



PROTEASE COLAGENOLÍTICA PRODUZIDA POR *Mucor subtilissimus* UCP1262.

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO, DIEGO GOMES RAMOS, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO.

RESUMO

A produção de enzimas com atividade proteolítica e colagenolítica desperta um interesse crescente devido às suas aplicações industriais em diversos setores, incluindo a indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Neste estudo, realizamos uma investigação detalhada sobre a capacidade do fungo *Mucor subtilissimus* em produzir proteases e colagenases utilizando a técnica de fermentação em estado sólido (FES). Por meio da FES, conseguimos obter extratos brutos enzimáticos com atividades proteolítica e colagenolítica significativas. Além disso, aplicamos técnicas de precipitação cetônica e purificação para aprimorar a qualidade desses extratos. Os resultados obtidos foram promissores, demonstrando que as proteases e colagenases produzidas por *Mucor subtilissimus* possuem propriedades favoráveis para aplicações industriais. A atividade colagenolítica alcançou valores de até 165,4 U/mL, evidenciando o potencial dessas enzimas para degradar e modificar o colágeno. Essas enzimas apresentaram estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, o que é altamente desejável para aplicações industriais versáteis. Além disso, observamos uma alta especificidade de substrato para o colágeno, indicando a capacidade de direcionar sua atividade degradativa de forma seletiva. Em suma, os resultados obtidos neste estudo confirmaram que o fungo *Mucor subtilissimus* é um microrganismo promissor para a produção de proteases e colagenases por meio da FES. Essas enzimas têm um grande potencial biotecnológico para serem aplicadas em diversos setores industriais, como alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Futuras pesquisas podem se concentrar em otimizar ainda mais o processo de produção e explorar novas aplicações específicas para atender às demandas da indústria.

Palavras-chave: Fermentação; enzima; fungo; microrganismo; biotecnologia.

1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos derivados de colágeno são biomateriais de considerável interesse na indústria. Eles são frequentemente associados à alimentação, medicamentos, produtos cosméticos e outros produtos relacionados à saúde humana e animal. Exemplificando algumas aplicações dos peptídeos de colágeno, temos seu uso em imunoterapia (GAO, 2019), tratamento da hipertensão (MCALINDON *et al.*, 2011), fabricação de hidratantes e cosméticos que visam retardar o processo de envelhecimento causado pela exposição ao sol (YAGODA; GUNS, 2014), nutrição parenteral (USAMAH, 2019), tratamento de úlceras (YAMANAKA, 2017), atividade antimicrobiana (GÓMEZ-GUILLÉN, *et al.*, 2011), propriedades anticancerígenas e antioxidantes (NASRI, 2019), entre outros. Consequentemente, o interesse por essas biomoléculas e suas possíveis aplicações impulsiona a pesquisa de enzimas capazes de degradar o colágeno, uma vez que a produção de peptídeos biologicamente ativos é realizada através da hidrólise enzimática.

Além da produção de peptídeos, as proteases com ação colagenolítica também têm

aplicações diretas na indústria. Elas são utilizadas para auxiliar na cicatrização, facilitar a epitelização por meio do processo de debridamento e degradar placas fibrosas formadas por doenças como a doença de Peyronie (JORDAN, 2008). Essas enzimas também são aproveitadas na restauração de afrescos, removendo resíduos orgânicos (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Na indústria alimentícia, podem ser empregadas no amaciamento de carnes em baixas temperaturas, reduzindo as chances de contaminação microbiana. Além disso, são utilizadas como amaciantes na indústria do couro, facilitando a penetração de corantes (BHAGWAT *et al.*, 2016; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

As proteases colagenolíticas podem ser obtidas de diversas fontes. As colagenases de origem animal têm a capacidade de clivar o colágeno em locais específicos e podem ser extraídas de vários vertebrados, sendo as vísceras de peixes um destaque nesse aspecto (OLIVEIRA, 2017). Em plantas, as proteases colagenolíticas são comumente encontradas nas espécies *Ficus carica* e *Zingiber officinale* (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Devido às suas características específicas que permitem a degradação do colágeno em múltiplos sítios, aos custos de produção e manutenção, alto rendimento, maior produtividade e facilidade no controle das condições de produção, existe uma preferência pelas colagenases provenientes de microrganismos (WANDERLEY *et al.*, 2017; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Atualmente, o microrganismo mais amplamente utilizado na produção industrial de colagenase é o *Clostridium* sp. No entanto, devido à sua natureza patogênica e capacidade de produzir toxinas, pode haver limitações na aplicação dessas enzimas (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Nesse contexto, a purificação das enzimas por meio de metodologias adequadas torna-se uma etapa crucial para o uso industrial, especialmente nas áreas da saúde e alimentação (NELSON; COX, 2014). Apesar disso, as proteínas colagenolíticas obtidas de microrganismos apresentam mais vantagens em relação às provenientes de animais ou plantas. Wanderley *et al.* (2017) analisaram o uso de fungos filamentosos na produção de proteases, destacando os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* como excelentes produtores de colagenase. No entanto, é importante ressaltar que a pesquisa envolvendo diferentes gêneros e espécies de microrganismos é essencial, devido à ampla diversidade morfofisiológica desses organismos e às diversas possibilidades que podem ser exploradas.

O fungo *Mucor subtilissimus* é um representante da ordem Mucorales e é encontrado em diversas partes do mundo, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical. Assim como outros membros desta ordem, este fungo é um decompositor, frequentemente encontrado no solo e em excremento de animais. Estudos recentes têm demonstrado que *M. subtilissimus* é capaz de produzir compostos com potencial aplicação em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica e alimentícia (Souza *et al.* 2022). Além disso, alguns estudos sugerem que este fungo pode ser utilizado como um agente de biocontrole de patógenos de plantas. A compreensão das características bioquímicas e fisiológicas de *M. subtilissimus* tem grande importância para o desenvolvimento de novas aplicações industriais e agrícolas, bem como para a compreensão da diversidade ecológica da ordem Mucorales. Estudos como os de Costa *et al.* (2023) demonstram a capacidade do gênero na degradação de gelatina, abrindo possibilidades para o uso biotecnológico desse gênero para obtenção de enzimas capazes de degradar colágeno.

Outro aspecto interessante sobre o fungo *Mucor subtilissimus* é a sua capacidade de produzir proteases fibrinolíticas. Estudos recentes têm mostrado que este microrganismo é capaz de produzir essas enzimas com alto rendimento em diferentes condições de cultivo, o que pode torná-lo um candidato promissor para a produção industrial de proteases (Nascimento *et al.*, 2016). Sendo assim o objetivo deste trabalho é analisar a obtenção de protease colagenolítica a partir da fermentação do fungo *Mucor subtilissimus* UCP1262.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microorganismo

O fungo filamentosso *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizado neste estudo foi isolado do solo da região da Caatinga, em Pernambuco, Brasil. Esse isolado foi obtido a partir da Coleção de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP) e gentilmente cedido para a pesquisa. O fungo foi mantido em meio BDA a 30°C por 7 dias e armazenado em óleo mineral.

2.2. Preparação do inóculo

Para a obtenção do inóculo, os esporos foram coletados utilizando uma solução nutritiva composta por 0,5% de extrato de levedura, 1% de glicose e 0,01% de Tween 80, diluída em tampão fosfato de sódio 245 mM previamente esterilizado, pH 7,0. Os esporos foram contados em uma câmara de Neubauer para obter uma concentração final de 10⁷ esporos/mL.

2.3. Produção da protease colagenolítica por fermentação em estado sólido

Para a produção da protease fibrinolítica, frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 3,0 g de farelo de trigo como substrato (com teor de umidade de 50%) foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Em seguida, os frascos foram inoculados com a suspensão de esporos de *M. subtilissimus* UCP 1262 descrita anteriormente e incubados a 25°C por 72 horas.

2.4. Extração da enzima

A extração da enzima foi realizada após 72 horas de fermentação. Para isso, adicionou-se 7,5 mL de tampão fosfato de sódio 245 mM, pH 7, por grama de substrato nos frascos. Os frascos foram então colocados em um agitador orbital a 150 rpm, a temperatura ambiente, por 90 minutos, conforme descrito anteriormente (Nascimento *et al.*, 2015) Após a etapa de agitação, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação das atividades da protease e fibrinolítica.

2.5. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi medida seguindo o método descrito por Ginther (1979). Para isso, foram preparadas misturas de ensaio contendo 1,0 mL de hidrocloreto de TRIS 0,2 M, pH 7,2, 10⁻³ M de CaCl₂, 1% de azocaseína e 150 µL do meio de cultura gasto. Essas misturas foram incubadas a 28 °C por 1 hora. Após a interrupção da reação pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético a 10%, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos. Em seguida, 0,8 mL do sobrenadante foi transferido para um segundo tubo

2.6. Determinação de proteínas e atividade colagenolítica

A concentração de proteína foi determinada de acordo com ao método de Smith et al. [12]. Albumina de soro bovino foi usada como proteína padrão. A atividade colagenolítica foi determinada de acordo com ao método descrito por Chavira et al. (1984). Resumidamente, uma alíquota (50 µL) da amostra foi adicionado a 5,0 mg de Azocoll solubilizado em 950 µL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,1 M). A reação ocorreu a 35°C durante 1 h sob agitação. A absorbância do sobrenadante foi medida em 520nm usando um espectrofotômetro Ultrospec 7000 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A atividade específica foi determinada por meio de

atividade/proporção de proteína e expressa em U/mg.

2.7. Purificação das proteases

O líquido metabólico foi precipitado com acetona a 70% e aplicado em uma Coluna de troca iônica DEAE-Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl, pH 8,0 (0,1 M), onde foram coletadas amostras do Não Adsorvido utilizando o mesmo tampão. Frações contendo proteínas foram agrupadas após a análise, e todo o processo foi monitorado a 215nm usando um espectrofotômetro.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foram capazes de ocupar completamente o substrato em 72 horas nas condições analisadas, demonstrando rápida colonização e degradação do substrato. Por ser um fungo filamentosos, é capaz de suportar altas densidades de biomassa e baixa umidade. A rápida colonização do substrato também pode ser devido à riqueza de nutrientes presente farelo de trigo mostrando que este é um substrato valioso na fermentação de fungos filamentosos (Wu *et al.* 2022)

O processo de pré-purificação por meio de precipitação cetônica mostrou ser um processo determinante na obtenção de colagenases, como pode ser observado na tabela 1, aumentando aproximadamente 5% a atividade proteolítica e colagenolítica em relação ao extrato bruto. Esse aumento era esperado, uma vez que esses processos visam remover contaminantes não proteicos e proteínas que não são de interesse biotecnológico, e está de acordo com outros estudos publicados, como o de Novelli (2016), que purificou proteases secretadas por *Aspergillus niger*, *A. flavipes*, *A. brasiliensis*, *A. oryzae* e *Penicillium roquefortii* em farelo de trigo e soja, atingindo atividade de protease de até 40 U/ml. É importante ressaltar também que, após a precipitação a amostra foi concentrada 20 vezes, portanto, como primeira etapa no processo de purificação, a precipitação fracionada tem se mostrado eficiente.

| AMOSTRA | ATIVIDADE PROTEASICA (U/mL) | ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA (U/mL) |
|-------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| EXTRATO BRUTO | 125.46 | 216.1 |
| PRECIPITADO CETÔNICO | 140.6 | 226.3 |
| PURIFICADO | 150.47 | 165.4 |

As amostras também foram submetidas à cromatografia líquida em sistema AKTASart utilizando como resina DEAE-Sephadex. Em relação à atividade enzimática das amostras purificadas, observou-se um desempenho significativo tanto nas atividades proteolíticas quanto colagenolíticas como pode ser observado na tabela, chegando até a 165.5 U/mL, o que demonstra um excelente possibilidade do uso deste microrganismo para obtenção de colagenases a partir de Fermentação em estado solido nas condições observadas.

4 CONCLUSÃO

Destaca-se a produção de proteases colagenolíticas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando *Mucor subtilissimus* como microrganismo produtor. Os resultados obtidos

demonstraram a capacidade deste fungo em secretar enzimas com atividade colagenolítica promissora. Através do processo de FES, foi possível obter um extrato bruto enzimático com atividade proteolítica e colagenolítica significativas. Os resultados deste estudo contribuem para o avanço do conhecimento na produção de proteases colagenolíticas por *Mucor subtilissimus* utilizando a estratégia de FES. Essas enzimas têm grande relevância na indústria cosmética, alimentícia e de saúde, devido às suas propriedades de degradação do colágeno, podendo ser exploradas no desenvolvimento de produtos com aplicações terapêuticas e estéticas. Portanto, conclui-se que *Mucor subtilissimus* é um microrganismo promissor para a produção de proteases colagenolíticas por FES, e novas pesquisas podem explorar ainda mais o potencial biotecnológico dessas enzimas e suas aplicações em diferentes setores industriais.

REFERÊNCIAS

BHAGWAT, P.K. et al. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 15, 43-55. 2018.

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

CHAVIRA Jr, R., Burnett, T. J. e Hageman, J. H. 1984. **Bioquímica analítica**, 136(2), 446-450.

COSTA, O.Y.A., Pijl, A., Houbraeken, J., van Lith, W., Kuramae, E.E. (2023). Soil substrate source drives the microbes involved in the degradation of gelatin used as a biostimulant. **Applied Soil Ecology**. Retrieved 14 April 2023.

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**, 60. 2019.

GINTHER, C.L. Esporulação e produção de serina protease e cefamicina C por *Streptomyces lactamdurans*, **Antimicrob. Agents Chemother.** 15 (1979) 522-526.

JORDAN, G.H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy-center, non-placebo controlled study. **J Sex Med**, 5, 180-187.

NASRI, M. Bioactive Peptides from Fish Collagen Byproducts. **Byproducts from Agriculture and Fisheries**, 309-333. 2019.

NASCIMENTO, T.P., Sales, A.E., Porto, C.S., Brandão, R.M.P., Campos-Takaki, G.M., Teixeira, J.A.C., Porto, T.S., Porto, A.L.F., Converti, A. (2016). Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, 1025, 16-24.

NASCIMENTO, T.P., Sales, A.E., Porto, C.S., Brandão, R.M.P., Takaki, G.M.C., Teixeira, J.A.C., Porto, T.S., Porto, A.L.F. Produção e caracterização de uma nova protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 por fermentação em estado sólido. **Enzyme Res.** 8 (2015) 81–91

NOVELLI, P. K., Barros, M. M. and Fleuri, L. F. 2016, Food Chem. Elsevier Ltd, 198, 119-

24.

OLIVEIRA, V.M. et al. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet**, 11(3), 243-255. 2017.

SOUZA, P.M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Braz. J. Microbiol**, 46(2), 315-334. 2015.

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

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

WANG, S., WU, Y., LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New Biotechnology**, 28(2). 2011.

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**, 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**, 8, 51-59. 2017.

Wu, J., Ren, L., Zhao, N., Wu, T., Liu, R., Sui, W., & Zhang, M. (2022). Solid-state fermentation by *Rhizopus oryzae* improves flavor of wheat bran for application in food. **Journal of Cereal Science**, 107.