

# Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico

Lorena Azevedo LIMA<sup>1</sup>, Raimundo Felipe CRUZ FILHO<sup>2</sup>, Januário Gama dos SANTOS<sup>2</sup>,  
Wilson Castro SILVA<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Amazonas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Manaus, AM - Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Parasitologia, Manaus, AM - Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Nilton Lins, Programa de Pós-graduação em Biologia Urbana, Manaus, AM - Brasil.

\* Corresponding author: [sprinkler65@gmail.com](mailto:sprinkler65@gmail.com)

## RESUMO

As proteases colagenolíticas são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno e têm grande importância na medicina e em aplicações terapêuticas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção de proteases colagenolíticas por *Bacillus stearothermophilus*. Os tratamentos foram realizados por meio de um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, a fim de avaliar a significância dos efeitos e interações das variáveis - pH inicial, concentração de substrato e temperatura - sobre a produção de protease colagenolítica. O ponto central foi executado em quadruplicata para fornecer uma estimativa dos erros experimentais. Ensaio enzimáticos com colágeno e azocaseína como substratos foram realizados para determinação das atividades colagenolítica e proteolítica respectivamente. A maior atividade enzimática colagenolítica foi 79,38 U mL<sup>-1</sup>, correspondendo a atividade específica de 136,86 U mg<sup>-1</sup>, em condições iniciais de fermentação, na concentração de substrato a 1% (p/v), pH 7,2 e 25 °C. A atividade proteolítica da enzima foi mais ativa em pH 9,0 e 50 °C e foi estável nas faixas de pH (6,0 - 9,0) e temperatura (45 °C - 50 °C). *Bacillus stearothermophilus* apresenta viabilidade para a produção de proteases colagenolíticas e a obtenção dessas enzimas tem grande importância para aplicações biotecnológicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** enzimas bacterianas, colágeno, planejamento fatorial

## Production of collagenolytic protease by *Bacillus stearothermophilus* from an Amazonian soil

### ABSTRACT

Collagenolytic proteases are enzymes able of hydrolyzing the peptide bonds of several types of collagen, and have great importance in the medicine and therapeutic applications. The aim of this research was to evaluate the production of collagenolytic proteases by *Bacillus stearothermophilus*. Treatments were performed used a 2<sup>3</sup> full factorial design, in order to evaluate the significance of the effects and interactions of variables - initial pH, substrate concentration and temperature - on the production of collagenolytic protease. The central point was run in quadruplicate to provide an estimate of the experimental error. Enzyme assays with collagen and azocasein as substrates were performed to determine the collagenolytic and proteolytic activities respectively. The highest collagenolytic enzyme activity was 79.38 U mL<sup>-1</sup>, corresponding to a specific activity of 136.86 U mg<sup>-1</sup>, in the initial fermentation conditions, substrate concentration at 1% (w/v), pH 7.2 and 25 °C. Proteolytic activity of enzyme was most active at pH 9.0 and 50 °C, and was stable over wide pH (6.0 - 9.0) and temperature ranges (45 °C - 50 °C). *Bacillus stearothermophilus* shows viability for the production of collagenolytic proteases, and the obtaining these enzymes have high importance for biotechnological applications.

**KEYWORDS:** bacterial enzymes, collagen, factorial design

## INTRODUÇÃO

As proteases colagenolíticas são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno, que é a proteína mais abundante nos mamíferos. São de considerável importância na medicina e em aplicações terapêuticas (Rao *et al.* 1998; Watanabe 2004).

As proteases colagenolíticas são utilizadas na degradação de tecido necrosado; remoção de cicatrizes hipertróficas; terapias de queimados; composição de pomadas cicatrizantes; prevenção de tratamento de lesões (Kuşçu *et al.* 2002; Özcan *et al.* 2002); e em estudos pré-clínicos terapêuticos no retardamento de cirrose hepática em coelhos e fibrose pulmonar em camundongos (Jin *et al.* 2005; Ouchi *et al.* 2008), nos quais a ação das enzimas colagenolíticas ocorre pela indução da aplicação de antibiótico ou por administração veia porta de colagenases, respectivamente. As enzimas colagenolíticas apresentam grande potencial econômico, pois além das várias aplicações na indústria farmacêutica, podem ser utilizadas no setor alimentício, na indústria cosmética, na indústria de couro e no setor agrícola para o biocontrole de nematoides (Lintner e Peschard 2000; Kanth *et al.* 2008).

Entre as várias fontes de proteases colagenolíticas, as proteases microbianas desempenham um papel importante nos processos biotecnológicos (Chu 1987). Alguns micro-organismos, selecionados a partir do solo, água e caviar, como *Bacillus alvei*, *Thermoactinomyces* sp. e *Bacillus* sp. (Kawahara *et al.* 1993; Schallmey *et al.* 2004; Petrova *et al.* 2006), são considerados seguros para a produção de colagenase.

Aproximadamente, 60% das enzimas disponíveis comercialmente são produzidas por espécies de *Bacillus*, principalmente, sendo proteínas homólogas que são naturalmente secretadas para o meio de crescimento (Westers *et al.* 2004). Além disso, as estirpes de *Bacillus* têm a capacidade de produzir e secretar grandes quantidades (20-25 g L<sup>-1</sup>) de enzimas extracelulares e, dentre elas, as proteases são as mais presentes (Priest 1977), estando entre as mais importantes produtoras de enzimas industriais (Schallmey *et al.* 2004). O objetivo desta pesquisa foi avaliar as melhores condições para a produção de proteases colagenolíticas por *Bacillus stearothermophilus* utilizando um planejamento e caracterizar a enzima sob as condições mais favoráveis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismo e meio de cultura

A amostra *Bacillus stearothermophilus* DPUA1729 do solo amazônico foi obtida da Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA / UFAM). A cultura bacteriana foi ativada em caldo Mueller-Hinton e incubada durante 24 horas a 37

°C. Para a análise quantitativa da atividade proteolítica, a linhagem bacteriana foi inoculada em agar gelatina/leite a 1% (p/v) e incubada a 37 °C durante 24 h. Em seguida, a linhagem foi inoculada em meio de cultivo contendo 0,25% de colágeno insolúvel. O meio de cultivo foi constituído de 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1 g de NaCl, 0,25% de colágeno insolúvel (p/v) de agar e 1,5% (p/v), pH 7,2 (Wu *et al.* 2010). Após 24 h de incubação a 37 °C, utilizou-se solução de Comassie brilliant blue G a 1% (p/v), para revelação do halo enzimático (Doust e Morabez 2004).

### Análises bioquímicas

Os tratamentos foram realizados por meio de um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, a fim de avaliar a significância dos efeitos e interações das variáveis - pH inicial, concentração de substrato e temperatura - sobre a produção de protease colagenolítica. O ponto central foi executado em quadruplicata para fornecer uma estimativa dos erros experimentais (Tabela 1).

O planejamento fatorial e o gráfico de Pareto foram elaborados utilizando os programas estatísticos Minitab Statistical Software 16 (Minitab Inc, Pensilvânia, EUA). O meio de fermentação foi composto de 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e 1,0 g de extrato de levedura e 0,1 g de CaCl<sub>2</sub> dissolvidos em tampões com diferentes pH (Tran e Nagano 2002), variando as concentrações de gelatina, conforme planejamento fatorial (Tabela 1). Os tampões utilizados foram de citrato (pH 5,0 a 6,0) 50 mM e de Tris-HCl (pH 7,2) 50 mM. A partir da cultura-estoque foi preparada suspensão padronizada pela escala de MacFarland 1. Desta suspensão foram retirados 200 µL para inoculação em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de fermentação (Lima *et al.* 2009). A cultura bacteriana foi submetida à agitação de 160 rpm durante 24 h e as temperaturas foram estabelecidas de acordo com planejamento fatorial (Tabela 1). Após o período de agitação, o sobrenadante foi separado por centrifugação 10.000 x g durante 10 minutos e filtrado em membrana de 0,22 µm. Este filtrado foi nomeado por extrato bruto. A concentração de proteína foi determinada de acordo com método Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. A absorvância foi medida a 595 nm e a unidade proteica foi expressa em mg mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 1.** Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central

Fator	Nível		
	-1	0	+1
pH	5,0	6,0	7,2
Temperatura (°C)	25	37	45
Concentração da gelatina (p/v)	0,25	0,5	1,0

## Ensaio enzimático

O ensaio enzimático para determinação da protease colagenolítica foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Moore e Stein (1948), com algumas modificações. A mistura foi constituída de 0,2 mL do extrato bruto, 0,8 mL de solução contendo Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM e colágeno insolúvel a 1% (p/v) nas faixas de pH estabelecidas pelo planejamento fatorial. Posteriormente, foi incubado durante 10 horas nas temperaturas estabelecidas pelo planejamento fatorial (Tabela 1). Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v). Tubos contendo a mistura foram centrifugados a 10.000 ×g por 10 minutos e o extrato enzimático foi filtrado em membrana de 0,22 μm. Para determinar a atividade colagenolítica, uma unidade de grupo amino livre de colágeno foi mensurada pelo método de ninidrina, no qual 0,5 mL de solução ninidrina a 2% (p/v) e 0,2 mL do sobrenadante foram aquecidos por 10 minutos. Em seguida, foram submetidos a resfriamento por cinco minutos. Foi feita uma diluição com 5 mL de 1-propanol a 50% (p/v). A mistura foi centrifugada a 12.000 ×g durante 10 minutos e a absorbância foi medida em 570 nm. A atividade colagenolítica foi expressa como um μmol de glicina equivalente liberado por minuto. A atividade colagenolítica específica foi calculada pela razão entre a atividade colagenolítica (U mL<sup>-1</sup>) e a proteína total (mg mL<sup>-1</sup>), e expressa em U mg<sup>-1</sup> (Tabela 2).

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se 150 μL do extrato bruto e como substrato 250 μL de azocaseína a 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2. A reação foi mantida em câmara escura e após 60 minutos adicionou-se 1,2 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v). O resíduo remanescente foi

**Tabela 2.** Produção de protease colagenolítica de *B. stearothermophilus* DPUA1729 no planejamento fatorial (2<sup>3</sup>). pH = pH inicial do meio; T = temperatura; S = concentração de substrato; Ac = Atividade colagenolítica; PT = proteína total; Ae = Atividade colagenolítica específica. \*pontos centrais

	pH	T (°C)	S (%)	Ac (U mL <sup>-1</sup> )	PT (mg mL <sup>-1</sup> )	Ae (U mg <sup>-1</sup> )
1	5,0	25	0,25	35,20	0,38	92,63
2	7,2	25	0,25	29,14	0,43	67,77
3	5,0	45	0,25	15,95	0,04	398,75
4	7,2	45	0,25	15,20	0,59	25,76
5	5,0	25	1,00	44,04	0,14	314,57
6	7,2	25	1,00	79,38	0,58	136,86
7	5,0	45	1,00	19,78	0,13	152,15
8	7,2	45	1,00	16,36	0,06	272,67
9*	6,0	37	0,50	39,10	0,22	177,73
10*	6,0	37	0,50	39,28	0,26	151,07
11*	6,0	37	0,50	40,40	0,22	183,64
12*	6,0	37	0,50	43,18	0,30	143,93

removido por centrifugação (8.000 ×g) a 4 °C por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 0,8 mL e adicionados a 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida por Leighton *et al.* (1973) como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos, sendo expressa em U mL<sup>-1</sup>.

## Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade e a estabilidade proteolítica

A temperatura ótima para atividade da enzima foi determinada utilizando 250 μL de azocaseína a 1% (p/v) em Tris-HCl (pH 7,2) 50 mM e 0,8 mL do extrato. Os meios reacionais foram incubados nas temperaturas de 25, 37, 45, 50, 60 e 80 °C durante 60 minutos. O pH ótimo para medida da atividade enzimática foi determinado variando-se o pH do meio reacional na faixa de pH entre 5,0 e 10,0. Os tampões utilizados foram de citrato (5,0 a 6,0) 50 mM, de Tris-HCl (pH 7,2 a 9,0) 50 mM e de carbonato-bicarbonato de sódio (pH 10,0) 50 mM. A estabilidade de temperatura foi realizada a 45 °C e estabilidade do pH foi realizada na faixa 7,2, ambas foram mantidas por 105 minutos, a atividade enzimática foi expressa em atividade relativa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS

### Produção de protease colagenolítica

Em meio agar gelatina leite e Agar colágeno observou-se as atividades proteolítica e colagenolítica produzidas por *B. stearothermophilus* DPUA 1729, respectivamente, reveladas pela formação de halos translúcidos ao redor da colônia.

A maior atividade enzimática colagenolítica foi 79,38 U mL<sup>-1</sup>, correspondendo a atividade específica de 136,86 U mg<sup>-1</sup>, em condições iniciais de fermentação: na concentração de gelatina a 1% (p/v), pH 7,2 e 25 °C. O valor de menor atividade enzimática foi 15,20 U mL<sup>-1</sup>, com atividade específica de 25,59 U mg<sup>-1</sup>, em condições iniciais de fermentação: na concentração de gelatina a 0,25% (p/v), pH 7,2 e 45 °C (Tabela 2).

O gráfico de Pareto representa os efeitos estimados das variáveis e suas interações sobre a atividade colagenolítica. O comprimento da barra é proporcional ao efeito padronizado. A linha vertical pode ser usada para avaliar quais efeitos são significativos estatisticamente. As barras que se estendem para além desta linha correspondem aos efeitos que foram estatisticamente significativos ( $\alpha = 0,05$ ). Pode ser visto a partir da Figura 1, que o efeito foi significativo para todas as variáveis nas quais, o fator A (pH inicial) e fator C (concentração de substrato) apresentaram efeito positivo significativo, indicando que o aumento desses valores melhora a produção

de collagenase. No entanto, o fator B (temperatura de fermentação) apresentou influência negativa (-22,5881), indicando melhor produção enzimática com a variação abaixo do menor nível de temperatura utilizada neste planejamento.

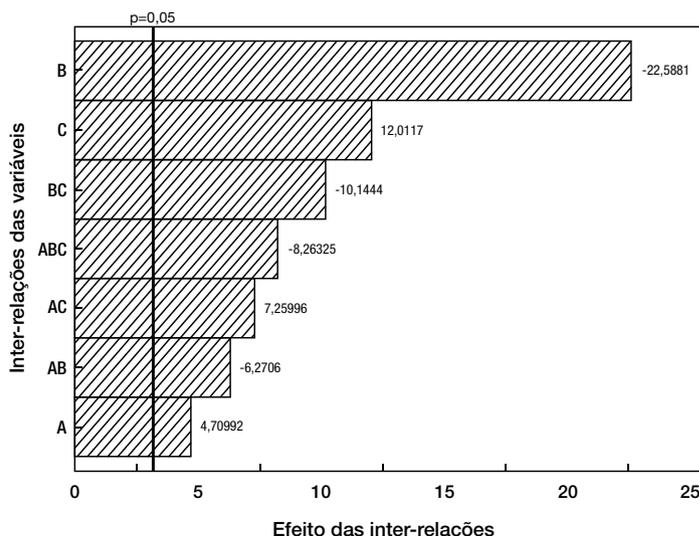
### Efeito e estabilidade do pH sobre a protease

No efeito do pH sobre a atividade proteolítica de *B. stearothermophilus* DPUA 1729 verificou-se atividade na faixa de pH (5,0 a 10,0) durante 60 min. A atividade máxima do extrato da enzima foi em pH 9,0 (Figura 2A). Entretanto, 80% da atividade da protease foi mantida no intervalo de pH 7,2 - 9,0, e mais de 60% desta atividade foi entre pH 6,0 a 10,0. A estabilidade da enzima foi mantida acima de 66% em faixas de pH 6,0 a 9,0, com redução menor que 20% em pH 10,0 (Figura 2B).

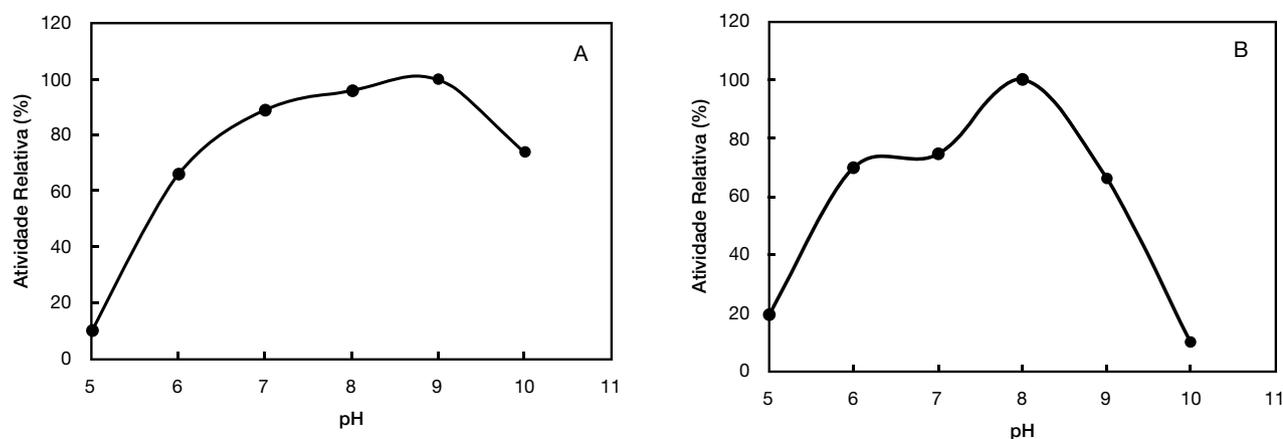
### Efeito e estabilidade da temperatura sobre a protease

Os dados referentes ao efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica de *B. stearothermophilus* DPUA1729 apresentaram máxima atividade enzimática a 50 °C. O perfil da atividade proteolítica versus variação de temperatura manteve mais de 80% de ação enzimática entre 45 e 50 °C. Contudo, o aumento da temperatura acima de 60 °C reduziu a atividade da protease abaixo de 20% (Figura 3A).

Na avaliação da estabilidade da atividade proteolítica após a incubação do extrato bruto por 105 minutos em diferentes temperaturas, observou-se a atividade enzimática em todas as temperaturas testadas (25 °C - 80 °C). A estabilidade para o extrato de *B. stearothermophilus* DPUA1729, em relação à



**Figura 1.** Gráfico de Pareto definindo as inter-relações entre as variáveis independentes, demonstrando a afinidade entre as escalas mais elevadas das inter-relações. A = pH, B = Temperatura e C = Concentração do substrato



**Figura 2.** (A) Efeito do pH sobre a atividade da protease extracelular e (B) Estabilidade da enzima em diferentes pH

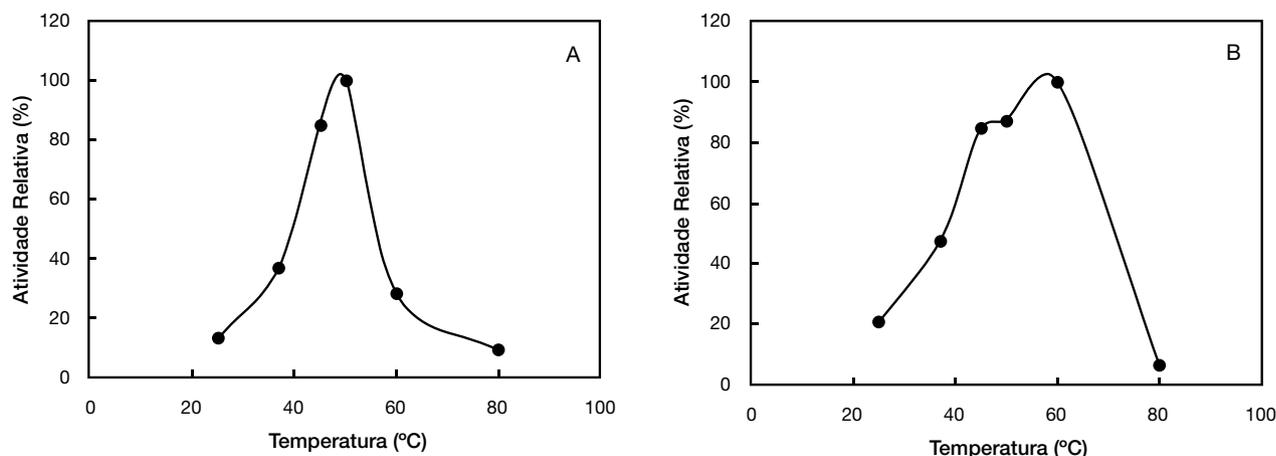


Figura 3. (A) Efeito da temperatura sobre a atividade da protease extracelular e (B) Estabilidade da enzima em diferentes temperaturas

temperatura, manteve-se acima de 85% da atividade relativa (Figura 3B).

## DISCUSSÃO

A atividade collagenolítica máxima por *B. stearothermophilus* DPUA 1729 foi cinco vezes maior que a atividade mínima, confirmando que a temperatura e a concentração de substrato foram os fatores que mais influenciaram na produção de collagenase (Tabela 2 e Figura 1). A temperatura é um dos mais importantes parâmetros que devem ser controlados em um bioprocessamento (Chi e Zhao 2003). Observou-se que a temperatura foi o fator que influenciou na atividade collagenolítica, mostrando que a temperatura é inversamente proporcional a produção de protease, ou seja, quanto menor a temperatura maior a atividade enzimática.

A atividade collagenolítica por *B. stearothermophilus* DPUA 1729 foi superior à atividade obtida por Supthatharapateep *et al.* (2011), que utilizaram *Bacillus cereus* CNA1 em condições similares de fermentação: pH 7,5 com 1% (p/v) de concentração de gelatina a 37 °C. Estes resultados implicam que cada micro-organismo tem suas características físico-químicas e exigências nutricionais para o crescimento e produção enzimática (Readdy *et al.* 2008) confirmando que não há meio geral para a produção de protease por diferentes estirpes microbianas (Pandey *et al.* 2000).

A produção enzimática por *B. stearothermophilus* DPUA 1729 pode ser induzida pelo aumento da concentração de gelatina no meio. Lima *et al.* (2011) realizaram um estudo de otimização do meio de cultura e condições de cultivo para a produção de collagenase por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, e observaram que houve influência da variação de concentração de substrato, no entanto, o fator temperatura mostrou efeito negativo na produção enzimática. O fator

temperatura no nosso estudo, também, apresentou efeito negativo, provavelmente, a melhor produção enzimática ocorre em baixas temperaturas, mantendo adequado o fluxo metabólico sob condições de estresse.

As proteases collagenolíticas produzidas por *B. stearothermophilus* DPUA1729 possuem baixa tolerância à temperatura em pH com baixa alcalinidade (tabela 2). Em estudos realizados por Zambare *et al.* (2011), observou-se que a baixa temperatura apresentou influência na atividade collagenolítica por *Pseudomonas aeruginosa* MCM-327, atuando em pH neutro. Estes resultados, possivelmente, se ajustam ao fato de que as proteases com baixa tolerância de temperatura são consideradas proteases bacterianas neutras e são ativas na faixa de pH 5,0 a 8,0 (Rao *et al.* 1998).

Em relação ao efeito do pH sobre a atividade enzimática, os resultados obtidos nesta pesquisa mostram que no pH alcalino ocorre maior produção de protease. Vários autores reportam a maior produção enzimática nesta faixa de pH. Lima *et al.* (2011), na produção de proteases por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, a atividade máxima foi expressa em pH 9,0 e mais de 60% da maior atividade foi mantida no intervalo de pH 5,0-10,5. Sakurai *et al.* (2009) e Lima *et al.* (2009) utilizando *Streptomyces parvulus* e *Candida albicans*, respectivamente, obtiveram máxima produção de protease em pH 8,0; e Petrova *et al.* (2006) com *Streptomyces* sp. verificaram atividade proteolítica máxima em pH 7,5. Observou-se que o pH tem efeito sobre a atividade enzimática na faixa alcalina, na qual ocorreu a maior produção de protease, mostrando a influência da concentração do ânion diatômico (OH<sup>-</sup>). O efeito do pH na velocidade das reações enzimáticas pode ser devido às alterações da estabilidade da enzima, da afinidade da enzima para o substrato e da transformação catalítica em si. Estes três fatores podem atuar de um modo isolado ou

combinado. Entretanto, deve-se levar em consideração que pH muito elevado pode diminuir a estabilidade da enzima (Ferro 2002).

Na estabilidade do pH da protease por *B. stearothermophilus* DPUA1729 é possível observar que a enzima apresentou atividade enzimática em todos os pH iniciais no meio de fermentação. Petrova *et al.* (2006) e Sela *et al.* (1998) reportaram a estabilidade de pH de duas proteases colagenolíticas produzidas por *Thermoactinomyces* sp. (faixas de pH 6,5 – 9,0) e por *Bacillus cereus* (faixas de pH 5,6 – 8,2) respectivamente. Estes estudos inferem que essas proteases são altamente estáveis em situações diversas de pH e íons.

O efeito da temperatura tem uma relação direta com a sobre a atividade enzimática. Observou-se que a temperatura ótima resultou em uma atividade enzimática relativamente alta (Figura 3A), ativa por 60 minutos. No estudo de Nagano e To (1999) com *Bacillus subtilis* FS-2 a protease teve uma temperatura ótima a 50 °C, entretanto, essa enzima foi ativa por 30 minutos. Lima *et al.* (2009), com *Candida albicans* URM3622, observaram atividades ótimas sobre a produção de protease a 45 °C. Observa-se que a alta temperatura é um fator que favorece a produção de protease. Entretanto, a influência da temperatura na cinética da reação enzimática deve ser considerada, pois temperaturas elevadas causam a desnaturação da enzima pelo rompimento das ligações de hidrogênio (Borzani *et al.* 2001).

Os resultados do nosso trabalho mostram que atividade proteolítica foi relativamente alta e a estabilidade da temperatura manteve-se por muito mais tempo (Figura 3B), comparadas com outros trabalhos com proteases microbianas. No trabalho de Nagano e To (1999) a produção de protease por *Bacillus subtilis* FS-2 manteve-se por 30 minutos, nas faixas entre 55 °C a 60 °C. Os resultados obtidos por Suphatharaprateep *et al.* (2011), usando proteases de *Bacillus cereus* CNA1 e *Klebsiella pneumoniae* CNL3, as quais foram submetidas a temperatura de 50 °C durante 60 minutos, apresentou atividade relativa inferior a 60% e, quando incubadas a 55 °C, apresentaram 40% da atividade relativa. Em temperatura extremas, como 25 °C e 80 °C, a atividade enzimática de *B. stearothermophilus* DPUA1729 apresentou um decréscimo inferior a 20%. Contudo, a enzima se mostrou termoestável, podendo ser usada nos mais variados processos industriais.

## CONCLUSÕES

A produção de enzimas colagenolíticas foi influenciada pelos fatores pH e concentração de substrato. Entretanto, nos níveis mais baixos de temperatura, houve maior produção. *Bacillus stearothermophilus* DPUA 1729 apresenta viabilidade para a produção de proteases colagenolíticas e a obtenção dessas enzimas tem grande importância para aplicações

biotecnológicas, podendo ser interessante para as indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e em processos que utilizam colágeno e couro.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de Mestrado.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Borzani, W.; Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. 2001. *Biotechnologia Industrial: Fundamentos*. 1 ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001, 288p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chi, Z.; Zhao, S. 2003. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 206–221.
- Chu, K.H. 1987. Collagenase chemonucleolysis via epidural injection. A review of 252 cases. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 215: 99-104.
- Doust, R.H.; Mobarez, A.M. 2004. Collagenase activity in *Prevotella Bivius* Isolated from patients with premature rupture of membranes. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 18: 61-66.
- Ferro, L.A. 2002. *Produção, purificação e caracterização da enzima B-1,3 glucanase de Cellulomonas cellulans YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 175p.
- Jin, B.H.J.; Alter, Z.C.; Zhang, J.W.; Shih, J.M.; Esteban, T.; Sun, Y.S. *et al.* 2005. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration. *Laboratory Investigation*, 85: 992-1002.
- Kanth, S.V.; Venba, R.; Madhan, B.; Chandrababu, N.K.; Sadulla, S. 2008. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. *Dyes and Pigments*, 76: 338-347.
- Kawahara, H.; Kusumoto, M.; Obata, H. 1993. Isolation and Characterization of a New Type of Collagenase Producing Bacterium, *Bacillus alvei* DC-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1372-1373.
- Kuşçu, N.K.; Koyuncu, F.; Laçın, S. 2002. Collagenase treatment of sore nipples. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 76: 81-82.
- Leighton, T.J.; Doi, R.H.; Warren, R.A.J.; Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA poly-merase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, 76: 103-122.
- Lima, C.A.; Rodrigues, P.M.B.; Porto, T.S.; Viana, D.A.; Lima Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Cunha, M.G.C. 2009. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM362. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 315-320.
- Lima, C.A.; Rodrigues, P.M.B.; Lima Filho, J.L.; Neto, B.B.; Converti, A.; Cunha, M.G.; Porto, A.L.F. 2011. Production

- and Characterization of a Collagenolytic Serine Proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial Study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16: 549-560.
- Lintner, K.; Peschard, O. 2000. Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. *International Journal of Cosmetic Science*, 22: 207-218.
- Moore, S.; Stein, W.H. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 176: 367-388.
- Nagano, H.; To, K.A. 1999. Purification of Collagenase and Specificity it related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63:181-183.
- Ouchi, H.; Fujita, M.; Ikegame, S.; Ye, Q.; Inoshima, I.; Harada, E. et al. 2008. The role of collagenases in experimental pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21: 401-408.
- Özcan, C.; Ergüno, C.; Elik, M.; Çördük, N.; Özok, G. 2002. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. *Burns*, 28: 791-794.
- Pandey, A.; Nigam, P.; Soccol, C.R.; Soccol, V.T.; Singh, D.; Mohan, R. 2000. Advances in microbial amylases, *Biotechnology Applied Biochemistry*, 1: 135-152.
- Petrova, D.H.; Shishkov, S.A.; Vlahov, S.S. 2006. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: Purification and some properties. *Journal Basic Microbiology*, 46: 275-285.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*, 41: 1847-1881.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62: 597-635.
- Readdy, L.V.A.; Wee, Y.J.; Yun, J.S.; Ryu, H.W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches, *Bioresource Technology*, 99: 2242-2249.
- Sakurai, Y.; Inoue, H.; Nishii, N.; Takahashi, Y.; Lino, Y.; Yamamoto, M.; Takahashi, K. 2009. Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73: 21-28.
- Sela, S.; Schickler, H.; Chet, I.; Spiegel, Y. 1998. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* collagenolytic/ proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 59-67.
- Schallmeyer, M.; Singh, A. Ward, O.P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* sp. for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.
- Suphatharaprateep, W.; Cheirsilp, B.; Jongjareonrak, A. 2011. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *New Biotechnology*, 28: 649-655.
- Tran, K.A.; Nagano, H. 2002. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. *Journal Food Science*, 67: 1184-1187.
- Watanabe, K. 2004. Collagenolytic proteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 520-526.
- Westers, L.; Westers, H.; Quax, W.J. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694: 299-310.
- Wu, Q.; Li, C.H.; Li, C.; Chen, H.; Shuliang, L. 2010. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 129-139.
- Zambare, V.; Nilegaonkar, S.; Kanekar, P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 enzyme production and its partial characterization, *New Biotechnology*, 28: 173-181.

Recebido em 10/10/2013

Aceito em 07/03/2014

