

Primeiro relato de produção de colagenase por fungo isolado do solo da Caatinga - *Rhizopus microsporus* UCP 1296

First report of collagenase production by a fungus isolated from the Caatinga soil - *Rhizopus microsporus* UCP 1296

Primer informe sobre la producción de colagenasa por un hongo aislado del suelo de Caatinga - *Rhizopus microsporus* UCP 1296

Recebido: 26/08/2022 | Revisado: 06/09/2022 | Aceito: 10/09/2022 | Publicado: 18/09/2022

Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0107-2538>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: belealcoforado@hotmail.com

Maria Carolina de Albuquerque Wanderley

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9373-8159>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: mariacarolinawanderley@gmail.com

Ana Lucia Figueiredo Porto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar o fungo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga enfatizando o desenvolvimento e aplicação de processos biotecnológicos para produção de uma nova colagenase. Para tanto, parâmetros fermentativos significantes como: temperatura, pH, meio de cultura e tempo de fermentação foram avaliados. Amostras do microrganismo foram mantidas a 4 °C em meio ágar extrato de malte. O micélio foi suspenso em 5 mL de uma solução composta de NaCl e Tween 80. Após a inoculação feita com a suspensão de esporos contendo 150 µL (10⁶ esporos/mL), foi realizada a fermentação submersa em frascos *Erlenmeyer* contendo 250mL de gelatina. Uma curva de crescimento foi desenvolvida para identificar o melhor tempo de produção da enzima. Os resultados que a produção da colagenase ocorreu com 120 horas de fermentação, obtendo-se 550 U/mL de atividade colagenolítica e biomassa 0,42 g/L na fase estacionária, indicando que a colagenase produzida é um metabólito secundário. Um planejamento fatorial 2⁴ foi realizado para selecionar os melhores parâmetros onde foi avaliada a influência das variáveis: temperatura (°C), pH, agitação e concentração do substrato (gelatina). Com o resultado do planejamento fatorial obtivemos um aumento da produção enzimática cerca de 32%. Este é o primeiro estudo que descreve condições otimizadas de produção de colagenase por cepas de *R. microsporus*.

Palavras-chave: Colagenase; Fungo filamentosos; Bioprocessos; Inovação.

Abstract

The present work aimed to study the fungus *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolated from the Caatinga soil, emphasizing the development and application of biotechnological processes for the production of a new collagenase. Therefore, significant fermentation parameters such as temperature, pH, culture medium and fermentation time were evaluated. Samples of the microorganism were kept at 4 °C in malt extract agar medium. The mycelium was suspended in 5 mL of a solution composed of NaCl and Tween 80. After inoculation with the spore suspension containing 150 µL (10⁶ spores/mL), submerged fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks containing 250 mL of gelatin. A growth curve was developed to identify the best time for enzyme production. The results show that collagenase production occurred with 120 hours of fermentation, obtaining 550 U/mL of collagenolytic activity and 0.42 g/L biomass in the stationary phase, indicating that the collagenase produced is a secondary metabolite. A 2⁴ factorial design was carried out to select the best parameters where the influence of the variables was evaluated: temperature (°C), pH, agitation and substrate concentration (gelatin). As a result of the factorial design, we obtained an increase in enzyme production of about 32%. This is the first study to describe optimized conditions for collagenase production by *R. microsporus* strains.

Keywords: Collagenase; Filamentous fungus; Bioprocesses; Innovation.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio del hongo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 aislado del suelo de la Caatinga haciendo hincapié en el desarrollo y aplicación de procesos biotecnológicos para la producción de una nueva colagenasa. Para ello, se evaluaron parámetros fermentativos significativos como: temperatura, pH, medio de cultivo y tiempo de fermentación. Las muestras del microorganismo se mantuvieron a 4 °C en medio de agar de extracto de malta. El micelio se suspendió en 5 mL de una solución compuesta por NaCl y Tween 80. Tras la inoculación realizada con la suspensión de esporas que contenía 150 µL (106 esporas/mL), se realizó la fermentación sumergida en matraces Erlenmeyer que contenían 250mL de gelatina. Se desarrolló una curva de crecimiento para identificar el mejor momento para la producción de enzimas. Los resultados que la producción de colagenasa se produjo con 120 horas de fermentación, obteniendo 550 U/mL de actividad colagenolítica y biomasa 0,42 g/L en la fase estacionaria, indicando que la colagenasa producida es un metabolito secundario. Se realizó un diseño factorial 2⁴ para seleccionar los mejores parámetros donde se evaluó la influencia de las variables: temperatura (°C), pH, agitación y concentración de sustrato (gelatina). Con el resultado de la planificación factorial obtuvimos un aumento de la producción enzimática de alrededor del 32%. Este es el primer estudio que describe las condiciones optimizadas para la producción de colagenasa por cepas de *R. microsporus*.

Palabras clave: Colagenasa; Hongo filamentoso; Bioprocesos; Innovación.

1. Introdução

Proteases são enzimas altamente complexas que diferem entre si na especificidade do substrato, mecanismo catalítico e sítio ativo (Sumantha *et al.*, 2006). Entre as enzimas industriais disponíveis no mercado, as proteases são descritas como uma das mais versáteis por desenvolverem uma série de funções e várias aplicações biotecnológicas importantes (Lima *et al.*, 2009; Gurumalles *et al.*, 2019; Kumar; Singh, 2014), não apresentando toxicidade e patogenicidade, consideradas como ecologicamente corretas e seguras para todos os setores biotecnológicos (Yazid, 2017). As proteases podem ser encontradas em inúmeros organismos (Kermasha & Eskin, 2021). Atualmente, colagenases provenientes de microrganismos são preferíveis devido a características específicas que permitem a degradação do colágeno em mais de um local, aos baixos custos de produção e manutenção, por apresentarem alto rendimento, facilidade no controle das condições de produção e maior produtividade (Wanderley *et al.*, 2017; Bhagwat; Dandge, 2018).

Colágeno e peptídeos de colágeno são também biomateriais de grande interesse industrial. São comumente associados à alimentação, medicamentos, cosméticos e outros produtos vinculados à área da saúde humana e animal (Gao, 2019). Segundo Oliveira *et al.*, (2017) até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias. O colágeno é a mais abundante proteína dos mamíferos, representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados. Dentre os microrganismos, os fungos apresentam vantagem na produção de colagenase, pois a mesma ocorre extracelularmente, o que torna mais fácil a sua recuperação após a fermentação (Sandhya *et al.*, 2005). Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas (Zimmer *et al.*, 2009). Algumas enzimas de fontes microbianas foram descobertas no século 20 e desde então, estudos sobre seu isolamento, caracterização de propriedades, produção em escala industrial e sua aplicação na bioindústria, progrediram e o conhecimento sobre elas continua a ser atualizado regularmente (Nigam, 2013).

A busca por novas colagenases microbianas assim como metodologias economicamente mais viáveis de produção têm aumentado ao longo dos anos, e alguns autores relatam que essa perspectiva representa, atualmente, uma das maiores dentro da indústria de enzimas (Abidi *et al.*, 2013; Graminho *et al.*, 2013). Sendo necessário o desenvolvimento e investimento em estudos que comprovem a aplicação de novas colagenases produzidas por microrganismos, uma vez que possuem vasto espectro de aplicação com alto potencial biotecnológico e valor comercial agregados, e poucos trabalhos publicados relatam a produção da colagenase por fungos (Wanderley *et al.*, 2016).

A biotecnologia utiliza agentes biológicos para obter bens ou assegurar serviços por manipulação de microrganismos, plantas e animais para obtenção de processos e produtos de interesse. Os microrganismos têm sido largamente empregados por apresentarem elevada velocidade de síntese, estabilidade e rendimento elevado de substrato em produto, além de pouco tempo de geração, diversidade e facilidade de manipulações genética e de condições ambientais (Hazan *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2008). Os diferentes tipos de bioprocessos geram variadas respostas em relação à produção de proteases (Agrawal *et al.*, 2004). O microrganismo utilizado nesse trabalho é o fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* UCP 1296, isolado do solo da Caatinga.

A Caatinga é um bioma com características peculiares, fazendo-se presente apenas no território brasileiro, com uma área cerca de 844.453 km², o que equivale a 11% do território nacional. É considerada uma das maiores regiões de floresta seca do mundo, com muitas espécies de microrganismos, plantas e animais adaptados exclusivamente para a vida nesta região semiárida (Silva *et al.*, 2020; Da Rocha *et al.*, 2019; IBGE, 2015). Os microrganismos endêmicos deste ecossistema se apresentam uma fonte valiosa de biomoléculas com atividades biológicas potencialmente inovadoras; variações extremas em temperatura, umidade e alta salinidade do solo, acompanhado por baixos níveis de nutrientes e altas irradiações UV, fazem com que os microrganismos desenvolvam a capacidade genética de se adaptar metabolicamente para sobreviver. Cepas microbianas descendentes das características acima relatadas têm uma influência importante na produção industrial biotecnológica, incluindo fatores como tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação, maior rendimento e viabilidade econômica (Da Rocha *et al.*, 2019).

O presente trabalho teve como proposta avaliar a produção de colagenase por *Rhizopus microsporus* UCP 1296, utilizando o planejamento estatístico para estabelecer os parâmetros fermentativos mais relevantes para o melhoramento da produção.

2. Metodologia

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o fungo filamentoso proveniente do solo da Caatinga, *Rhizopus microsporus* UCP 1296, cedido pelo Banco de Culturas de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP.

2.2 Meios de cultura

A cepa vem sendo mantida no meio ágar extrato de malte contendo: extrato de malte (0,5%), peptona (0,1%), glicose (2%) e ágar 1,5 (%) autoclavado a 121 °C por 15min e mantido em estufa a 30 °C por 5 dias até esporulação e posteriormente mantido sob refrigeração a 4 °C, sendo repicado a cada 30 dias. O meio de cultura utilizado para a produção de enzimas é composto por: gelatina (0,5% p/v), MgSO₄·7H₂O (0,025 p/v), K₂HPO₄ (1,5 p/v), FeSO₄·7H₂O (0,015 p/v), CaCl₂ (0,025 p/v) e solução mineral (1% v/v), segundo Lima *et al.*, (2013) modificado. A solução mineral foi preparada adicionando, por 100 mL de água destilada, 100 mg FeSO₄·7H₂O, 100 mg MnCl₂·4H₂O, 100 mg ZnSO₄·H₂O, e 100 mg CaCl₂·H₂O, e foi utilizada a 1% do volume total de fermentação, esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15min.

2.3 Cinética do crescimento e produção de enzimas colagenolíticas

O micélio foi suspenso em aproximadamente 5 mL de solução composta de 0,9% (p/v) NaCl e 0,01% (v/v) de solução de Tween 80, previamente esterilizados a 121°C por 20min. Após inoculação com uma suspensão de 150 µL esporos que foi padronizada para uma concentração final de 10⁶ esporos/mL, em uma câmara de contagem de *Neubauer*, a fermentação submersa foi realizada durante 5 dias a 28 °C e 150 rpm em frascos *Erlenmeyer* contendo 250mL do meio de cultura de

gelatina. A intervalos de 24 horas foram colhidas amostras para determinação da biomassa, teor de proteínas e da atividade colagenolítica. O caldo obtido no final da fermentação (120h), o extrato bruto (EB), foi filtrado a vácuo através de membranas de nitrocelulose com diâmetro de poro de 0,45 µm para remoção da biomassa e os sobrenadantes analisados quanto à produção de colagenase.

2.4 Avaliação de parâmetros significativos para produção da enzima colagenolítica

Com o objetivo de selecionar os melhores parâmetros para a produção da enzima colagenolítica extracelular produzida por *R. microsporus* UCP 1296 em fermentação submersa foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴ (Tabela 1), para avaliar a influência do pH inicial, concentração inicial de gelatina, temperatura e agitação orbital.

Tabela 1 – Condições do planejamento fatorial 2⁴ – Otimização das condições do cultivo.

FATORES	NÍVEIS		
	MENOR (-1)	CENTRAL (0)	MAIOR (+1)
pH	6	7	8
Concentração da Gelatina (% w/v)	0,25	0,5	0,75
Temperatura (°C)	24	28	32
Agitação orbital (rpm)	100	150	200

Fonte: Autores.

O ponto central foi realizado em quadruplicata para fornecer uma estimativa de variância de respostas a erros experimentais puros. A partir disso, foram baseados os efeitos dos erros experimentais e utilizado para avaliar o significado dos efeitos e interações das variáveis independentes - pH, concentração da gelatina, temperatura e velocidade de agitação orbital sobre a produção de enzima colagenolítica. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas com 95% de confiança utilizando o software *Statistic 8.0* (*StatSoft Inc.*, Tulsa, OK, EUA).

2.5 Determinação da atividade colagenolítica

A atividade da colagenase foi realizada pelo método de Chavira *et al.*, (1984) modificado, tendo como substrato o Azocoll (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), solubilizado em 950 µL de tampão Tris-HCl, pH 7,0 (0,05 M) e posteriormente centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. Foram realizadas sucessivas lavagens do substrato com o tampão até verificar que o azocoll não estava mais liberando nenhuma cor através da análise espectrofotométrica. A reação consistiu na adição de 50 µL do extrato enzimático e 950 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 ao substrato após as lavagens. A mistura foi incubada em banho-maria por 3 horas a 37°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 20 min (modelo KR-20000T; Kubota Seisakusho, Tóquio, Japão). A absorbância do sobrenadante foi medida a 520 nm por um espectrofotômetro UV-Vis (modelo B582; Micronal, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima, por mililitro, que levou a um aumento de absorbância de 0,1 a 520 nm sendo expressa em U/mL.

2.6 Determinação de proteínas totais e biomassa

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método do ácido bicinconínico, usando Pierce™ *BCA Protein Assay Kit* e albumina de soro bovino como padrão (Smith *et al.*, 1985). A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de albumina de soro bovino (BSA). O volume total dos frascos de fermentação foi filtrado a vácuo através de membranas de nitrocelulose

com diâmetro de poro de 0,45 μm para remoção da biomassa e posteriormente as membranas foram colocadas na estufa de secagem a 80 °C durante 24h.

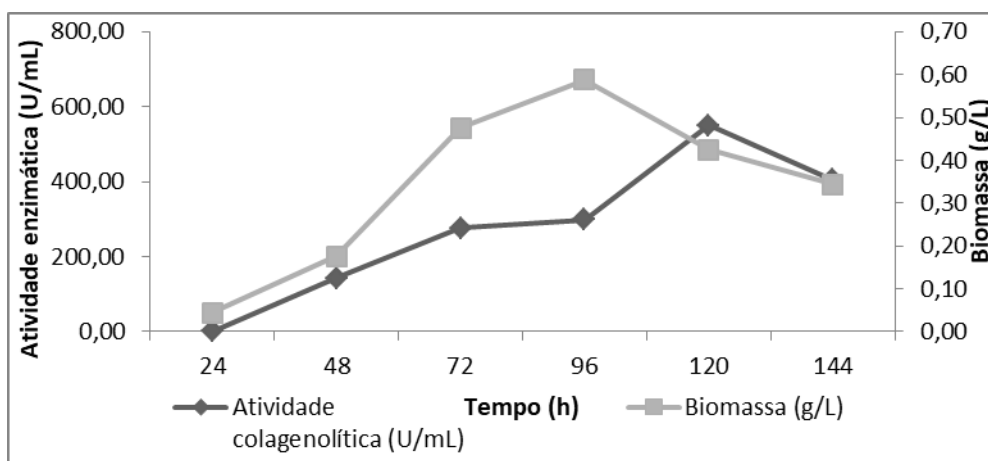
3. Resultados e Discussão

3.1 Cinética de produção enzimática

A Figura 1 representa os resultados da produção cinética da enzima. Conforme o gráfico, a biossíntese da enzima teve início juntamente com o crescimento do fungo. A produção foi crescente e atingiu o ápice com 120 horas de fermentação onde obtivemos 550 U/mL da enzima colagenolítica com valor de biomassa nesse período de (0,42 g/L), comprovando que a produção de colagenase por *R. microsporus* UCP 1296 ocorreu durante a fase estacionária, indicando que a enzima é um metabólito secundário. Com base nestes resultados, foi estabelecido o tempo de fermentação de 120 horas. A eficácia da produção foi avaliada pela atividade colagenolítica volumétrica devido à relevância industrial deste parâmetro (Lima *et al.*, 2011).

Ainda em relação à Figura 1, após 120 horas, pode-se observar uma diminuição gradativa na biossíntese da enzima, provavelmente devido ao esgotamento de nutrientes para o microrganismo. Segundo Gupta e colaboradores (2004) as proteases geralmente são sintetizadas durante a fase estacionária sendo reguladas pela limitação de nutrientes no meio de cultivo, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio. Agrawal *et al.*, (2004) demonstraram em seus experimentos que a atividade da enzima depende especificamente do tipo de microrganismo, composição do meio de cultura e tempo de incubação. Usando um fungo do mesmo gênero, *Rhizopus oryzae*, Benabda *et al.*, (2019), obtiveram melhor produção de protease 2412 U/g, com 120h de fermentação. Merheb *et al.*, (2007), registraram melhor produção da protease por *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo no final da fase estacionária. Silva *et al.*, (2017) verificaram 243,0 U/mL de atividade para a produção de colagenase com o *A. tamaris* URM 4634.

Figura 1 - Curva de crescimento e biomassa produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina.



Fonte: Autores.

3.2 Atividades colagenolítica e específica da colagenase produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina

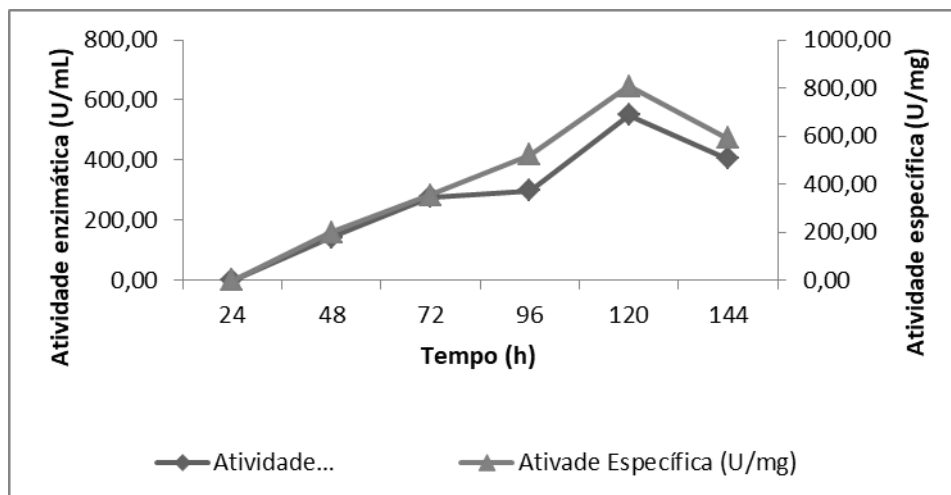
A maior atividade enzimática colagenolítica foi 550 U/mL, correspondendo a atividade específica de 808,23 U/mg, com tempo de 120 horas à 100 rpm de agitação em condições iniciais de fermentação na concentração de gelatina a 0,75% (p/v), pH 8 e 24 °C (Figura 2). Segundo Daboor *et al.*, (2010) a atividade colagenolítica pode ser descrita como hidrólise do

colágeno pela colagenase com liberação de peptídeos ou aminoácidos. Diferentes métodos são descritos na literatura para medir essa atividade: colorimétrica, fluorescência, turbidez e viscosimetria ou radioatividade, entre outros. Todos esses métodos consomem bastante tempo, variando de 3 a 18 horas. No presente estudo, usamos o método colorimétrico que tem como base o Azocoll. O Azocoll é um colágeno impregnado com corante azo, substrato específico da colagenase, pois permite observar a hidrólise por liberação de peptídeos solúveis impregnados com corante que são medidos por espectrofotometria, aumentando a sensibilidade do método (Chavira *et al.*, 1984).

Na Figura 2 observamos o valor da atividade colagenolítica específica de (808,23 U/mg) por *R. microsporus* UCP 1296 obtido nesse estudo é de grande importância para a ciência pois não foi encontrado na literatura científica relatos da produção de colagenase pelo fungo utilizado nesse experimento, além disso, esse valor é muito maior do que outros resultados publicados para outros microrganismos. Baehaki *et al.*, (2014) conseguiram uma atividade específica de 0,546 U/mg com *Bacillus licheniformis*; Jain e Jain (2010) encontraram 15,66 U/mg de atividade específica por *Streptomyces sp.*, Wu *et al.*, (2010) obtiveram 2,77 U/mg usando *Bacillus pumilus*, Mahmoud *et al.*, (2007), encontraram em seus experimentos atividade específica de 97,12 U/mg com *Aspergillus flavus* e Ok e Hashinaga (1996), 70,4 U/mg com *Zygosaccharomyces rouxii*.

A literatura descreve a importância de definir parâmetros que tenham uma influência significativa na produção de enzimas extracelulares por microrganismos, não apenas a composição do meio de cultura como fonte de carbono, nitrogênio e oligoelementos devem ser considerados, mas também as condições de cultura como pH, temperatura e velocidade de agitação (Lima *et al.*, 2009).

Figura 2 - Atividades colagenolítica e específica da colagenase produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina.



Fonte: Autores.

3.3 Planejamento fatorial para otimização das condições do cultivo

De acordo com os resultados da cinética de produção da enzima colagenolítica, o melhor tempo de fermentação foi estabelecido em 120 horas, possibilitando dessa forma a realização de um planejamento fatorial completo 2^4 , para a otimização das condições do cultivo, para isso foram utilizadas variáveis descritas de acordo com a literatura como importantes para produção da enzima como: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, agitação orbital e concentração do substrato (gelatina). Os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente (ao nível de 95% de confiança) e estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados do planejamento fatorial 2⁴ para otimização de parâmetros fermentativos para produção de enzima colagenolítica por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga

ENSAIOS	PARÂMETROS				RESPOSTAS			
	pH	So (% p/v)	T (°C)	Agitação (rpm)	Atividade (U/mL)	Prot. Totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	6	0,25	24	100	273,00	0,63	432,35	0,60
2	8	0,25	24	100	528,00	0,93	565,14	0,32
3	6	0,75	24	100	459,00	0,70	655,71	0,92
4	8	0,75	24	100	727,50	0,66	1102,27	0,84
5	6	0,25	32	100	441,00	0,64	686,00	0,32
6	8	0,25	32	100	540,00	0,65	832,60	0,32
7	6	0,75	32	100	487,50	0,52	942,68	0,88
8	8	0,75	32	100	504,00	1,21	415,06	0,76
9	6	0,25	24	200	411,00	0,61	669,07	0,36
10	8	0,25	24	200	226,50	0,66	343,18	0,24
11	6	0,75	24	200	282,00	0,68	416,46	1,08
12	8	0,75	24	200	381,00	0,67	572,32	1,64
13	6	0,25	32	200	294,00	0,42	700,00	0,36
14	8	0,25	32	200	468,00	0,63	747,95	0,36
15	6	0,75	32	200	300,00	0,73	411,76	1,08
16	8	0,75	32	200	559,50	0,61	910,81	1,24
17	7	0,5	28	150	550,00	0,68	808,23	0,42
18	7	0,5	28	150	563,00	0,68	823,10	0,39
19	7	0,5	28	150	548,00	0,68	807,07	0,44
20	7	0,5	28	150	555,00	0,68	814,98	0,38

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 2, o ensaio denominado 4, foi o mais relevante pois obteve 727,50 U/mL de atividade colagenolítica e 1102,27 U/mg de atividade específica para a enzima produzida pelo *R. microsporus* UCP 1296 com as seguintes condições: agitação de 100 rpm, temperatura de 24°C, pH= 8,0 e concentração do substrato gelatina de 0,75% (p/v). Com o planejamento fatorial obtivemos um aumento da produção enzimática cerca de 32% em comparação com os resultados preliminares obtidos nas experiências cinéticas. Destacamos dessa forma a importância do planejamento fatorial para favorecer a produção da enzima desejada. O planejamento fatorial é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação reside na triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico. Na proposição de um planejamento experimental é fundamental que o mesmo seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que o analista deseja. Assim, a atividade mais importante não está na análise de dados, e sim no planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos (Montgomery, 1991; Barros Neto; et al., 1995)

Na Tabela 3 são observados os efeitos significativos das quatro variáveis estudadas, assim como as interações entre as mesmas. A análise estatística das condições de cultivo mostra que a agitação teve significância estatística no valor de atividade colagenolítica (apontado em destaque na tabela abaixo).

Tabela 3 – Interações e efeitos estatisticamente significativos das quatro variáveis estudadas.

ANOVA; Var.:Collagenolytic Activity (U/mL); R-sqr=,84088; Adj:.,39535 (Planejamento Fatorial 2⁴) 2^{**}(4-0) design; MS Residual=9977,66 DV: Collagenolytic Activity (U/mL)

	SS	df	MS	F	P
(1)pH	60885,6	1	60885,56	6,102189	0,056512
(2)So (% w/v)	16835,1	1	16835,06	1,687276	0,250633
(3)T (°C)	5852,3	1	5852,25	0,586535	0,478338
(4)Agitation (rpm) *	67340,3	1	67340,25	6,749102	0,048372
1 x 2	5625,0	1	5625,00	0,563759	0,486562
1 x 3	770,1	1	770,06	0,077179	0,792279
1 x 4	5292,6	1	5292,56	0,530441	0,499086
2 x 3	5738,1	1	5738,06	0,575091	0,482437
2 x 4	4658,1	1	4658,06	0,466849	0,524809
3 x 4	7056,0	1	7056,00	0,707180	0,438736
1*2*3	5402,3	1	5402,25	0,541435	0,494887
1*2*4	11990,2	1	11990,25	1,201710	0,322950
1*3*4	53708,1	1	53708,06	5,382831	0,068046
2*3*4	12488,1	1	12488,06	1,251602	0,314094
Erro	49888,3	5	9977,66		
Total SS	313529,8	19			

* Significante. Fonte: Autores.

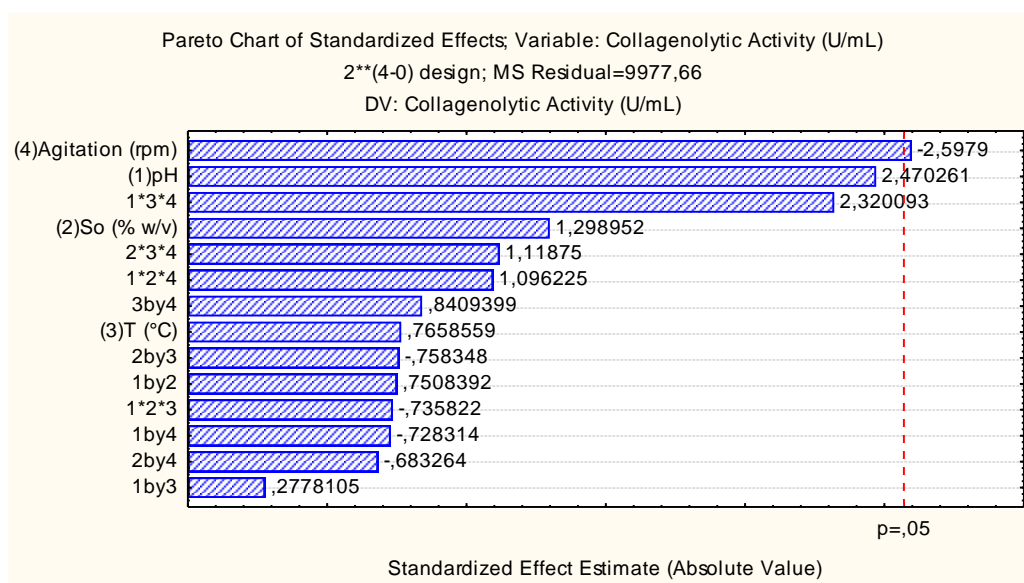
Segundo Wanderley e colaboradores (2017) a análise de variáveis que interferem na produção de proteases por microrganismos é extremamente relevante. Por não existir um meio geral de produção, cada microrganismo tem que ser estudado individualmente para a descoberta das melhores condições que levem a uma máxima produção de biomoléculas.

No presente trabalho foram avaliados três valores de agitação orbital 100, 150 e 200 rpm. Os valores obtidos pela análise das variáveis indicam que, em média, foram obtidas atividades mais elevadas quando a variável 4 (agitação) estava em 100 rpm. Segundo Cui *et al.*, (1998), a maior produção enzimática sob condição de agitação pode ser atribuída a transferência de calor e a dispersão de oxigênio de forma homogênea com os componentes do meio de cultura. Para Elibol e Moreira (2005) as enzimas apresentam sensibilidade às forças mecânicas, conseqüentemente agitação elevada pode levar a desnaturação e conseqüentemente perda de sua atividade. El-enhasy, et al., (2006) observaram que um aumento na velocidade de agitação mudou a morfologia do fungo *A. niger*, da forma de *pellet* para a forma de filamentos, e simultaneamente aumentou sua produção de proteínas extracelulares. Azevedo e colaboradores (2018) afirmam que a agitação orbital entre 100-120 rpm foram as mais adequadas na produção de proteases por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. De acordo com Pamboukian

(2003), para melhor desempenho do processo fermentativo, a condução de estudos de fermentação em *shaker* tem sido importante ferramenta para a otimização das condições para obtenção de vários produtos, incluindo as enzimas.

O gráfico de Pareto abaixo (Figura 3) confirma que o efeito da agitação sobre a atividade colagenolítica foi negativo, ou seja, a menor agitação favoreceu ao aumento da atividade enzimática. Os efeitos de interação entre agitação e pH estão no gráfico de superfície de resposta abaixo (Figura 4), indicando que as melhores condições do planejamento foram obtidas com o pH mais elevado e menor agitação, que estavam determinados no ensaio de n°4 (pH = 8, concentração inicial de gelatina = 0,75%, temperatura = 24 °C e agitação = 100 rpm).

Figura 3 - Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações: pH (1), concentração de substrato (2), temperatura (°C) (3) e agitação (rpm) (4).



Fonte: Autores.

4. Conclusão

O fungo *R. microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga foi capaz de produzir elevadas concentrações de colagenase extracelular, utilizando apenas gelatina como fonte de carbono e nitrogênio. Foram estabelecidas as melhores condições de produção enzimática tendo o efeito agitação orbital o mais significativo. Diante dos primeiros resultados obtidos, acredita-se que o *R. microsporus* apresenta potencial biotecnológico para produção e aplicação da colagenase.

Dessa forma, espera-se contribuir com a geração de possíveis subprodutos biotecnológicos em diversas áreas, podendo futuramente a referida colagenase ter aplicabilidade em diversos segmentos, como na indústria têxtil, alimentícia, produção de medicamentos, além da degradação de resíduos da indústria aviária.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela disponibilidade do uso dos laboratórios, equipamentos e reagentes.

Referências

- Abidi, F., Aissaoui, N., Gaudin, J. C., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. M. S. Analysis and molecular characterization of *Botrytis cinerea* protease Prot-2. Use in bioactive peptides production. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 May; 170(2):231-47.
- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., & Patil, S. (2004). Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem.* 39(8): 977-981.
- Azevedo, T. O. M., Silva, B., Lima, E. S., & Souza, J. V. B. de (2018). *Fungos isolados de amostras de solo da região amazônica, Aspergillus INPA 154 e Fusarium INPA 6, produzem proteases com potencial para utilização em formulações cosméticas.* Dissertação de mestrado.
- Baehaki, A., Sukamo, S. D., Setyahadi, S., & Suhartono, M.T. (2014). Production and characterization of collagenolytic protease from *Bacillus licheniformis* F11.4 originated from Indonesia. *Asian J. Chem.* 26 (10): 2861-2864. 10.14233/ajchem.2014.15863
- Barros Neto, B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (1996). *Planejamento e Otimização de Experimentos.* Campinas: Ed. UNICAMP, 2: 299 ISBN: 8526803360
- Benabda, O., M'hir, S., Kasmi, M., Mnif, W., & Hamdi, M. (2019). Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. *Hindawi Journal of Chemistry.* 3:1-9. 10.1155/2019/3738181
- Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2018). *Colágeno e proteases colagenolíticas: Uma revisão.* Biotatálise e Biotecnologia Agrícola. 15 (18), 43-55.
- Chavira, R. J., Burnett, T. J., & Hageman, J. H. (1984). Assaying proteinases with azocoll. *Anal. Biochem.* 136:4446-4450.10.1016/0003-2697(84)90242-2.
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M., & Luyben, K. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* 57(4):409-419.
- Daboor, S. M., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, S., & Dave, D. (2010). Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology,* 6(4): 239-263. 10.3844/ajbbsp.2010.239.263
- Da Rocha, W. R. V., Agamez-Montalvo, G. S., Feitosa, V. A., Machado, S. E. F., De Souza Lima, G. M., Pessoa-Jr, A., & Alves, H. S. (2019). Screening and optimizing fermentation production of lasparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. *Journal of Applied Microbiology.* 126(5): 1426-1437. 10.1111/jam.14221
- EL-Enshasy, H., Kleine, J., & Rinas, U. (2006). Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry.* 41: 2103-2112: 10.1016/j.procbio.2006.05.024
- Elibol, M., & Moreira, A.R. (2005). Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation. *Process biochemistry.* 40 (5), 1951-1956:10.1016/j.procbio.2004.07.010
- Gao, S., Hong, H., Zhang, C., Wang, K., & Zhang, B. (2019). Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice. *Journal of Functional Foods.* 60 (1)1034-40: 10.1016/j.jff.2019.103420
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(6):763-81: 10.1007/s00253-004-1568-8.
- Gurumalles, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules.* 128: 254-267: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081.
- Graminho, E. R., Da Silva, R. R., De Freitas Cabral, T. P., Arantes, E. C., Da Rosa, N. G., Juliano, L., Okamoto, D. N., De Oliveira, L. C., Kondo, M. Y., Juliano, M. A. & Cabral, H. (2013). Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. *Appl Biochem Biotechnol.* 169(1): 201- 214: 10.1007/s12010-012-9974-3.
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hammed, A. (2006). Industrial application of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology,* 39 (2): 235-251: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Dados gerais do município, 2015. < <http://cod.ibge.gov.br/N1G4> >
- Jain, R., & Jain, P. C. (2010). Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. *Indian J. Exp. Biol.,* 48(2), 174-8 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455327>
- Kermasha, S., & Eskin, M. N. Enzymes. In: Kermasha, S. & Eskin, M. N. (2021). *Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry.* (1a ed.): Academic Press. 2: 15-44.
- Kumar & Singh, D. (2014). Global scenario of industrial enzyme market Complimentary Contributor Copy. *Industrial Enzymes,* 10: 173-196.
- Lima, C. A., Rodrigues, P. M. B., Porto, T. S., Viana, D. A., Lima Filho, J. L., Porto, A. L. F., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2009). Production of a collagenase from *Candida albicans* URM 3622. *Biochem Eng J.* 43(3): 315-320:10.1016/j.bej.2008.10.014
- Lima, C. A., Lima Filho, J. L., Neto, B. B., Converti, A., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Porto, A. L. F. (2011). Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16 (3), 549-560:10.1007/s12257-010-0247-0
- Lima, C. A., Freitas-Junior, A. C. V., Lima-Filho, J. L., Converti, A., Marques, D. A. V., Carneiro-da-Cunha, M. G., & Porto, A. L. F. (2013). Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: Application to collagen hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal,* 75: 64-71:10.1016/j.bej.2013.03.012

- Mahmoud, Y. A. G., Aabu El-Souod, S. M., El-Shourbagy, S. M., & El-Badry, A. S. M. (2007). Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers. *Ann. Microbiol.*, 57(1), 109–113 doi.org/10.1007/BF03175058
- Merheb, C. W., Cabral, H., & Da Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. 104:127–131: 10.1016/j.foodchem.2006.11.010
- Montgomery, D. C. (1991). *Design and Analysis of Experiments*. (3rd ed.) John Wiley & Sons, Inc., Nova York.
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*. 23(3): 597–611: 10.3390/biom3030597.
- Oliveira, V. M., Assis, C. R. D., Herculano, P. N., Cavalcanti, M. T. H., Bezerra, R. S., & Porto, A. L. F. (2017). Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. *Boletim do Instituto de Pesca*, 43(1): 52-64: 10.20950/1678-2305.2017v43n1p52
- Ok, T., & Hashinaga, F. (1996). Detection and production of extracellular collagenolytic enzyme from *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 42, 517–523: 10.2323/jgam.42.517
- Pamboukian, C. R. D. (2003). *Produção do antitumoral rentamicina por Streptomyces olindenses em processos descontínuos*. (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós Graduação em Engenharia, USP.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neural protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochem.*, 40: 2689–2694. doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001
- Silva, O. S., Gomes, M. H. G., Oliveira, R. L., Porto, A. L. F., Converti, A., & Porto, T. S. (2017). Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 9: 168-173.
- Silva, I. E. B. da., Jardim, L. A. de S., Ribeiro, E. M. S., & Lima, R. L. F. de A. (2020). Fungolândia: Jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da caatinga. *Revista Brasileira de Educação Ambiental (REVB EA)*, 15(6): 52–99 : 10.34024/revbea.2020.v15.11449
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1): 76-85:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Sumantha, A., Deepa, P., Sandhya, C., Szakacs, G., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Brazilian Arch Biol Technol.* 49(5):843–851. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132006000600019>
- Ventura, M. M., Freitas, S. M., & Freire, A. P. (2008). *Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia In: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo. Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 1: 1- 27.*
- Wanderley, M. C. de A., Neto, J. M. W. D., Lima Filho, J. L. de., Lima, C. A., Teixeira, J. A. C., & Porto, A. L. F. (2017). Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(1): 13–24 doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001.
- Wanderley, M. C. de A., Neto, J. M. W. D., Lima, C. D. A., Silvério, S. I. C., Teixeira, J. Á. C., & Porto, A. L. F. (2016). Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium sp.* UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 4(4): 1-10: 10.7324/JABB.2016.40401
- Wu, Q., Li, C., Chen, H., & Shuliang, L. (2010). Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160 (1), 129–39:10.1007/s12010-009-8673-1
- Yazid, N. A. (2017) *Proteases from protein-rich waste : Production by SSF, downstream, immobilisation onto nanoparticles and application on protein hydrolysis*. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental. Tese de Doutorado. 286 p.
- Zimmer, K. R., Borré, G. L., Trentin, D. S., Júnior, C. W., Frasson, A. P., Graeff, A. A., Gomes, P., & Macedo, A. J. (2009). Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico, *Revista Liberato*, 10(14): 123-137.