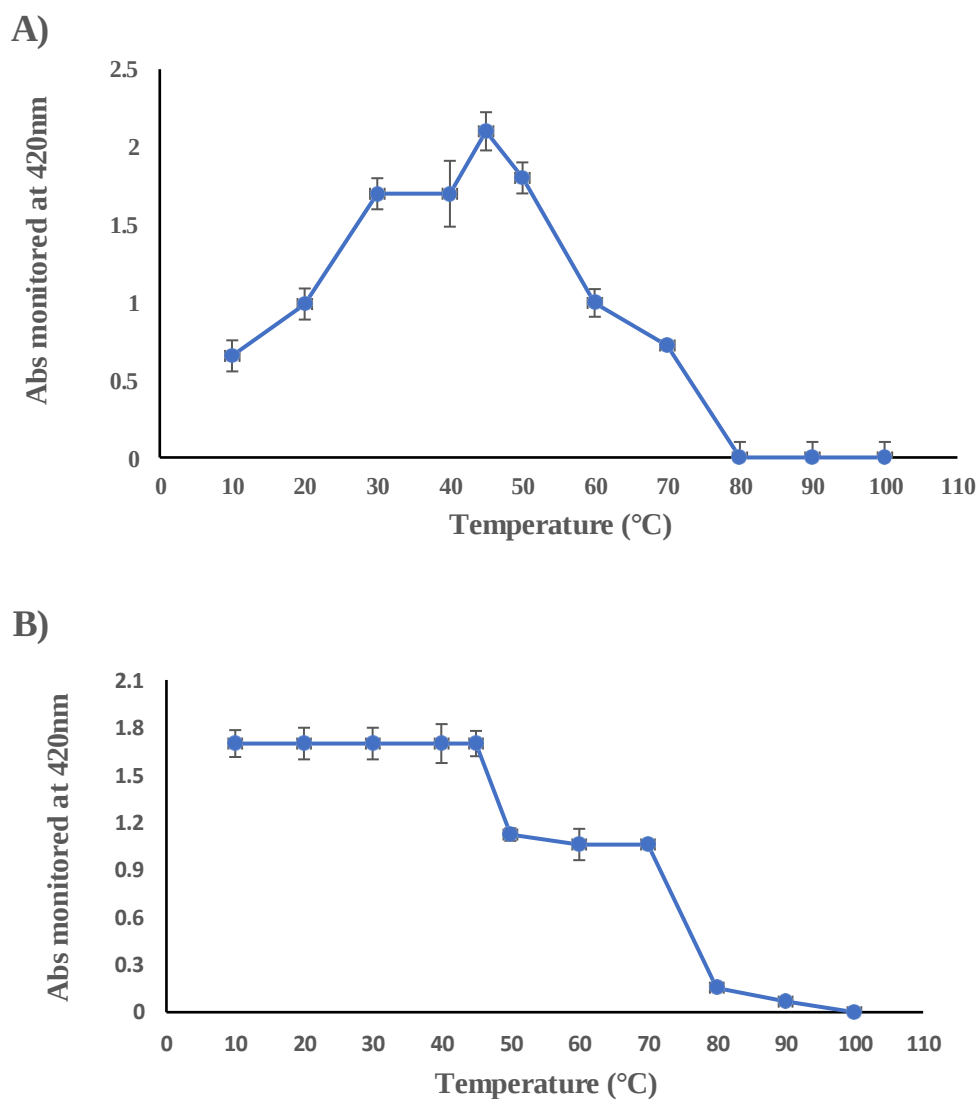


Figure 3. Effect of temperature on enzyme activity. **A)** Letter A presented the optimum temperature at a range of 10-100°C. **B)** Temperature stability at a range of 10-100°C. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays.

The residual activity of the enzyme showed a declining trend between 50 and 60 °C. The stability at higher temperature of this protease could enhance their potential applications in industries.

Effect of ions, surfactants, and protease inhibitors on enzyme activity

The effect of various metal ions on enzyme activity and stability were assessed (Table 1). Protease activity was enhanced by Ca^{2+} and Mg^{2+} (34 and 12%) and inhibited by Fe^{2+} and Cu^{2+} (65 and 19%). Best enzyme activity and stability was obtained with Ca^{2+} with an increase in activity suggesting that metal ions had a compatibility with enzyme. Similar observation had been reported by Kavitha et al (2021) for *Streptomyces thermolineatus* VITKV6A. Ca^{2+} ion largely contribute to the stability of enzyme against thermal denaturation and self-digestion and also maintained the active conformation of the enzyme at high temperature but are not required for their catalytic functions (Sandoval-Powers et al., 2021).

Table 1. Screening of metal ions, protease inhibitor and surfactants on purified enzyme activity from *Streptomyces parvulus*.

Purified enzyme: sample control → Abs measured at 420nm = 1.500 AU	Residual activity (%)
Metal ion	10mM
Control	100 ± 0.3
Ca^{++}	134 ± 3.0
Zn^{++}	100 ± 2.8
Fe^{++}	35 ± 1.7

Mg ⁺⁺	112 ± 2.5	
Cu ⁺⁺	81 ± 3.8	
Na ⁺	100 ± 0.5	
K ⁺	100 ± 1.6	
Cu ⁺	100 ± 3.6	
Inhibitor		
	10mM	20mM
Control	100 ± 0.3	100 ± 0.3
EDTA	100 ± 3.3	100 ± 3.2
PMSF	21 ± 4.6	8 ± 2.1
Pepstatin A	100 ± 2.5	100 ± 3.2
Iodoacetic acid	100 ± 1.5	100 ± 2.2
DTT	26 ± 2.8	0
b-mercaptoethanol	62 ± 3.5	0
Surfactants		
	5%	10%
Control	100 ± 0.3	100 ± 0.3
SDS	100 ± 1.2	82 ± 4.2
Tween 80	100 ± 2.6	93 ± 3.5
Tween 100	100 ± 2.8	91 ± 1.5

* Standard deviation (±SEM) obtained from triplicate assays.

Still in table 1, the effect of inhibitors and surfactants on enzyme activity was studied. Protease activity was inhibited by both PMSF, DTT and b-mercaptoethanol (92, 100 and 100%). Similar observation was reported by Sandoval-Powers et al. (2021) who stated that EDTA was observed to be an effective inhibitor, causing a considerable decrease in protease activity produced by *Streptomyces poriferorum*.

3.2 Effect of Ultrasound on enzymatic catalysis

The native enzyme is maintained by a delicate balance of non-covalent forces, such as hydrogen bonds, ion pairing, hydrophobic interactions and van der Waals strength. Thus, for example, with the increase in temperature, radiation or mechanical wave action such as ultrasound, these interactions are disrupted and/or modified in position and the protein unfolds (Soares et al., 2019). The degree of unfolding of an enzyme can be observed by calorimetry, fluorescence, circular dichroism spectroscopy, viscosity and migration (Luo et al., 2019). Some enzymes recover their active conformation after cooling, however, for most, denaturation is irreversible. Unfolded enzymes form dispersed structures that can aggregate. This aggregation occurs when hydrophobic residues, which normally stay inside the native molecule and are exposed to the solvent, as a result of structural modification, interact with other hydrophobic residues in other chains (Malani et al., 2019).

Figure 4 shows the effect of US on enzyme activity. For this assay, the substrate Azocoll was used. Figure 4A demonstrated at 30°C in presence of US, the enzyme activity increased about 48%. The absorbance at the final point was 0.900 at 60 min compared to 0.635 in US absence. Authors prefer to insert the results in absorbance because several papers brought analysis of enzymatic activity in different forms. In our study, the activity was calculated as an increase of 0.001 in absorbance at 550nm. So, still in figure 4, the results for figure 4B presented the best activity to purified enzyme. An increased about 64% was visualized. The optimum temperature (45°C) was improved more and more.

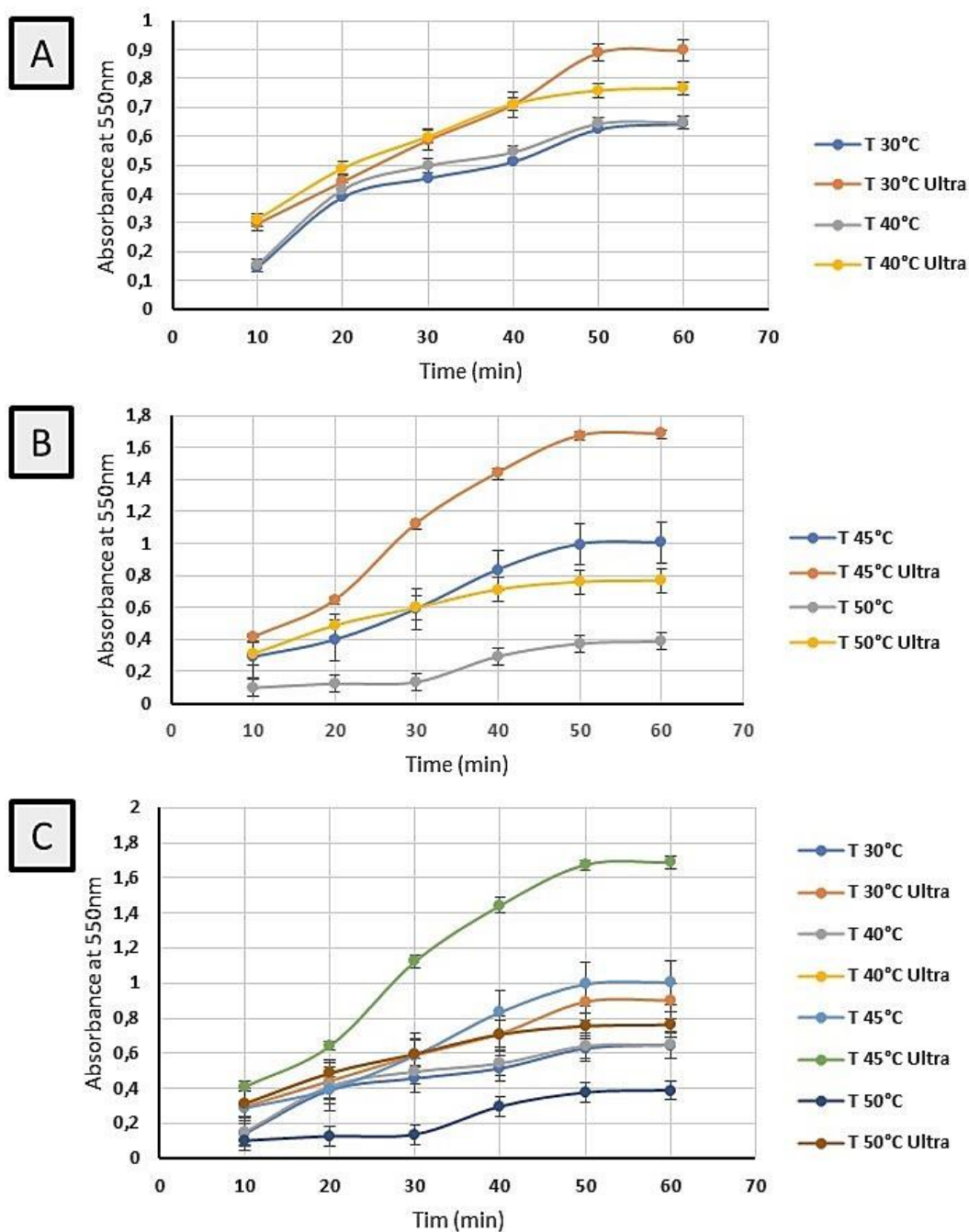


Figure 4. Analysis of catalytic activity of a protease with collagenolytic activity obtained from *S. parvulus* using QAE-Sephadex G50 ion exchange resin through Ultrasound performance. (A) Thermo analysis of catalytic activity in presence of ultrasound – Temp. at 30°C and 40°C. (B) Thermo analysis of catalytic activity in presence of ultrasound – Temp. at 45°C and 50°C. (C) All lines after ultrasound effect on enzyme activity. Standard deviation ($\pm$ SEM) obtained from triplicate assays.

According to Osvianko 2018, under the effect of US, trypsin does not undergo covalent modifications or conformational changes, which may be accompanied by a decrease in activity, and trypsin showed a lower resistance to proteolytic degradation (maximum molar yield reached 30%). Donnel et al., 2010, reports several studies demonstrate the inactivation of enzymes by ultrasound treatment. However, has been demonstrated that the effects of ultrasound on enzyme activity include both activation and inactivation results, but the activation effect is reported by only a few reports.

Studies on assisted ultrasound in enzymatic reactions always aim to accelerate the reaction rate. Enzymatic reactions assisted by ultrasound are credible for both liquid-solid and liquid-liquid systems (Costa-Junior et al., 2020).

Enzymatic digestion assisted by ultrasound can be performed in a few minutes, even for complex samples. When combined with immobilized trypsin, ultrasound can accelerate the protein digestion of bovine serum albumin, α -lactalbumin, and ovalbumin by about 50% (Malani et al., 2019).

During the ultrasonic action, chemically, active radicals generated by ultrasonic cavitation, which can react with the enzyme's intermediate molecules in some reactions, thus improving and inducing the enzyme's activation (Dalagnol et al., 2017).

Table 2 presents the database containing articles that lead to the assertion that ultrasound does play an important role in the positive induction of enzyme activity. Costa-Junior et al., 2020 presented data that identified about 54% increase in the enzymatic activity of the protease obtained from the fungus *Aspegillus terreus* when compared to the control.

Table 2. Analysis to address the effect of ultrasound on enzymatic catalysis.

Action of ultrasound on enzymatic catalysis	Results	Author
Increased enzyme activity of pectinase, xylanase and cellulase. Ultrasound promoted catalytic efficiency at low temperatures for		Dalagnol et al., 2017

the enzyme pectinase, and at high temperatures for xylanase and cellulase.	
According to Wang, the physical and chemical effects of ultrasound have a positive effect on enzymatic reactions and contribute to the increase in the reaction rate.	Wang et al., 2018
Studies demonstrate the optimization of enzymatic extraction in the presence of ultrasound of <i>Lentinus edodes</i> polysaccharides.	Yin et al., 2018
Effect of enzyme-assisted extraction and ultrasound on the recovery of proteins and antioxidant compounds. Ultrasound combined with alkalase exhibited greater protein recovery.	Gorguc et al., 2019
Optimization of the response surface of enzyme-assisted extraction of enzymes. Optimal extraction conditions depend on temperature, time and ultrasonic power.	Luo et al., 2019
Biodiesel production through enzymatic catalysis assisted by ultrasound using a mixture of raw material of inedible oils.	Malaniet al., 2019
The maximum reaction speed shows a significant increase with sonication and addition of water with an increase in the enzyme-substrate affinity.	
Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase. Ultrasound increased sucrose hydrolysis at temperatures of 30 °C and 40 °C.	Soares et al 2019
Collagen hydrolysis catalyzed by an ultrasound-assisted enzyme to produce peptides with biomedical potential. Low frequency ultrasound in enzymatic activity with a view of applicability.	Costa-Junior et al., 2020
Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate and assisted reaction	Soares et al., 2020
Ultrasound-assisted enzyme renaturation for foam fractionation of laccase	Zhang et al., 2020
Extraction of low molecular weight peptides from bovine bone using ultrasound-assisted double enzyme hydrolysis	Yang et al., 2021
Ultrasound treatment improved the ethanol content by <i>S. cerevisiae</i> during fermentation	He et al., 2021
Effect of ultrasound-assisted enzyme treatment on the quality of chicken breast meat	Cao et al., 2021

In enzymatic reactions, ultrasound can act by altering the conditions of the medium, and disturbing weak bonds, inducing conformational changes in the structure of

proteins. This can lead to the inactivation of many enzymes, due to small changes in structure and environmental conditions, such as temperature, pressure, shear stress and pH (Gorguc et al., 2019).

Cavitation effects in combination with the frequency of irradiation can promote the formation of free radicals, which act by altering the cells and enzymes present in the medium. In the case of globular proteins, as in the case of enzymes, frequencies between 0-100 kHz are strongly absorbed and can lead to disruption of the structure. With the formation of hydroxyl radicals (OH) and the generation of heat during the collapse of bubbles, the stability of the biocatalyst can be affected, which is a limiting factor for combined ultrasound/enzyme applications (Wang et al., 2018).

The limiting factor for the use of ultrasound in biochemical reactions is the increase in temperature promoted by irradiation since enzymes can be thermally inactivated. Cao et al (2021) in their study revealed that ultrasound treatment improved the ethanol content by *S. cerevisiae* during fermentation where after 28 kHz of ultrasonic frequency, the ethanol production and the biomass increased by 30.79% and 24.10%, respectively compared to non-sonicated sample. However, this is not at all a negative factor since the thermal inactivation of enzymes is important in some biotechnological processes. It should be noted that inactivation does not occur in all cases, as the effect of ultrasound can be destructive or constructive depending on the intensity of the waves (Wang et al., 2018).

According to Yang et al. (2021) the molecular vibrations generated using high-power ultrasonic waves can promote the breaking of intermolecular chemical bonds, facilitate molecular movement, and accelerate the binding of enzymes to substrates. However, when high-ultrasonic power exceeding 600 W/L is used, the extraction rate begins to decrease because this setting disrupts the triple helical protein structure and

destroys the enzyme structure, thereby resulting in the inactivation of the enzyme and rendering it unsuitable for the subsequent hydrolysis of the substrate.

3.4 Immobilization in chitosan film

Over the last years, chitosan has demonstrated unparalleled characteristics for regenerative medicine applications. Beside excellent antimicrobial and wound healing properties, this polysaccharide biopolymer offers favorable characteristics such as biocompatibility, biodegradability, and film and fiber-forming capabilities. Having plentiful active amine groups, chitosan can be also readily modified to provide auxiliary features for growing demands in regenerative medicine, which is constantly confronted with new problems, necessitating the creation of biocompatible, immunogenic, and biodegradable film/scaffold composites. Figure 5 shows the preparation of Chitosan films with purified enzyme under covalent bonds by glutaraldehyde.

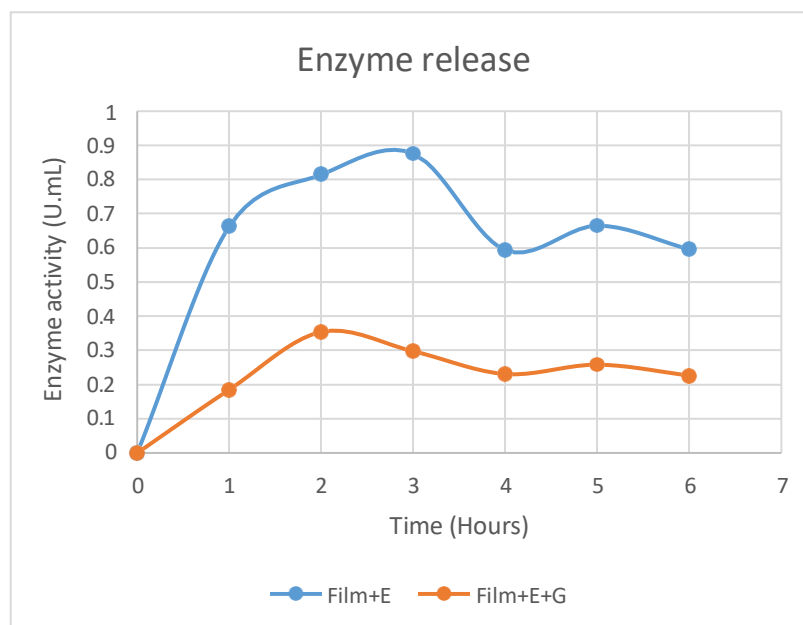


Figure 5. Preparation of Chitosan film. (A) Film in absence of purified enzyme. (B) Film in presence of purified enzyme after immobilization procedure.

The enzyme selectively screened as active on *S. parvulus* metabolic liquid, was immobilized on chitosan films. The amount of enzyme available for grafting was equivalent to the amount of enzyme tested in free-enzyme conditions. Figure presents the results of immobilized enzymes against free enzymes in the same conditions. Two

controls are also presented. The chitosan film control without enzyme and with enzyme is representative of bead mobility in wells coated with chitosan films and was designed to reveal the activity. Figure 6 shows the results about enzyme releasing assay and protein dosage after immobilization procedure.

(A)



(B)

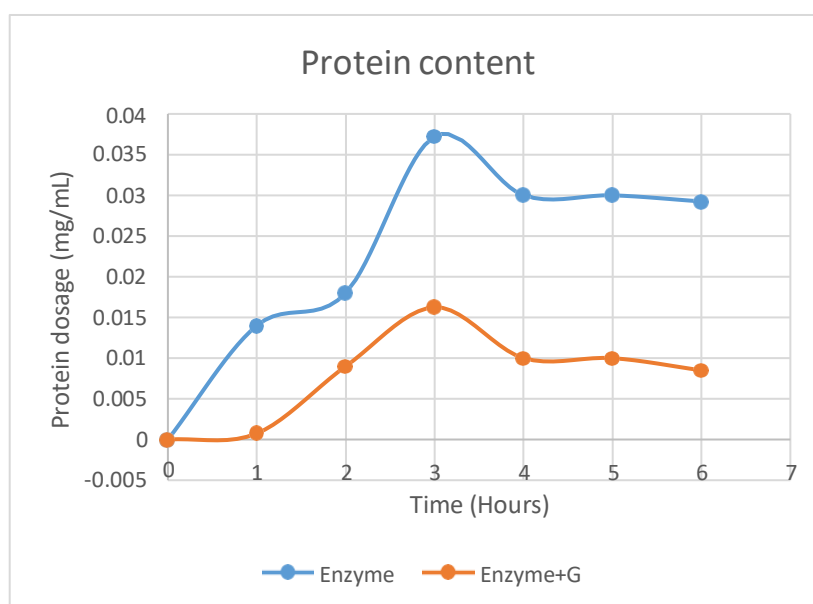


Figure 6. Analysis of chitosan-immobilized enzyme activity. (A) Enzyme activity releasing by detection of catalytic activity against azocasein substrate. (B) Determination of protein content in buffer solution after the time exposition.

Chitosan-immobilized enzyme showed lower enzyme activity releasing results compared to Chitosan in absence of glutaraldehyde. Enzyme activity of immobilized enzyme in chitosan was 26.4 %, while Enzyme encapsulated into chitosan without glutaraldehyde present of 70.4 %. These results suggest that under the experimental conditions of this study, the Chitosan plus enzyme interaction promotes the displacement of enzymatic molecules out of nanoparticles. This could be justified by the intermolecular hydrogen bonding formed between the electronegative oxygen atom of chitosan and the amino groups of enzymes. Therefore, the entanglement of enzyme with chitosan molecules hinders the encapsulation of enzyme in the particles by the steric repulsion mechanism.

Enzyme immobilization has also the advantages of allowing the enzyme to be easily separated from the medium and be reused, which can become the process economically viable Ribeiro et al., (2021). Also, Chitosan has gained considerable attention as support for enzyme immobilization. This biopolymer has several properties, such as renewable resource (chitin); biodegradability, antimicrobial activity, non-toxicity and film-forming ability. The presence of functional groups (amino and hydroxyl) enhances the interaction between the biopolymer and enzymes, which allows simple immobilization techniques, such as adsorption (physisorption or chemisorption). These functional groups can also interact with other compounds to improve the physicochemical characteristics of the support. In addition, chitosan is able of encapsulating enzymes, which provides effective protection against different operating conditions.

4. Conclusion

The present work demonstrated the efficiency technique aimed to purify and characterize a protease with collagenolytic activity from *Streptomyces parvulus* which would be to a large extent help in various industrial, biotechnological and environmental aspects. The ultrasound is widely used in the enzymatic reaction process in different

stages to improve the reaction rate and product yields. Thus, this research presented the potential benefits of the ultrasound treatment in the reaction rate and improvement of the catalytic efficiency, as well as the results presented to corroborate in the positive effect of the ultrasound, mainly in the specific interaction between the enzyme and different targets. Also, the enzyme proved to be immobilized in chitosan film with excellent features for biotechnological field.

Acknowledgements

The authors are thankful to the financing agencies Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and CNPq for funding this project.

No Conflict of Interest

Authors declare no conflict of interest.

5. References

Ahmet Gorguc, Cavit Bircan, Fatih Mehmet Yılmaz. **Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds.** Food Chemistry 283 (2019) 637–645

Ariana de Souza Soares, Pedro Esteves Duarte, Augusto Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, Camila Archett Nogueira, Érica Nascif Rufino Vieira, Frederico Augusto Ribeiro de Barrosa, Paulo Cesar Stringhet, Afonso Mota Ramos. **Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters.** LWT, Volume 107, 2019, pp. 158-163.

Ariana de Souza Soares, Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior, Alline Artigiani Lima Tribst, Pedro Esteves Duarte Augusto, Afonso Mota Ramos. **Effect of ultrasound on goat cream hydrolysis by lipase: Evaluation on enzyme, substrate, and assisted**

reaction. LWT - Food Science and Technology. LWT - Food Science and Technology 130 (2020) 109636

Bandyopadhyay, S., Saha, N., Brodnjak, U. V., & Saha, P. (2019). Bacterial cellulose and guar gum based modified PVP-CMC hydrogel films: Characterized for packaging fresh berries. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, Article 100402.

Batistaa, R. A., Espitiab, P. J. P, Quintansc, J. D. S. S., Freitas, M. M., Cerqueirad, M. A., Teixeirae, J. A., & Cardoso, J. C. (2019). Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems. *Carbohydrate Polymer*, 205, Article 106116.

Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Coelho, L.C.B.B., Carvalho Jr, L.B., 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.* 40, 1829–1834. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>.

Cahú, T. B., Silva, R. A., Silva, R. P., Silva, M. M., Arruda, I. R., Silva, J. F., Costa, R. M. P. B, Nader, G. B. & Bezerra, R. S. (2017). Evaluation of chitosan-based films containing gelatin, chondroitin 4-sulfate and ZnO for wound healing. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(3), 765-777.

Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho Jr, L. B., Nader, H. B. & Bezerra, R. S. (2012). Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47(4), 570-577.

Cao, Q., Zhang, Y., Chen, W., Meng, X., & Liu, B. (2018). Hydrophobicity and physicochemical properties of agarose film as affected by chitosan addition. *Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1307–1313.

Chen, G. G., Qi, X. M., Guan, Y., Peng, F., Yao, C. L., & Sun, R. C. (2016). High strength hemicellulose-based nanocomposite film for food packaging applications. *ACS Sustainable Chemistry Eng*, 4, 1985–1993.

Cheng, M., Wang, J., Zhang, R., Kong, R., Lu, W., & Wang, X. (2019). Characterization and application of the microencapsulated carvacrol/sodium alginate films as food packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 259–267.

Chaomin Yin, Xiuzhi Fana, Zhe Fana, Defang Shi, Hong Gao. **Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity.** *International Journal of Biological Macromolecules* 111 (2018) 446–454

Danli Wang, Lufeng Yan, Xiaobin Ma, Wenjun Wang, Donghong Liu. **Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems.** *International Journal of Biological Macromolecules* 119 (2018) 453–461

Lihua Yang, Zonglin Guo, Jieqiong Wei, Ling Han, Qun-li Yu, Haoyu Chen, Yaoxiang Chen, Wei Zhang. Extraction of low molecular weight peptides from bovine bone using ultrasound-assisted double enzyme hydrolysis: Impact on the antioxidant activities of the extracted peptides. *LWT - Food Science and Technology* 146 (2021) 111470.

Luíza M. G. Dalagnol, Vitória C. C. Silveira, Halisson Baron da Silva, Vitor Manfroí, Rafael C. Rodrigues. **Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters.** *Process Biochemistry*. 2017. p.09-17.

Osmar Soares da Silva, Elizane Melo de Almeida, Allan Henrique Félix de Melo, Tatiana Souza Porto. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 117, 1 October 2018, Pages 1081-1088.

PRIDHAM, T.G.; ADERSON, P.; FOLEY, C. et al. Selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces* *Antibiot. Ann.*, p.947-953, 1957.

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

Ribeiro, E. S., Farias, B. S., Cadaval-Junior, T. R. S., Pinto, L. A. A., Diaz, P. S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 183 (2021) 1959–1970.

Ritesh S. Malani, Sachin B. Umriwad, Karan Kumara, Arun Goyala, Vijayanand S. Moholkara. **Ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production using blended feedstock of non-edible oils: Kinetic analysis.** *Energy Conversion and Management* 188 (2019) 142–150.

Romualdo B. Costa-Junior, Romero M.P. Brandão-Costa, Wendell W. C. Albuquerque, Juanize M. S. Batista, Raquel B. Pedrosa, Ana L. F. Porto. **Ultrasound-Assisted Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Collagen to Produce Peptides With Biomedical Potential: Collagenase From *Aspergillus terreus* UCP1276.** *Bioelectromagnetics*, 2020, p. 21-35.

Supaluk Sorapukdee, Punnanee Sumpavapol, Soottawat Benjakul, Pussadee Tangwatcharin. Collagenolytic proteases from *Bacillus subtilis* B13 and *B. siamensis* S6 and their specificity toward collagen with low hydrolysis of myofibrils. *LWT* Volume 126, May 2020, 109307.

Vagne de Melo Oliveira, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Caio Rodrigo Dias de Assis, Juanize Matias da Silva Batista, Thiago Pajeú Nascimento, Juliana Ferreira dos Santos, Carolina de Albuquerque Lima, Daniela de Araújo Viana Marques, Ranilson de Souza Bezerra, Ana Lúcia Figueiredo Porto. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 24, March 2020, 101509.

Yuran Zhang, Youshuang Zhu, Zhanyan Liu, Shuqi Hu, Yongyu Wang, Yunkang Chang, Rui Li. β -Cyclodextrin and ultrasound-assisted enzyme renaturation for foam fractionation of laccase from fermentation broth of *Trametes hirsuta* 18. Journal of Molecular Liquids 298 (2020) 112028.

Xiaohu Luo, Renliu Bai, Deshuai Zhena, Zaibo Yang, Dena Huang, Haili Mao, Xiaofeng Lia, Hongta Zou, Yi Xiang, Kanglian Liu, Zhigang Wen, Cheng Fu. **Response surface optimization of the enzyme-based ultrasound-assisted extraction of acorn tannins and their corrosion inhibition properties.** Industrial Crops & Products 129 (2019) 405–413.

CONCLUSÃO DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

As proteases são um grupo complexo de enzimas ubíquas na natureza, pertencem a uma classe de hidrolases com imenso significado fisiológico e comercial, e formam um grande grupo de enzimas industriais com inúmeras aplicações em vários campos, além de serem amplamente exploradas devido à sua natureza bioquímica e alto rendimento de produção. Nesse trabalho evidenciou-se a capacidade de isolar, purificar e caracterizar uma enzima produzida por fermentação submersa utilizando o microrganismo *Streptomyces parvulus*. Além disso, a enzima purificada teve sua atividade catalítica amplamente induzida por ondas de ultrassom de baixa frequência corroborando com dados da literatura sobre a eficiência dessa técnica. Quando submetida ao ensaio de imobilização utilizando polissacarídeos como matriz, a enzima mostrou-se capaz de se ligar ao filme de quitosana obtida de carapaça camarão, proporcionando assim perspectiva de futura de aplicação na área biomédica.