

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PROTEASE
FIBRINOLÍTICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA, SEMI-
SÓLIDA E EXTRATIVA UTILIZANDO UMA ESPÉCIE DE
BACILO DA AMAZÔNIA

RAIMUNDO FELIPE DA CRUZ FILHO

MANAUS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

RAIMUNDO FELIPE DA CRUZ FILHO

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PROTEASE
FIBRINOLITICA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA, SEMI-
SÓLIDA E EXTRATIVA UTILIZANDO UMA ESPÉCIE DE
BACILO DA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia (área de concentração em Saúde).

Orientadora: Prf^a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS
2013

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Cruz Filho, Raimundo Felipe da

C657a Avaliação dos processos de produção de protease fibrinolítica por fermentação submersa, semi-sólida e extrativa utilizando uma espécie de bacilo da Amazônia / Raimundo Felipe da Cruz Filho. - Manaus: UFAM, 2013.

105 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Profª. Dra.. Maria Francisca Simas Teixeira

1. Protease fibrinolítica 2. Fermentação extrativa 3. Bacillus
4. Fermentação submersa I. Teixeira, Maria Francisca Simas
(Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(2007) 544.473:577.15(043.2)

Ao meu pai (*in memoriam*),
e minha Mãe (*in memoriam*),
meus irmãos e uma penca
de sobrinhos sempre
presentes em minha
vida, pelo incentivo
para a realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por ser e também por mostrar o caminho;

A minha orientadora pelo acompanhamento constante, e por sua paciência com as minhas limitações;

Aos meus familiares pelo apoio;

A Professora Dra. Rosana Palheta e ao Professor Dr. Januário Gama dos Santos que auxiliaram na discussão da temática e contribuíram no delinear do caminho;

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de poder evoluir sempre;

Aos colegas do Laboratório de Micologia e Microbiologia pelo incentivaram e cumplicidade.

OBRIGADO.

O meu amor por Deus não é perfeito,
perfeito é o amor que me conduz.
Eu abri meus olhos para um novo dia
quando encontrei Jesus.
E hoje canto esse amor de peito aberto
sem ter medo de entregar meu coração,
pois foi Ele quem me deu amor primeiro
antes de eu pedir perdão!
Só Jesus me guia
E é por isso que eu canto em seu louvor
Nasce um novo dia
Jesus Cristo é meu único Senhor

“Leonardo Sullivan”

RESUMO

As proteases fibrinolíticas degradam coágulos de fibrina, por isso têm um importante papel na indústria farmacêutica como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares. Estes biocatalisadores foram descobertos gradualmente a partir de plantas, insetos, anelídeos, serpentes e micro-organismos (bactérias e fungos). Doenças cardiovasculares tem sido a principal causa de morte no mundo. Uma das principais causas de doenças cardíacas é o acúmulo de fibrina nas artérias, acarretando trombose. De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 17,5 milhões de pessoas morrerão este ano de doenças cardiovasculares, e em 2030, esse montante será de 23,6 milhões. Tendo em vista o grande potencial da biodiversidade microbiana regional Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na produção de medicamentos, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de (1) avaliar o crescimento de *Bacillus stearothermophilus*, (2) estabelecer os parâmetros de crescimento associado a produção de proteases fibrinolíticas por fermentação submersa e (3) verifica o efeito da fermentação extrativa na separação dessas enzimas. Neste estudo foram empregados técnicas de fermentação extrativa e fermentação semi-sólida. Por fermentação submersa foram determinados os seguintes parâmetros: Perfil do crescimento de *Bacillus stearothermophilus* e a produção de protease utilizando 100mL do meio líquido [(g/L) KH_2PO_4 2g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000mL] pH 7,2 suplementado com gelatina 0,5%, em frasco de Erlenmeyer de 500mL. O crescimento da bactéria foi determinado a 610nm, de 2 em 2 horas, durante 36 horas. Na Determinação das melhores condições para produção de proteases foram avaliados a influência do pH; agitação, temperatura, a idade do inóculo, da concentração do substrato, a influência das fontes de naturais de carbono (tapiocas, araruta e crueira), fontes de nitrogênio e aeração. No extrato recuperado foi realizado também bioensaio de toxicidade em *Artemia salina* e testes de degradação *in vitro* do coágulo

sanguíneo pelos métodos da placa de fibrina e degradação do coagulo artificial em tubo. Foi determinado também o coeficiente de partição (K), o fator de purificação (FP) e a recuperação da enzima. A fermentação semi-sólida foi realizada utilizando como substrato 10g feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], com 60% umidade, pH 5,0 em frasco Erlenmeyers de 250 mL. Na fermentação extrativa as melhores condições foram: pH 5,0; 180 rpm e 25 °C, no sistemas utilizaram PEG 1000 (g/mol^{-1}) a 20% (p/p) e sais fosfato a 15% (p/p) com K de 1,05; FP de 1,00; Y de 152,54. Halo de 34 mm na placa de fibrina e degradação parcial do coagulo em tubo. Na fermentação semi-sólida a produção de protease foi de 8,87 (U/mL), halo translucido de 23 mm em placa de fibrina com degradação total do coagulo de sangue em 24h. No presente estudo, protease de *Bacillus stearothermophilus* produzido em fermentação extrativa e fermentação semi-sólida foi avaliada, demonstrando nas condições ótimas de cultivo que este micro-organismo apresenta fisiologia para aplicações industriais na produção de protease fibrinolítica.

ABSTRACT

The fibrinolytic proteases degrade fibrin clots and therefore play an important role in the pharmaceutical industry as chemotherapeutic agents in the treatment of cardiovascular diseases. These biocatalysts were gradually discovered from plants, insects, earthworms, snakes and microorganisms (bacteria and fungi). Cardiovascular disease has been one of the leading causes of death in the world. A major cause of heart disease is the accumulation of fibrin in the arteries, causing thrombosis. According to the World Health Organization (WHO), about 17.5 million people will die of cardiovascular disease this year, and in 2030, this amount will be 23.6 million. Given the great potential of microbial biodiversity and the growing regional Amazon applicability of enzymes in the production of drugs, this research was conducted with the objective to (1) evaluate the growth of *Bacillus stearothermophilus*, (2) establish growth parameters associated with production of fibrinolytic proteases in submerged fermentation and (3) assess the effect of the extractive fermentation in the separation of these enzymes. In this study techniques of extractive fermentation and solid-state fermentation were employed. By submerged fermentation the following parameters were determined: Profile of growth of *Bacillus stearothermophilus* and the production of protease using 100 mL of the liquid medium [(g / L) 2 g KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g, yeast extract 1 g, distilled water 1000 ml] pH 7.2 supplemented with 0.5% gelatin in an 500 mL Erlenmeyer flask. The growth of the bacteria was determined at 610 nm, once every 2 hours for 36 hours. To determine the best conditions for the production of proteases were evaluated the influence of pH, stirring and temperature, age of inoculum and substrate concentration, the influence of natural sources of carbon (tapioca, arraruta and crueira), nitrogen sources and aeration. In the recovered extract was also performed a toxicity bioassay in *Artemia salina* and degradation tests *in vitro* of the blood clot by the fibrin plate method and the artificial clot degradation in tube. In addition, the partition coefficient (K), the purification factor (PF) and recovering the enzyme were determined. The solid-state

fermentation was performed using as substrate 10g of manteiguinha bean [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] with 60% humidity, pH 5.0 in a 250 ml Erlenmeyer flask. In extractive fermentation the best conditions were pH 5.0, 180 rpm and 25 °C in systems using PEG 1000 (g/mol-1) to 20% (w/w) and phosphate salts 15% (w/w) with K 1.05; FP 1.00; 152.54 Y. 34 mm halo in fibrin plate and partial degradation of the clot in tube. In the solid-state fermentation, the production of protease was 8.87 (U/mL), 23 mm of translucent halo in fibrin plate with total degradation of the blood clot in 24 hours. In this study, protease produced from *Bacillus stearothermophilus* by extractive fermentation and semi-solid fermentation was evaluated, showing in the optimum cultivation conditions that this microorganism presents physiology for industrial application in the production of the fibrinolytic protease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central para se determinar o efeito do pH, agitação e temperatura na produção da protease	33
Tabela 2 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro (4) repetições no ponto central para determinar a influência da idade do inóculo e da concentração do substrato.....	34
Tabela 3 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção de protease.....	35
Tabela 4 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações e massa molar do PEG e sais de fosfato.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fotomicroscópio: Gênero <i>Bacillus</i> sp. (Coloração de Esporo).....	16
Figura 02: Fotomicroscópio de <i>Bacillus stearothermophilus</i> (Coloração de Gram) ...	17
Figura 03. Processo de coagulação em um vaso traumatizado.	22
Figura 04. Mapa conceitual da via intrínseca para a formação do coágulo (cascata de coagulação)	24
Figura 05. Mapa conceitual da via extrínseca para a formação do coágulo (cascata de coagulação)	24
Figura 06. Esquema descritivo da trombose em diferentes partes do corpo humano ..	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Características importantes do Gênero <i>Bacillus</i>	16
2.2 Enzimas Proteolíticas	17
2.3 Proteases Fibrinolíticas	19
2.4 Formação do coágulo sanguíneo	21
2.4.1 Mecanismo da coagulação	21
2.4.2 Cascata de coagulação	22
2.4.2.1 Via intrínseca	22
2.4.2.2 Via extrínseca	23
2.4.3 Trombose	25
2.5 Fermentação Extrativa em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA).....	26
2.5.1 Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)	26
2.5.2 Fermentação Extrativa	28
2.6 Fermentação Semi-Sólida (FSS)	29
3 METODOLOGIA	32
3.1 Micro-organismo e manutenção das culturas	32
3.2 Fermentação Submersa	32
3.2.1 Perfil do crescimento de <i>Bacillus stearothermophilus</i> e produção de protease ..	32
3.2.2 Determinação da atividade proteolítica	32
3.3 Determinação das melhores condições para produção de proteases	33
3.3.1 Avaliação da influência do pH; agitação e temperatura na produção de protease	33
3.3.2 Determinação da influência da idade do inóculo e da concentração do substrato na produção de protease	33
3.3.3 Determinação da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da protease	34
3.3.4 Determinação da influencia da aeração associado à produção de protease	35
3.4 Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	36
3.4.1 Eclosão dos cistos	36
3.4.2 Teste de toxicidade	36
3.5 Fermentação extrativa e purificação de protease em SDFA	36
3.5.1 Preparação dos sistemas de duas fases aquosa	36

3.5.1.1 Inoculação de <i>Bacillus stearothermophilus</i> no sistema de duas fases aquosa .	36
3.5.2 Determinação das proteínas totais	36
3.5.3 Determinação do coeficiente de partição, recuperação e fator de purificação	37
3.6 Fermentação Semi-sólida (FSS)	38
3.6.1 Tratamento do substrato feijão manteiginha [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp]	38
3.6.2 Inoculação de <i>Bacillus stearothermophilus</i> no substrato	38
3.6.3 Extração das enzimas proteolíticas fibrinolíticas	38
3.7 Teste de degradação <i>in vitro</i> do coágulo sanguíneo: Método placa de fibrina	38
3.8 Teste de degradação <i>in vitro</i> do coágulo sanguíneo: Método degradação do coagulo artificial em tubo	39
3.9 Determinação da composição centesimal do feijão manteiginha [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp]	39
3.10 Análise estatística	40
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 1: Declaração de pedido de patente e Relatório descritivo	52
CAPÍTULO 2: Artigo 1: Fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas - SDFA para produção de protease fibrinolítica de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	79
CAPÍTULO 3: Artigo 2: Parâmetros para produção e partição de protease de <i>Bacillus stearothermophilus</i> isolados de solo Amazônicos em sistema de duas fases aquosas-SDFA	91

1 INTRODUÇÃO

As proteases fibrinolíticas são biocatalizadores que degradam coágulos de fibrina, por isso têm um importante papel na indústria farmacêutica como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares (CHO et al., 2004; DAS; PRASAD, 2010; FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Foram identificados gradualmente a partir de plantas, insetos, anelídeos, serpentes e micro-organismos (bactérias e fungos) (PENG et al., 2005; PATEL et al., 2012).

Doenças do sistema circulatório tem sido a principal causa de morte no mundo. De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente cerca de 17,5 milhões de pessoas morrem de doenças cardiovasculares. E em 2030, esses valores ultrapassam os 23,6 milhões de pessoas. E uma das principais causas dessas enfermidades é o acúmulo de fibrina nas artérias, denominadas trombose intravascular (MINE et al., 2005; MANDER et al., 2011).

O tratamento para as doenças cardiovasculares, a exemplo da trombose se baseia principalmente no processo de hidrólise da fibrina por enzimas trombolíticas, que representa um mecanismo de defesa fundamental contra essas patologias (LOTTERMOSER et al., 1998; AGREBI et al., 2009).

Com base no mecanismo de ação, as enzimas fibrinolíticas de origem microbiana são classificados em três tipos: serinaprotease [nattokinase (*Bacillus subtilis*)], metaloprotease (*Armillari amellea*), a associação destas (metaloprotease e serinaprotease) e protease (*Streptomyces* sp. Y405) (SIMKHADA et al., 2010). Assim, vários estudos estão em desenvolvimento na busca de novas fontes trombolíticas seguras e de baixo custo.

Diversas pesquisas mostram que espécies de *Bacillus*, entre outras bactérias, produzem uma variedade de biocatalisadores fibrinolíticos, especialmente em condições de fermentação submersa (CHANG et al., 2012; RAAFAT et al., 2012). Entretanto, estudos demonstram que fatores nutricionais: fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físico-químicos: como

concentração do inóculo, temperatura, pH e o taxa de crescimento influenciam de forma significativa na produção desses biocompostos (SINGH et al., 2004; BOOMINADHAN et al., 2009; SUNDARARAJAN et al., 2011).

A fermentação extrativa também está sendo empregada na produção de protease fibrinolítica. Este bioprocesso consiste na fermentação submersa associada ao SDFA, um método eficiente para cultivar micro-organismo e produzir enzimas, concentrando e purificando ao mesmo tempo entre duas fases líquidas (PANDEY; BANIK, 2011).

Tendo em vista o grande potencial da biodiversidade microbiana regional Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na produção de medicamentos, esta pesquisa foi realizada com os objetivos de (1) avaliar o crescimento de *Bacillus* sp., (2) estabelecer os parâmetros de crescimento associado à produção de proteases fibrinolíticas por fermentação submersa e (3) verificar o efeito da fermentação extrativa na separação dessas enzimas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características importantes do Gênero *Bacillus*

A designação bacilo está restrita às bactérias que tem formato de bastonetes, entre estas encontra-se o gênero *Bacillus* (Figura 01), representado por 77 espécies que são Gram positivas, esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, apresentando ou não motilidade, compreendendo várias espécies sapróbias e algumas patogênicas ao homem, além disso, produzem enzimas hidrolíticas, como as proteases, mananases e glucanases, são cosmopolitas e encontradas também em alimentos *in natura* ou industrializados (ALCARAZ et al., 2010; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; FRITZE, 2004; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Integrante deste grupo, o *Bacillus stearothermophilus* (Figura 02) está sendo ferramenta de estudo como fonte de enzimas fibrinolíticas. Bactérias desta espécie apresentam as características descritas acima e ainda apresentando motilidade por flagelos peritríqueos e apresentam temperatura ideal de crescimento na faixa de 55-60 °C. Os esporos do *B. stearothermophilus* são extremamente termorresistentes, haja vista, serem muito utilizados como indicadores biológicos no monitoramento de processos de esterilização por calor úmido. Esporos do *B. stearothermophilus* não são patogênicos para homens e animais e são atóxicos (VIEDMA et al., 2009; PINHO, 2003)

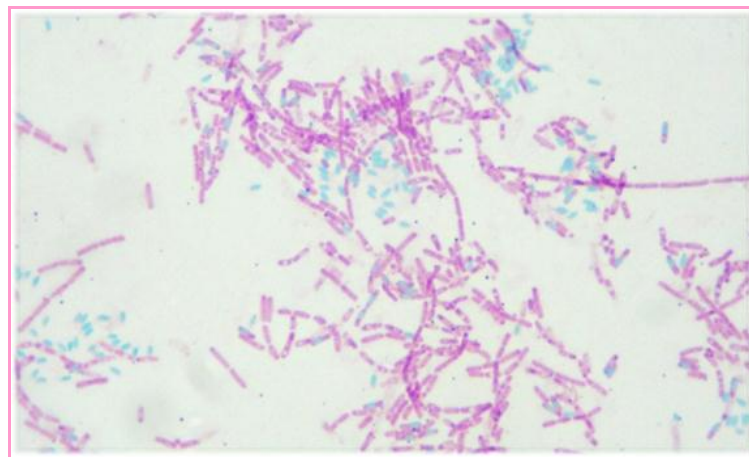


Figura 01: Fotomicroscópio: Gênero *Bacillus* sp. (Coloração de Esporo)

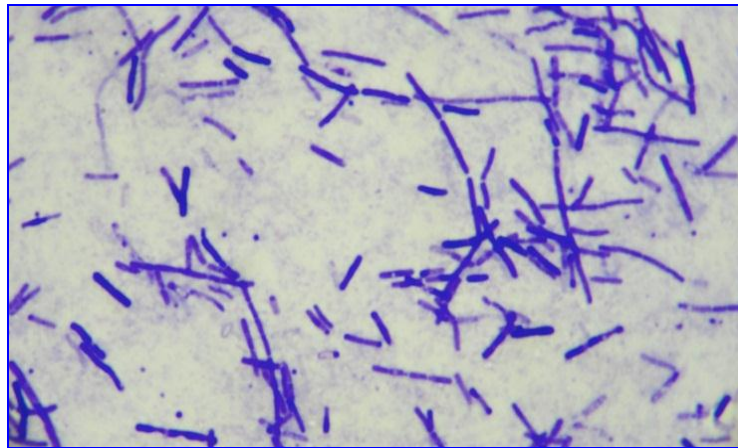


Figura 02: Fotomicroscópio de *Bacillus stearothermophilus* (Coloração de Gram)

2.2 Enzimas Proteolíticas

Proteases de origem microbiana são as mais importantes enzimas hidrolíticas, porque desempenham importantes funções nos processos metabólicos celulares, assim estão em crescente aplicação nos diversos setores industriais, registrando um aumento equivalente a 7,6% ao ano, taxa que representa um montante de U\$ 6 bilhões em 2011, no mercado mundial corresponde aproximadamente 60% das vendas de enzima (SUNDARARAJAN et al., 2011; LEARY et al., 2009; SHIVANAND; JAYARAMA, 2009).

Enzimas proteolíticas, embora produzidas em grande escala e de uso contínuo em diversos processos industriais, ainda não são suficientes para atender à crescente demanda dos diferentes mercados (SUNDARARAJAN et al., 2011; PUNITHA et al., 2009).

Em função do rápido crescimento e do pequeno espaço exigido para cultivos fermentativos, fungos e bactérias são preferidos pela indústria de enzimas em detrimento a outras fontes de proteases não microbianas. Aliadas a essas propriedades, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas originárias de outras fontes, associado aos processos fermentativos que se apresentam economicamente e ambientalmente viáveis (LADEIRA et al., 2010; PELIZER et al., 2007; RAO et al., 1998).

Segundo Sundararajan et al. (2011), Ladeira et al. (2010) e Singh et al. (2004) as proteases alcalinas produzidas por *Bacillus* sp. apresentam-se como as melhores fontes comerciais disponíveis atualmente em relação as demais proteases de origem fúngica, animal e vegetal.

A classificação quanto à natureza química do sítio catalítico aponta para quatro principais tipos de proteases: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e metaloprotease que possuem, respectivamente, resíduos de aminoácido serina, cisteína, ácido aspártico e íon metálico bivalentes no sítio ativo que estão envolvidos na atividade catalítica (SILVA-LÓPEZ, 2010; FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011; TREMACOLDI, 2009).

Proteases são altamente sensíveis às concentrações de íons H^+ no meio, necessitando de uma faixa de pH ótima para expressar a máxima atividade enzimática. Assim, são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas em função do pH em que apresentam atividades ótimas (CASTRO et al., 2009).

Proteases ácidas dependem de ácido aspártico para desenvolverem ação catalítica, com atividade máxima em pH baixo, têm elevada utilização na indústria alimentícia e de bebidas, apresentam pH ótimo entre 2,0 e 4,0 (VISHWANATHA et al., 2009; CASTRO et al., 2009). As neutras apresentam atividade em uma estreita faixa do pH 7,0, com baixa termotolerância. As metaloproteases pertencem ao grupo destas proteases, necessitando de íons metálicos bivalentes para expressão da atividade enzimática ótima. Esse grupo de enzimas está sendo largamente usado na indústria de alimentos devido à função catalítica sobre aminoácidos hidrofóbicos, de pH neutro (CASTRO et al., 2009; SANDHYA et al., 2005).

As proteases alcalinas são identificadas por apresentarem atividade ótima em pH entre 8,0 a 14,0 termotolerantes com alta especificidade pelo substrato, com capacidade de resistir a ambientes desidratados (CASTRO et al., 2009; HAJJI et al., 2008; GENCKAL; TARI, 2006). Essas enzimas bacterianas apresentam inúmeras aplicações nas indústrias alimentícias e

químicas. Espécies do gênero *Bacillus*, principalmente, possuem alta capacidade de produção de proteases alcalinas, que são amplamente utilizadas nas indústrias e possuem alta atividade catalítica (DAS; PRASAD, 2010; JOO; CHANG, 2006).

Para espécies de *Bacillus*, a produção de proteases é fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura, e tempo de incubação, além de fatores como componentes do meio e a presença de íons metálicos (SANTOS, 2009; JOHNVESLY; NAIK, 2001).

Em função do exposto, proteases são enzimas altamente utilizadas na indústria alimentar, farmacêutica, de detergentes, diagnósticos, de resíduos e biotecnológica, correspondendo a 65% do montante comercializado no mercado mundial de biocatalizadores (RAJMALWAR; DABHOLKAR, 2009; GUPTA et al., 2002; RAO, 1998).

2.3 Proteases Fibrinolíticas

Define-se fibrinólise como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina. O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina, constituído por diversas proteínas (proteases séricas e inibidores), que regulam a geração de plasmina, produzida a partir de uma pró-enzima inativa (plasminogênio), que tem por função degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular (FERREIRA et al., 2010; FRANCO, 2001).

Enzimas fibrinolíticas são proteases capazes de degradar diferentes tipos e coágulos sanguíneos, pois apresentam alta especificidade pela fibrina, haja vista, esta desempenhar importante papel na coagulação sanguínea (LIMA et al., 2006; FRANCO, 2001).

Enzimas do sistema fibrinolítico são todas serino-proteases, ao passo que os inibidores da fibrinólise são membros da superfamília de proteínas serinas (inibidores de proteases séricas). Destas proteínas são conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o t-PA (ativador do plasminogênio do tipo tecidual) e o u-PA (ativador do plasminogênio do tipo

uroquinase) (ZHANG et al., 2007; FRANCO, 2001; COLLEN; LIJNEN, 2004). Os dois ativadores têm alta especificidade de ligação com o respectivo substrato (plasminogênio) e promovem hidrólise de uma única ligação peptídica (ZHANG et al., 2007; KIM; CHOI, 2000).

Somada a essas ações, com base nos mecanismos catalíticos das enzimas microbianas, as fibrinolíticas são classificadas em três tipos: serino-protease (*Bacillus natto*) metaloprotease (*Armillaria mellea*), a mistura de ambas serina e metaloprotease (*Streptomyces* sp. Y405) (SIMKHADA et al., 2010; HUA et al., 2008; CHANG et al., 2005).

As propriedades químicas e fisiológicas de catalisadores fibrinolíticos já foram caracterizadas, além da eficácia comprovada como agente anti-trombolítico (LU et al., 2010; FRANCO, 2001). Estes produtos biológicos já se encontram comercializados como medicamentos e como complemento alimentar (KIM et al., 2010).

As proteases fibrinolíticas foram descobertas a partir de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus hemolyticus*, bactérias produtoras de estafiloquinase e estreptoquinase respectivamente, ambas são empregadas na medicina, em terapia anti-trombolítica (SANTOS, 2009; COLLEN; LIJNEN, 1995).

Atualmente, estas enzimas são produzidas por diferentes organismos, dentre os quais se destacam bactérias, fungos, algas, minhocas e ainda veneno de cobra (LU et al., 2010; SIMKHADA et al., 2010; SANTOS, 2009; SUN et al., 2006; QINGHUA et al., 2006; LEE et al., 2004). Com essa finalidade, o desenvolvimento de novas pesquisas para selecionar organismos produtores dessas enzimas torna-se essencial para a indústria farmacológica a nível econômico (SANTOS, 2009; PENG et al., 2005; MINE et al., 2005).

Dos organismos identificados como fonte de enzimas fibrinolíticas entre as bactérias se destaca o gênero *Bacillus*, e dentre estes o mais estudados são: *Bacillus nattu*, *Bacillus firmus* NA-1, *Bacillus* sp. KDO 13, *Bacillus subtilis* QK02, *Bacillus subtilis* 1MR-NK1;

Bacillus sp. KDO-13. Todos produtores da enzima fibrinolítica denominada natokinase isolados de alimentos fermentados (WANG et al., 2010; HAN et al., 2009; PENG et al., 2004; KO et al., 2004).

As enzimas fibrinolíticas produzidas pelas bactérias do gênero *Bacillus*, atraem interesse comercial por causa da eficiência desses micro-organismos nos processos fibrinolíticos incluindo a ativação da plasmina (WANG et al., 2005).

As aplicações das proteases fibrinolíticas na medicina são de grande importância, principalmente, nas intervenções em doenças cardiovasculares (LU et al., 2010; ERIKSSON et al., 2008), na indústria de alimentos, cosméticos e nos mais variados processos biotecnológicos. Em alguns produtos de uso tópico como as pomadas cicatrizantes encontram-se enzimas fibrinolíticas na composição (PENG et al., 2005; JUNG et al., 2005).

O uso de enzimas na produção de medicamentos e a utilização desses biocatalizadores como agentes terapêuticos são uma fatia significativa do mercado farmacêutico a nível global, com excelentes probabilidades de expansão, haja vista, o surgimento de novas informações referentes aos caminhos que esses biocatalisadores percorrem para executar seus efeitos terapêuticos nos processos clínicos aos quais são empregados (VLIEGHE et al., 2010; SEO; LEE, 2004).

2.4 Formação do coágulo sanguíneo

2.4.1 Mecanismo da coagulação

A coagulação sanguínea é uma complexa série de interações, que resulta na perda das características de fluido do sangue, formando um coágulo, entre o tecido lesado, plaquetas e os monômeros de fibrina. O mecanismo bioquímico para a formação do coágulo sanguíneo envolve uma sequência de interações proteicas na qual ocorre a conversão do fibrinogênio que é solúvel no plasma, em fibrina (Figura 03). Essa série de etapas de ativações, sequenciais,

onde o substrato para cada enzima é uma pró-enzima que é ativada para atuar na próxima etapa da reação, formando um efeito “cascata” (CARLOS; FREITAS, 2007; GUYTON; HALL, 2006; FRANCO, 2001).

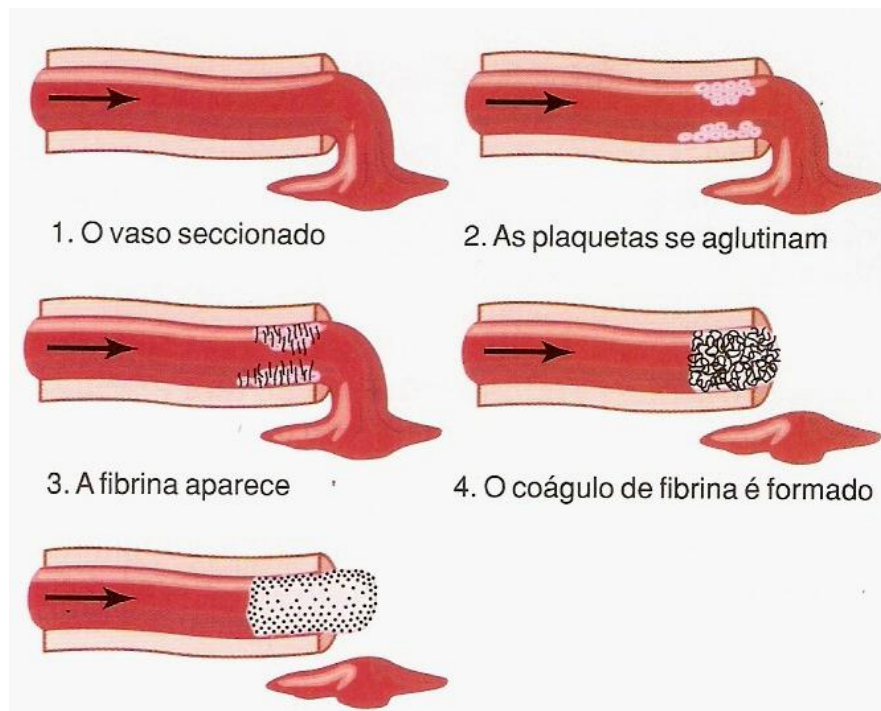


Figura 03. Processo de coagulação em um vaso traumatizado.
Fonte: Guyton e Hall (2006)

2.4.2 Cascata de coagulação

A coagulação sanguínea é o resultado final de uma série de reações entre várias proteínas plasmáticas, que recebem o nome de cascata de coagulação. Esse processo ocorre de duas formas distintas: a via extrínseca e a via intrínseca da coagulação. Os dois processos consiste em ativar formas inativas de enzimas proteolíticas, que quando apresentam-se funcionais provocam reações sucessivas, ou seja, em cascata (GUYTON; HALL, 2006; CARLOS; FREITAS, 2007).

2.4.2.1 Via intrínseca

A via intrínseca (Figura 04) ocorre quando o contato do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal com as células sanguíneas. A sequência de reações enzimáticas produz o coágulo sanguíneo nas diferentes etapas: (1) Fase de contato que envolve quatro proteínas: o fator XII, pré-caliceína, fator XI e cininogênio de alto peso molecular (CAPM). O fator XI na presença de CAPM adere-se à superfície exposta do vaso e é ativado pelo fator XIIa ligado à superfície. (2) As agitações do sangue fazem com que o fator XII converta-se em fator XIIa, resultando na liberação de fosfolipídios plaquetários ou fator III plaquetário (FP3). O fator XIIa atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo, constituindo a segunda etapa da via intrínseca. O fator XI atua sobre o fator IX ativando-o. Por sua vez, o fator IXa, ao atuar com o fator VIIIa, e com o FP3, ativando o fator X. (3) O fator X ativado combina-se com os fosfolipídios teciduais ou com fosfolipídios liberados pelas plaquetas, bem como fator V para formar o complexo denominado ativador de protrombina. A substância ativadora da protrombina inicia a ativação do fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). (4) A principal ação da trombina é a conversão do fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que são interligados pelo fator XIIIa, formando polímeros insolúveis de fibrina (CARLOS; FREITAS, 2007; GUYTON; HALL, 2006; FRANCO, 2001).

2.4.2.2 Via extrínseca

Processo pelo qual a ativação da protrombina é gerada em resposta ao contato do sangue com o tecido extra vascular, ou seja, o tecido lesado libera um complexo de vários fatores, denominado fator tecidual ou tromboplastina tecidual que por sua vez ativam o fator VII em fator VIIa. O fator III em conjunto com íons de cálcio e o fator VIIa formam um complexo enzimático que na presença de fosfolipídios convertem o fator X para fator Xa (as etapas seguintes correspondem as etapas 3 e 4 do item 2.4.2) (Figura 05) (CARLOS; FREITAS, 2007; GUYTON; HALL, 2006; FRANCO, 2001).

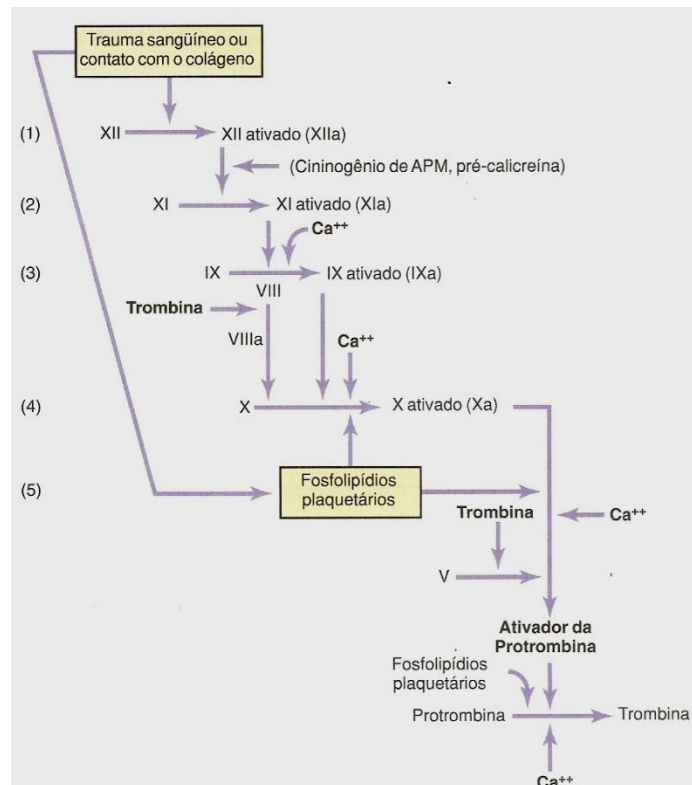


Figura 04. Mapa conceitual da via intrínseca para a formação do coágulo (cascata de coagulação). Fonte: Guyton e Hall (2006)

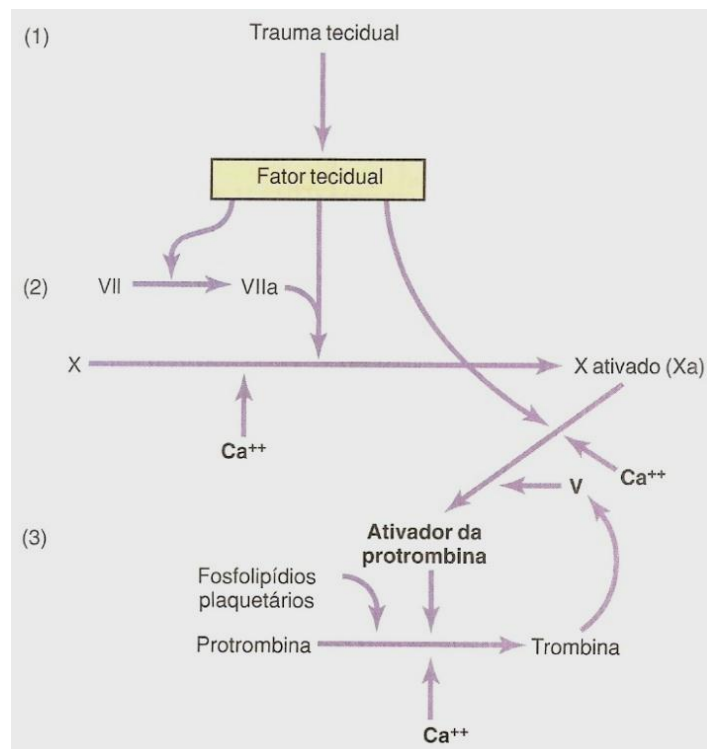


Figura 05. Mapa conceitual da via extrínseca para a formação do coágulo (cascata de coagulação). Fonte: Guyton e Hall (2006)

2.4.3 Trombose

Segundo Castro et al. (2006) e Lima et al. (2006) trombose é uma lesão vascular severa, que acarreta a ruptura da integridade do endotélio e a exposição da matriz subendotelial, que inclui proteínas de adesão como o colágeno e o fator de von Willebrand (fvW).

O fator de von Willebrand, previamente produzido e liberado pelo endotélio ou adsorvido do plasma sobre o tecido exposto, apresenta-se de forma essencial para adesão plaquetária, em particular nos vasos com alta tensão de cisalhamento, como as artérias e as arteríolas. Este fator se liga ao seu receptor glicoproteico GP Ib-IX-V, na superfície plaquetária e estabelece uma ligação transiente que reduz a movimentação da plaqueta (rolamento) facilitando a ativação. Após a captura da plaqueta, uma rápida estabilização da adesão faz-se necessária para que ocorra a formação do trombo (Figura 06) (SAVAGE; RUGGERI, 2007; CASTRO et al., 2006; LIMA et al., 2006).

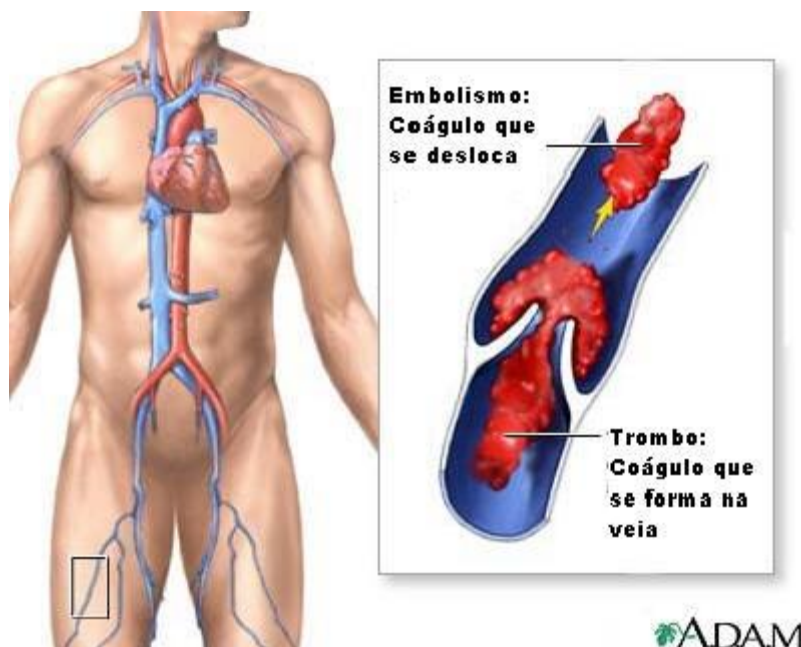


Figura 06: Esquema descritivo da trombose em diferentes partes do corpo humano.

Fonte: The Website: A.D.A.M (2011 © A.D.A.M., Inc. All Rights Reserved).

Segundo Savage e Ruggeri (2007), Castro et al. (2006) e Wagner e Burger (2003) este processo é inicialmente mediado pela interação do colágeno com o receptor glicoprotéico GPVI e com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa), receptor membro da família das imunoglobulinas exposto na superfície plaquetária.

Quando ocorre a ativação das plaquetas por seus respectivos agonistas, há alteração da conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, aumentando sua afinidade para seus principais ligantes: fibrinogênio, fator de von Willebrand e fibronectina. A interação do complexo $\alpha_{IIb}\beta_3$ -fibrinogênio/fibronectina/fvW com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de outra plaqueta ativada adjacente promove a interação cruzada plaqueta-plaqueta (SAVAGE; RUGGERI, 2007; CASTRO et al., 2006; LIMA et al., 2006).

O início do processo de agregação plaquetária ocorre pela ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e sua ligação ao fibrinogênio, via final comum à ativação promovida por todos os agonistas plaquetários, uma vez que essas interações induzem uma transdução de sinal que é essencial para as mudanças na organização do citoesqueleto e da agregação plaquetária (SAVAGE; RUGGERI, 2007; LIMA et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 17 milhões de pessoas morrem de trombose e outras patologias cardiovasculares a cada ano. A trombose intravenosa está fundamentada na formação de coágulo do sangue em um vaso sanguíneo, sendo esta uma das causas principais de uma variedade de doenças cardiovasculares. Os coágulos do sangue que têm como principal componente a fibrina, uma proteína formada pela ação do fibrinogênio através das proteólises da trombina. Os coágulos podem ser hidrolisados pela plasmina para evitar a trombose (WOLBERG, 2007; PENG et al., 2005; FRANCO, 2001).

2.5 Fermentação Extrativa em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

2.5.1 Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

O processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) apresenta atualmente grande interesse de pesquisadores na separação de biomoléculas, visando à aplicação destes sistemas, em escala laboratorial e industrial (MONTEIRO FILHO, 2010, MOURA et al., 2010).

A extração líquido-líquido técnica empregada comumente em diferentes processos industriais, é bastante utilizada na indústria petroquímica. Na indústria farmacêutica, a extração de antibióticos é realizada com solvente orgânico. No entanto, proteínas, organelas, fragmentos celulares, ácidos nucleicos ou mesmo células inteiras podem sofrer danos irreparáveis quando submetidas a esse tipo de processo, exigindo tecnologia alternativa quando se deseja sua purificação (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005).

O SDFA apresenta-se como um método eficiente e de baixo custo, constituído por duas fases polares imiscíveis que promovem a separação dos bioprodutos preservando suas principais características. Possui composição próxima de 70 a 90% de água, por isso são apropriados para purificação de materiais biológicos, minimizando os riscos de desnaturação das biomoléculas (SILVA; LOH, 2006; MOURA et al., 2010).

A separação das fases num SDFA é o resultado da incompatibilidade das soluções, tanto das de polímero-polímero, quanto as de polímero-sal, em função das concentrações destes compostos. A partição de uma proteína depende de suas propriedades físico-químicas, como a hidrofobicidade, carga e tamanho, e características do sistema como as cargas e massa molar do polímero, ou pela adição de sal (MONTERIO FILHO, 2010).

Entre os SDFA's, os mais estudados são o sistema polímero-polímero (polipropileno glicol X maltodextrina) e os de polímero-sais (Polietilenoglicol x sulfato de potássio) sempre dissolvidos em matriz aquosa. A utilização do Polietilenoglicol (PEG) apresenta-se vantajosa devido ao baixo custo deste polímero, associada às favoráveis propriedades físico-químicas dos sistemas PEG-Sais (SILVA; LOH, 2006; MOURA et al., 2010).

Rabelo et al. (2004) utilizaram SDFA para purificar bromelina, enzima presente nos frutos do abacaxi a partir do suco do mesmo. Após sua obtenção, a enzima manteve-se com boa atividade e a possibilidade de aplicação tecnológica. O mesmo ocorreu com a insulina de pâncreas de suínos, indicando o potencial desta metodologia na indústria farmacêutica (MONTERIO FILHO, 2010).

A maioria dos SDFA constituídos por Polietilenoglicol/sal o produto de interesse é comumente separado na fase superior rica em PEG, enquanto que, os subprodutos são dispensados na fase inferior rica em sal (BARROS et al., 2009).

O processo SDFA proporciona facilidade como: aumento de escala, rápida transferência de massa, utiliza temperatura ambiente, baixo custo de material., alta seletividade, reciclagem dos reagentes, as enzimas permanecerem estáveis no sistema devido à alta concentração de água, reagente não desnaturante. Por essa razão, esta metodologia apresenta-se como uma técnica potencialmente promissora para a obtenção de biomoléculas na indústria (CAVALCANTI et al., 2006; FERREIRA et al., 2009; MOURA et al., 2010).

2.5.2 Fermentação Extrativa

Essa tecnologia pode ser utilizada na recuperação de bioprodutos *in situ*, ou seja, no momento da fermentação ocorre a purificação dos mesmos. Dessa forma, tem sido sugerida para controlar a produto e o aumento da produtividade volumétrica de processo biotecnológico (ASHIPALA; HE, 2008; DELOISA et al., 2009; PANDEY; BANIK, 2011; MARQUES, 2010).

Fermentação extrativa utilizando SDFA, as células são consideradas como imobilizadas em uma das duas fases, e o produto desejado é particionado para a outra fase (MARQUES, 2010). Apresenta-se como um método de purificação alternativo, eficiente para concentrar e purificar parcialmente biomoléculas por particionamento entre as duas fases

líquidas. Faz uso de duas fases imiscíveis, entre dois polímeros ou entre polímero e uma solução salina em um ambiente constituído de 80 a 90% de água, portanto, proporciona um excelente ambiente para as células, organelas celulares e substâncias biologicamente ativas e possui propriedades favoráveis à sua aplicação em grande escala para a separação e purificação de enzimas (SINHA et al., 2000; NAGANAGOUDA; MULIMANI, 2008; SARAVANAN et al., 2008).

Sistemas de fermentação com base em SDFA oferecem a possibilidade da substituição da separação mecânica mais difícil entre as células e o produto, permitindo partição em fases opostas. SDFA tem sido aplicada em cultivos de micro-organismos com a finalidade de produção de enzimas extracelulares (PORTO et al., 2008).

O sistema polímero/sal apresenta preferência quando utilizado em grande escala em detrimento ao sistema polímero/polímero devido ao seu custo relativamente baixo, tempo de separação curto, alta seletividade e estabilização da estrutura das biomoléculas pelo polímero (MARQUES, 2010). Além disso, apresenta potencial para superar as limitações de fermentações microbianas em uma solução aquosa, tais como baixa solubilidade, inibição do substrato e degradação de produtos (WANG; DAÍ, 2010).

Fermentações extrativas em SDFA têm sido amplamente utilizadas nos processos de downstream de compostos como enzimas, biofármacos e demais produtos naturais. Deve ser entendido como fermentação extrativa que integra tanto a formação de produto quanto a purificação em um processo de etapa única, que facilita a recuperação imediata das biomoléculas (OOI et al., 2011).

2.6 Fermentação Semi-Sólida (FSS)

Fermentação semi-sólida (FSS) é um processo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre, usando um sólido natural como substrato ou suporte inerte (SANTOS

2007). Esse processo fermentativo é definido como um sistema de matriz sólida ligada a uma fase líquida e por uma fase gasosa, envolvendo o crescimento de micro-organismos em substrato sólido nos quais não há fase líquida livre e seu teor está presente de forma complexa ou adsorvida na matriz sólida (CORREIA, 2004; SANTOS, 2007).

A técnica de crescimento de micro-organismos por FSS ocorre na superfície do substrato ou em seu interior no caso de partículas porosas, o conteúdo líquido presente na matriz fermentativa deve ser mantido de modo que assegure a atividade metabólica microbiana, sem exceder a capacidade da matriz de reter líquido (PALMA, 2003; SANTOS, 2007).

O teor de umidade do substrato numa FSS deve variar entre 12% a 80%. Quando esse valor encontra-se abaixo do limite mínimo, a atividade metabólica dos micro-organismos é prejudicada. Já o limite superior da umidade é fixado em função da capacidade de absorção de líquidos pelo substrato (SANTOS, 2007).

As técnicas de FSS são preferidas por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e baixo custo de extração e purificação (SILVA et al., 2002; SOUZA et al., 2010).

Os substratos utilizados na fermentação semi-sólida na sua grande maioria são resíduos ou subprodutos da agroindústria (celuloses, hemiceluloses, ligninas, amidos, pectinas e proteínas), caracterizados como compostos heterogêneos, atuando como fonte de carbono e energia e, também, de suporte para crescimento microbiano (PANDEY, 2003; SOUZA et al., 2010).

O processo de fermentação semi-sólida apresenta algumas limitações que devem ser consideradas como a dificuldade de remoção do calor produzido pela atividade metabólica do micro-organismo, a heterogeneidade da mistura, o controle do crescimento celular. Além dos

parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes, o que torna complexo controlar e automatizar o processo (PALMA, 2003; SANTOS, 2007).

Processos fermentativos semi-sólidos que agregam valor a substratos bioindustriais atualmente já estão disponíveis para produção em grande escala, como a produção de ácido cítrico na Tailândia e na Indonésia, e de fitase no México (PALMA, 2003; SANTOS, 2007).

Bactérias também são utilizadas no processo de fermentação semi-sólida, como o *Bacillus subtilis* empregado na produção de protease fibrinolítica em substratos derivados de soja ou milho, além dos tradicionais alimentos fermentados (Natto) consumidos no Japão, China e Coreia (SUMI, et al., 1987; FUJITA, et al., 1993; KIM et al., 1996;. CHANG, et al., 2000;. PENG, et al., 2003; ZU et al., 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 Micro-organismo e manutenção das culturas

Bacillus stearothermophilus, da Coleção de Bactérias da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, preservado a 4 °C, em tubo de ensaio contendo ágar nutritivo inclinado foi objeto deste estudo. Para obtenção da cultura estoque os subcultivos foram realizados segundo a metodologia descrita por Santos (2009).

3.2 Fermentação Submersa

3.2.1 Perfil do crescimento de *Bacillus stearothermophilus* e produção de protease

O crescimento do *Bacillus stearothermophilus* associado à produção de protease foi realizada em 100 mL do meio líquido [(g/L) KH_2PO_4 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL] pH 7,2 (MACIEL et al., 2010; SILVA NEVES et al., 2006). O meio de fermentação foi suplementado com gelatina 0,5%, em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. O crescimento da bactéria foi determinado a 610 nm, de 2 em 2 horas, durante 36 horas (CRUZ FILHO et al., 2007). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 μm), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica (item 3.2.2).

3.2.2 Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica no extrato bruto (item 3.2.1), foram utilizados 0,25 mL do substrato (azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1 M , pH 7,6) e 0,15 mL do extrato enzimático. O sistema foi incubado por 1 hora a 25 °C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de 1,2mL de ácido tricloroacético 10% (m/v). As amostras foram

centrifugadas a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 0,8 mL foram transferidas para tubos de ensaios contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. O sistema de reação incluindo o branco, foi preparado em triplicata e a leitura feita a 440 nm de acordo com Leigton et al. (1973). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 440 nm igual a 0,1 em 60 minutos expressa em U.mL⁻¹ (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

3.3 Determinação das melhores condições para produção de proteases

3.3.1 Avaliação da influência do pH; agitação e temperatura na produção de protease

Para determinar o efeito do pH, agitação e temperatura na produção de protease por *Bacillus stearothermophilus* foram realizados cultivos em meio líquido (item 3.2.1), pH 5,0; 7,2 e 9,0. Os cultivos foram mantidos a 120, 150 e 180 rpm nas seguintes temperaturas: 25 °C, 35 °C; 45 °C (Tabela 1) (RODARTE, 2005; CUCOLO et al., 2006). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 µm), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica de acordo com o citado no item 3.2.2.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
pH	5,0	7,2	9,0
Agitação (rpm)	120	150	180
Temperatura (°C)	25	35	45

Tabela 1 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2³) com quatro (4) repetições no ponto central para se determinar o efeito do pH, agitação e temperatura na produção da protease.

3.3.2 Determinação da influência da idade do inóculo e da concentração do substrato na produção de protease

Nas condições experimentais, para a produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, os cultivos foram realizados em 100 mL de meio líquido (item 3.2.1), adicionado de gelatina 0,25%; 0,50% e 1,0%, como substrato. A fermentação foi realizada nas melhores condições identificadas no item 5.3.1, em frescos de Erlenmeyer de 250 mL por 36 horas, com retirada de amostras a cada 12 horas (SILVA NEVES et al., 2006; BRANCO et al., 2010).

Neste processo fermentativo foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central para avaliar os parâmetros, Idade do inóculo e da concentração do substrato [(gelatina) p/v] (Tabela 2). Ao término do processo de fermentação a biomassa foi separada por filtração em membrana (0,22 μ m) e, no extrato bruto, foi determinada a atividade proteolítica de acordo com o citado no item 3.2.2.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Idade do inóculo (h)	12	24	36
Concentração do substrato [(%) p/v]	0,25	0,50	1,0

Tabela 2 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro (4) repetições no ponto central para determinar a influência da idade do inóculo e da concentração do substrato.

3.3.3 Determinação da influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção da protease

Para avaliar a influência de diferentes fontes de carbono na produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, no meio de fermentação (item 3.2.1) foi adicionado tapioca, crueira, araruta 1,0% (p/v). Todos os cultivos foram realizados em 100 mL de meio, em frescos de Erlenmeyer de 250 mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. (TEIXEIRA et al., 2000)

Para avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, no meio de fermentação (item 3.2.1) foram adicionados

peptona, extrato de levedura e caseína 1,0% (p/v). Todos os cultivos foram realizados em 100 mL de meio, em frescos de Erlenmeyer de 250 mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (BOOMINADHAN; RAJAKUMAR, 2009).

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de fonte de carbono, selecionados no item 3.3, para produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, no meio de fermentação (item 3.2.1) foram adicionados as seguintes concentrações 0,25%; 0,50% e 1,0% (p/v). A suplementação do meio de fermentação com a fonte de nitrogênio selecionada no item 3.3.4 foi utilizada a 0,05%; 0,1% e 0,15% (p/v). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (PARIS et al., 2010).

Todos os cultivos foram realizados em 100 mL de meio em frescos de Erlenmeyer de 250 mL. Nestes experimentos foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 , com 4 repetições no ponto central para avaliar os parâmetros, concentração das fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 3). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 μ m), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica de acordo com o citado no item 3.2.2

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Fontes C (%)	0,25	0,50	1,0
Fontes N (g)	0,5	1,0	1,5

Tabela 3 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease.

3.3.4 Determinação da influencia da aeração associado à produção de protease

A avaliação do volume do frasco de fermentação foi feita conforme citação de Amaral (2007), utilizando-se volumes de meio de cultura equivalente a 30, 50 e 100 mL em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. A aeração foi determinada pela razão entre o volume do meio de cultura e o volume de frasco de Erlenmeyer ($V_{\text{meio}}/V_{\text{frasco}}$). Os cultivos foram realizados

nas condições selecionadas no item 5.3. A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 μm), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica de acordo com o citado no item 3.2.2.

3.4 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina*

3.4.1 Eclosão dos cistos

Para eclosão dos cistos de *A. salina* utilizou-se solução de sal marinho 3% (p/v), pH 6,5 esterilizada a 121°C por 15 minutos. O quantitativo de 0,1 g de cistos do microcrustáceo foi adicionado nessa solução e incubado durante 30 horas, a 30 °C, sob luminosidade (40 w), agitação constante (140 rpm), conforme o método de Harwig e Scott (1971) modificado por Atayde et al. (2011).

3.4.2 Teste de toxicidade

Após eclosão dos cistos, 100 μL da solução contendo náuplios foram transferidos para poços individuais de placas multipoços (6x4), seguindo-se a inoculação do extrato enzimático em diferentes concentrações (1000 mg/mL a 100 mg/L) completando-se o volume final de cada poço para 1 mL com solução salina sem larvas. Após 16 horas de contato com o extrato enzimático e com o branco foi determinada a taxa de mortalidade segundo a classificação de Harwig e Scott (1971), conforme a seguinte expressão:

O grau de toxicidade (mortalidade %) foi classificado segundo Harwig e Scott (1971): 0–9%= não tóxico (NT); 10 – 49% = ligeiramente tóxico (LT); 50–89% = tóxico (T); 90–100% = altamente tóxico (AT).

3.5 Fermentação extrativa e purificação de protease em SDFa

3.5.1 Preparação dos sistemas de duas fases aquosa

Após escolha das melhores condições para produção de protease por fermentação submersa, a fermentação extrativa foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central (tabela 4).

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Con. PEG	10%	15%	20%
MM PEG	1000	4000	6000
Com Sais	15%	20%	25%

Tabela 4 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações e massa molar do PEG e sais de fosfato.

O sistema foi preparado em frasco de Erlenmeyers de 125mL com massa final corresponde a 49 g: solução de sais de fosfatos monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4); PEG 1000; 4000 e 6000 (Tabela 4), pH selecionado no item 3.3.1. Após homogeneização o sistema foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos.

3.5.1.1 Inoculação de *Bacillus stearothermophilus* no sistema de duas fases aquosa

Após resfriamento, foi inoculado 1g de suspensão celular semelhante à escala 1 de McFarland, preparada em meio líquido (item 3.3). A fermentação extrativa foi conduzida a 180 rpm, 25 °C. Após 14h de incubação. Em seguida foi determinado o volume de cada fase do sistema e, as fases separadas com auxílio de pipeta volumétrica. Após esse procedimento foi determinado a atividade de protease (item 3.2.2) e a concentração de proteína (item 3.6.2) em cada uma das fases (Superior e Inferior).

3.5.2 Determinação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais presente no extrato enzimático bruto foi realizada através do método de Bradford (1976), utilizando como corante o "Coomassie Brilliant Blue". A relação entre a concentração de proteína e a absorbância produzida a 595 nm, foi realizada em soluções de soro albumina bovina em concentrações de 0-100 µg/mL.

3.5.3 Determinação do coeficiente de partição, recuperação e fator de purificação

Para se avaliar a purificação parcial pelo SDFA foram analisadas as respostas do coeficiente de partição (K); fator de purificação (FP) e rendimento (Y) das proteases (KIRSCH et al., 2012; FERREIRA et al. 2011; PANDEY; BANIK, 2011).

O coeficiente de partição (K) da enzima foi definido como a relação entre a atividade da enzima fase superior (As) e a fase inferior (Ai):

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

O fator de purificação (FP) foi calculado pela relação entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato bruto (Aeb):

$$PF = \frac{A_s/C_s}{A_{eb}/C_{eb}} \text{ (equação 2)}$$

“Cs” e Ceb” são as concentrações totais de proteínas, expressas em µg.mL⁻¹, na fase superior e no extrato bruto inicial, respectivamente.

A atividade de recuperação foi determinada como sendo a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato bruto e é expressa em percentagem:

$$Y = \left(\frac{A_s \times V_s}{A_{eb} \times V_{eb}} \right) \times 100 \text{ (equação 3)}$$

“Vs” e “Veb” são os volumes da fase superior e do extrato bruto respectivamente.

3.6 Fermentação Semi-sólida (FSS)

3.6.1 Tratamento do substrato feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

Neste bioprocesso foram utilizando 10g de feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] como substrato. Os grãos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. foram triturados em triturador Walita HR 2943/00. Para esterilização do substrato a 120 °C por 30 min, as amostras foram acondicionadas em Erlenmeyers com capacidade de 250 mL.

3.6.2 Inoculação de *Bacillus stearothermophilus* no substrato

Após resfriamento do substrato triturado e esterilizado, a umidade foi corrigida para 60%, adicionando-se solução tampão fosfato (pH 5,0). Em seguida foram inoculados 1000 µL de suspensão celular de *Bacillus stearothermophilus* com turbidez semelhante à escala um de McFarland 1. A fermentação foi conduzida a 25 °C por 24 h.

3.6.3 Extração das enzimas proteolíticas fibrinolíticas

Ao término da fermentação, o substrato foi hidratado na proporção 1/10 (p/v) e centrifugado a 8000xg e o sobrenadante foi separado por filtração em membrana 0,22 µm. A determinação da atividade proteolítica foi realizada como citado no item 3.2.2, e o controle negativo foi realizado com bruto líquido do feijão não fermentado. E o teste da degradação in vitro do coágulo sanguíneo foi feito de acordo com o item 3.7 e 3.8.

3.7 Teste de degradação *in vitro* do coágulo sanguíneo: Método placa de fibrina

A atividade da enzima fibrinolítica do extrato purificado de *Bacillus stearothermophilus* foi determinada pelo método de placa de fibrina. A placa de Petri (9 cm

de diâmetro contendo 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL de fibrinogênio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/mL), após a solidificação a mesma foi mantida em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. Foram confeccionados no gel furos de 3 mm de diâmetro para aplicação de 20 µL do extrato enzimático fibrinolítico bruto, em seguida as placas foram incubadas a 37 ° C durante 18 horas (SOE; LEE, 2004; WANG et al., 2011)

3.8 Teste de degradação *in vitro* do coágulo sanguíneo: Método degradação do coágulo artificial em tubo

A atividade enzimática em tubo foi verificada frente a um coágulo sanguíneo artificial *in vitro*. Um coágulo artificial de sangue foi formado pela coagulação espontânea, em um tubo de ensaio usando sangue de *Rattus norvegicus* Wister (Biotério Central-UFAM, protocolo CEUA: 111/2012). A ação fibrinolítica foi verificada pela degradação total do coágulo artificial após 24 h. O coágulo de sangue artificial foi mergulhada em 2 ml de do extrato enzimático fibrinolítico parcialmente purificado. Para o controle negativo, foi utilizado solução salina (HWANG et al., 2007).

3.9 Determinação da composição centesimal do feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

A umidade foi determinada em estufa a 105 °C, conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do IAL (2008). As cinzas foram determinadas por meio da calcinação das amostras em mufla a 550 °C. A determinação de proteínas foi realizada segundo o método de Kjeldahl, que consiste na quantificação do nitrogênio total, e o conteúdo de proteico foi calculado por multiplicação pelo fator 6,25. A determinação de lipídios foi realizada por

extração em Soxhlet (AOAC, 2001). A determinação de carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraída de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas (RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008)

3.10 Análise estatística

Para identificar diferenças significativas entre as variáveis foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software MINITAB 16.2.1 (2010).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.D.A.M, Education (2011) Acessado em 15/ 05/ 2011:

<http://adameducation.com/aiaonline.aspx>

AGREBI, R.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; JELLOULI, K.; MANNI, L.; NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1252–1259, 2009.

ALCARAZ, L. D.; MORENO-HAGELSIEB, G.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; HERRERA-ESTRELLA, L.; OLMEDO, G. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, v. 11, n. 332, p. 1471-2164, 2010.

AMARAL, P. F. F. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. 2007. 220 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ.

AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry. 12 ed. Washington, DC, 2001.

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

ATAYDE, H. M.; CARNEIRO, A. L. B.; MARTINS, M. S.; PALHETA, R. A. Bioensaio de toxicidade com espécie de *Artemia*. In: Teixeira, Maria Francisca Simas et al. (Org). *Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada. (Aplicações Biotecnológicas)*. Manaus. Edua, 2011. Cap. 11, p. 190-207.

BARROS. M. C. A. D.; SILVA, C. S.; PASOTTO, M. B. Estudo da hidrólise do ácido clavulânico na presença do Polietilenoglicol. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEQ-IC), Uberlândia, Minas Gerais, Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEQ-IC), 2009.

BOOMINADHAN, U.; RAJAKUMAR, R.; SIVAKUMAAR, P. K. V.; JOE, M. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. *Botany Research International*, v. 2, n. 2, p. 83-87, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCO, L. S. C.; ALMEIDA, M. M. T.; CAETANO, T. M.; PINTO, G. A. S.; AZEREDO, H. M. C. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por *Rhodotorula* sp. CNPAT-02 em processo batelada para obtenção de carotenoides. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Foz do Iguaçu, PR, Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2010.

CARLOS, M.M.L.; FREITAS, P.D.F.S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Veterinaria Brasília*, v.1, n.2, p.49-55, 2007.

CASTRO, H. C.; FERREIRA, B. L. A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FILGUEIRA, M.; PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C. R.; SANTOS, D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. J Bras Patol Med Lab. v. 42, n. 5, p. 321-332, outubro, 2006.

CASTRO, R.J.S.; ABREU, R.F.A.; PINTO, G.A.S. Estudo das Condições de Recuperação de Protease Produzida por Fermentação Semi-sólida. In: VII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal, RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal, RN, 2009.

CAVALCANTI, M. T. H. C.; PORTO, T. S.; BARROS NETO, B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA-JR, A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. Journal of Chromatography B, v. 833, p. 135–140, 2006.

CHANG, A.K.; KIM, H.Y.; PARK, J.E.; ACHARYA, P.; PARK, I.S.; YOON, S.M. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. J. Bacteriol, v. 187, p. 6909-6916, 2005.

CHANG, C. T.; FAN, M. H.; KUO, F. C.; SUNG, H. Y. (2000). Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 48, n. 8, p. 3210-3216 2000.

CHANG, C.; WANG, P.; HUNG, Y.; CHUNGY, Y. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean, Food Chemistry, v. 133, p. 1611–1617, 2012.

CHO, I. H.; CHOI, E. S.; LIM, H. G.; LEE, H. H. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 37, n. 2, p. 199-205, 2004.

COLLEN, D.; LIJNEN, H. R. Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 2, p. 541-546, 2004.

COLLEN, D.; LIJNEN, H.R. New thrombolytic agents and strategies. Baillière's Clinical Haematology, v. 8, n. 2, p. 425-435, June, 1995.

CORREIA, R. T. P. (2004), Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

CRUZ FILHO, R. F.; PORTO, A. L.F.; TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, O. C. C. Produção de pigmentos por espécies de *Serratia* isoladas da Amazônia. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Curitiba-PR. Anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2007.

CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. Braz. J. Food Technol., v. 9, n. 3, p. 201-208, 2006.

- DAS, G.; PRASAD, M.P. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. International Research Journals of Microbiology, v. 1, n.2, p. 026-031, April, 2010.
- DELOISA, K.M., HERNANDEZ, M.R.T., PALOMARES, M.R. Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, v. 44, p. 435–439, 2009.
- ERIKSSON, M.; JOHNSON, O.; BOMAN, K.; HALLMANS, G.; HELLSTEN, G.; NILSSON, T.K.; SÖDERBERG, S. Improved fibrinolytic activity during exercise may be an effect of the adipocyte-derived hormones leptin and adiponectin. Thrombosis Research, v. 122, n. 5, p. 701-708, 2008.
- FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. Food and Bioprocess Technology., v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011
- FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Rev Bras Hematol Hemoter, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.
- FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G.; MACHADO, I. S.; TAMBOURGI, E. B. Purificação da enzima bromelina presente no Curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith) variedade roxa, por sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato de potássio. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v. 13, n. 2, p. 19 7-202, 2011.
- FERREIRA, J.F.; PADILHA, G.S.; TAMBOURGI, E.B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. Exacta, São Paulo-SP, 7(1), 49-56, 2009.
- FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina, Ribeirão Preto, v. 34, p.229-237, jul./dez., 2001.
- FRITZE, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and *Related Genera*: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. The American Phytopathological Society, v. 94, N. 11, p. 1245-1248, 2004.
- FUJITA, M.; NOMURA, K.; HONG, K.; ITO, Y.; ASADA, A.; NISHIMURO, S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 197, n. 3, p. 1340-1347, 1993.
- GENCKAL, H.; TARI, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats Enzyme and Microbial Technology, v.39, p. 703-710, 2006.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial Alkaline Protease: Molecular approaches and industrial application. Appl. Microbial. Biotechnol. v. 59, p. 15-32, 2002.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006, 1264p.

HAJJI, M., REBAI, A., GHARSALLAH, N., NASRI, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. Appl Microbiol Biotechnol, v.79, p. 915–923, 2008.

HAN, X.; GUO, R.; YU, H.; JIA, Y. Cloning and Expression of One Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. zlw-2. Agricultural Sciences in China, v. 8, n. 5, p. 591-596, may, 2009.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. Applied Microbiology, v. 21, n. 6, p. 1011-1016, 1971.

HUA, Y.; JIANG, B, MINE Y, MU W. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. J. Agric. Food Chem., v. 56, p. 1451-1457, 2008.

HWANG, K.; CHOI, K.; KIM, K.; PARK, C.; CHA, J. Purification and Characterization of a New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, Isolated from Korean Traditional Jeot-gal. J. Microbiol. Biotechnol., v. 9, p. 1469–1476, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry, v. 37, p. 139–144, 2001.

JOO, H.; CHANG, C. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 176-183, 2006.

JUNG, K.; SONG, T.; HAN, D.; KIM, I.; KIM, Y.; LEE, C. Cardiovascular Protective Properties of Kiwifruit Extracts in Vitro. Biol. Pharm. Bull., v. 28, n. 9, p.1782-1785, April, 2005.

KIM, K.; LIM, K.; KIM, C.; SHIN, H.; SEO, D.; LEE, S.; NOH, J.; BAE, O.; SHIN, S.; CHUNG, J. Black soybean extract can attenuate thrombosis through inhibition of collagen-induced platelet activation. Journal of Nutritional Biochemistry, in press, 2010.

KIM, S. H; CHOI, N. S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. Biosci. Biotechnol Biochem. v. 64, p. 1722–1725, 2000.

KIM, W.; CHOI, K.; KIM, Y.; PARK, H.; CHOI, J.; LEE, Y.; OH, H.; KWON, I.; LEE, S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n. 7, p. 2482-2488, 1996.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous two-phase system, Quim. Nova, v. 35, n. 10, p. 1912-1915, 2012.

KO, J.H.; YAN, J.P.; ZHU, L.; QI, Y.P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 137, p. 65-74, 2004.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L.; Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LEARY, D.; VIERROS, M.; HAMON, G.; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*, v. 33, p.183–194, 2009.

LEE, B.C.; BAE, J.T.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W. Submerged culture conditions for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 369-376, 2004.

LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122. 1973.

LIMA, L.M.; CARVALHO,M.G.; SABINO, A.P.; SOUSA, M.O. Lipoproteína (a) e inibição da fibrinólise na doença arterial coronariana. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, v. 28, n. 1, p. 53-59, 2006.

LOTTERMOSER, K.; WEISSER, B.; HERTFELDER, H.; WÖSTMANN, B.; VETTER, H.; DÜSING, R. Antihypertensive Drug Treatment and Fibrinolytic Function. *American Journal of Hypertension*, v. 11, n. 3, p. 378-384, 1998.

LU, F.; LU, Z.; BIE, X.; YAO, Z.; WANG, Y.; LU, Y.; GUO, Y. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Thrombosis Research*, v.126, p.349–e355, sept., 2010.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

MANDER, P.; CHO, S. S.; SIMKHADA, J. R.; CHOI, Y. H.; YOO, J. C. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. *Process Biochemistry*. v. 46, p. 1449–1455, 2011.

MARQUES, D. A. V. Produção e extração de ácido clavulônico de *Streptomyces* ssp. por fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas. 2010. 159f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MINE, Y.; WONG, A.H.K.; JIANG, B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Research International*, v. 38, p. 243-250, 2005.

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

MOURA, R. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Partição da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth (ConGf) em sistema de duas fases aquosas usando PEG/fosfato. In: X Jornada de ensino, pesquisa e extensão (JEPEX 2010), UFRPE: Recife. Anais do X Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2010.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochemistry*. v. 43, p. 1293–1299, 2008.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de Proteases Por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

OOI, C.W.; HII, S.L.; KAMAL, S.M.M.; ARIFF, A.; LING, T.C. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*, *Process Biochemistry*, v. 46, p. 68-73, 2011.

PALMA, M.B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Florianópolis, 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.8, p.81-84, 2003.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4226–4231, 2011.

PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Estudo do crescimento de *A. casiiellus* em farelo de soja convencional para produção de enzimas. *Estudos tecnológicos*, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.

PATEL, G. K.; KAWALE, A. A.; SHARMA, A. K. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 52, p. 104-111, 2012.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos Biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto Ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.*, v. 2, n.1, 2007.

PENG, Y.; HUANG, Q.; ZHANG, R. H.; ZHANG, Y. Z. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 134, n. 1, p. 45-52, 2003.

PENG, Y.; YANG, X.; XIAO, L.; ZHANG, Y. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. Research in Microbiology, v. 155, p. 167–173, 2004.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 69, p.126-132, 2005.

PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: Manole, 2005. 440 p.

PINHO, C. R. G. Modelamento matemático do processo de esterilização de alimentos condutivos em embalagem de vidro. 2003.123f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. Agociência, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PORTO, T. S.; MEDEIROS E SILVA, G. M.; PORTO, C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; NETO, B. B., LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR., A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. Chemical Engineering and Processing, v. 47, p. 716–721, 2008.

PUNITHA, V.; KANNAN, P.; SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAGHAVA-RA, J.; NAIR, B. U. Chemical degradation of melanin in enzyme based dehairing and fibre opening of buff calfskins. Clean Technol. Environ. Policy, v. 11, p.299-306, 2009.

QINGHUA, L.; XIAOWEI, Z.; WEI, Y.; CHENJI, L.; YIJUN, H.; PENGXIN, Q.; XINGWEN, S.; SONGNIAN, H.; GUANGMEI, Y. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: Identification of the toxins potentially involved in coagulopathy. Biochemical and Biophysical Research, Communications 341, p. 522-531, 2006.

RAAFAT, A. I.; ARABY, E.; LOTFY, S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 1369–1374, 2012.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr., A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous system containing PEO-PPO-PEO block copolymers. J. Chromatogr. B., v. 807, p. 61-68, 2004.

RAJMALWAR, S.; DABHOLKAR, P.S. Production of protease by *Aspergillus* sp. using solid-state fermentation. African Journal of Biotechnology, v. 8, n. 17, p. 4197-4198, September., 2009.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

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

RODARTE, M. P. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arábica* L.). 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, F. M. S. 2007. 132 f. Estudo da produção de pectinases por fermentação e estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.

SANTOS, J. G.; CRUZ FILHO, R. F. ; LIMA, L. A.; MONTENEGRO, P. C. C.; FERNANDES, O. C. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de Proteases Alcalinas por *Bacillus* sp Isolado do Solo Contendo Resíduos Industriais de Couro. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2009.

SANTOS, Januário Gama dos. Caracterização de proteases produzidas por bactérias da Amazônia com potencial fibrinolítico. 2009. 44f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. *Process Biochemistry*. v. 43, p. 905–911, 2008.

SAVAGE, B.; RUGGERI, Z.M. Thrombus Formation in Flowing Blood. In: Michelson, Alan D. Platelets. 2 Ed. San Diego. Copyright (Elsevier Science), p. 359-376, 2007.

SEO, J.; LEE, S. Production of Fibrinolytic Enzyme from Soybean Grits Fermented by *Bacillus firmus* NA-1. *Journal of medicinal food*, v. 7, n. 4, p.442- 449, 2004.

SHIVANAND, P.; JAYARAMAN, G. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1088–1094, 2009.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.318-324, 2002.

SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Quim. Nova, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.

SIMKHADA, J.R.; MANDER, P.; CHO, S.S.; YOO, J.C. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. Process Biochemistry, v. 45, p. 88–93, 2010.

SINGH, J.; VOHRA, R. M.; SAHOO, D. K. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus* sp using fed-batch culture. Process Biochem., v. 39, p.1093–1101, 2004.

SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Extractive fermentation for improved production of endoglucanase by an intergeneric fusant of *Trichoderma reesei*/*Saccharomyces cerevisiae* using aqueous two-phase system. Biochemical Engineering Journal. v. 6, p. 163–175, 2000.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F.; MORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental v. 14, n. 9, p. 987–992, 2010.

SUMI, H.; HAMADA, H.; TSUSHIMA, H.; MIHARA, H.; MURIKI, H. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia, v. 43, n. 10, p. 1110-1111, 1987.

SUN, M.; LIU, S.; GREENAWAY, F.T. Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii* ussuriensis snake venom: Insights into the effects of Ca²⁺ on function and structure. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1764, p.1340-1348, 2006.

SUNDARARAJAN, S.; KANNAN, C.N.; CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.111, n. 2, p. 128–133, 2011.

TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, p.286-290, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 25. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780p.

TREMACOLDI, Célia Regina. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Documentos 353, Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2009. 44p.

VEDMA, P.M.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; LÓPEZ, R.L.; VALDIVIA, V.; GÁLVEZ, A. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. Food Microbiology, v. 26, p. 289–293, 2009.

VISHWANATHA, K. S., RAO, A., SINGH, S. A. Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chemistry, v. 114, p. 402-407, 2009.

VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. Drug Discovery Today, v.15, n. ½, January, 2010.

WAGNER, D. D.; BURGER, P. C. Platelets in inflammation and thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., v. 23, p. 2131-2137, 2003.

WANG, F.; WANG, C.; LI, M.; ZHANG, J.; GUI, L.; AN, X.; CHANG, W. Crystal Structure of Earthworm Fibrinolytic Enzyme Component B: a Novel, Glycosylated Two-chained Trypsin. *J. Mol. Biol.*, v. 348, p. 671-685, 2005.

WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, *New Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 196-202, 2011.

WANG, Z.; DAI, Z. Extractive microbial fermentation in cloud point system. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 46, p. 407–418, 2010.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews*, v. 21, p. 131-142, 2007.

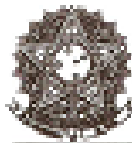
ZHANG, Y.; CUI, J.; ZHANG, R.; WANG, Y.; HONG, M. A novel fibrinolytic serine protease from the polychaete *Nereis* (*Neanthes*) *virens* (Sars): Purification and characterization. *Biochimie*, v. 89, p. 93e103, August, 2007.

ZU, X.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; CHE, H.; ZHANG, G.; LI, J. Thrombolytic Activities of Nattokinase Extracted from *Bacillus Subtilis* Fermented Soybean Curd Residues. *International Journal of Biology*, v. 2, n. 2; p. 120-125, 2010.

CAPÍTULO 1

Declaração de pedido de patente e Relatório descritivo

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO FIBRINOLÍTICO, FERMENTAÇÃO
SUBMERSA UTILIZANDO TAPIOCA E ARARUTA, FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA
USANDO FEIJÃO MANTIGUINHA *Vigna unguiculata* (L.) Walp.



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o pesquisador /Técnico Administrativo e Aluno do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (Doutorado) **Raimundo Felipe da Cruz Filho** da Universidade Federal do Amazonas, deu entrada nesta Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica-PROTEC, o pedido de patente, datado de 01/02/2013, para apreciação, análise e futura elaboração de relatório descritivo, para cumprimento do pedido de Patente, a pesquisa tem como título inicial: "PROCESSO DE PRODUÇÃO, FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE EXTRATO FIBRINOLÍTICO".

Manaus, 01 de Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Pró-Reitoria de Inovação Tecnológica - PROTEC
Rua Coronel Manuel Mendes, 101 - 69000-000
Manaus - AM - Brasil

RELATÓRIO DESCRITIVO

EXTRATO BRUTO COM PROTEASE FIBRINOLÍTICA PRODUZIDO POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA DA TAPIOCA E ARARUTA. FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA DO FEIJÃO MANTEIGUINHA ASSOCIADA A PRODUÇÃO DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA

Campo da Invenção

Esta invenção relata a produção de uma protease fibrinolítica de origem bacteriana com ação medicinal que apresenta atividade fibrinolítica. O extrato fibrinolítico foi produzido por fermentação semi-sólida utilizado como substrato grão de feijão manteiguinha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], desidratado e triturado para a síntese de enzima fibrinolítica por *Bacillus stearothermophilus*. A enzima fibrinolítica também foi sintetizada em meio líquido (fermentação submersa) utilizando de forma pioneira féculas produzidas na Amazônia (tapioca, araruta e crueira), como fonte natural de carbono. Esta espécie de bactéria não patogênica está preservada na Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia.

Antecedentes da invenção

A tecnologia da fermentação e a produção de enzimas fibrinolíticas

Fermentação semi-sólida (FSS), um processo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre, usando como substrato um suporte inerte. Esta tecnologia envolve um sistema de matriz sólida, uma fase líquida e uma fase gasosa. O teor de umidade no substrato pode variar entre 12% a 80%. Quando esse valor encontra-se abaixo do limite mínimo a atividade metabólica dos micro-organismos é prejudicada. Já o limite superior da umidade é fixado em função da capacidade de absorção de líquidos pelo substrato (CORREIA, 2004; SANTOS, 2007).

O crescimento de micro-organismos por FSS ocorre na superfície do substrato ou em seu interior, no caso de partículas porosas, o conteúdo líquido presente em sua matriz fermentativa deve ser mantido de modo a assegurar a atividade metabólica microbiana, sem exceder a capacidade da matriz de reter líquido (PALMA, 2003; CORREIA, 2004; SANTOS, 2007).

Os substratos utilizados na fermentação semi-sólida na sua grande maioria são resíduos ou subprodutos da agroindústria (celuloses, hemiceluloses, ligninas, amidos, pectinas e proteínas), caracterizados como compostos heterogêneos, atuando como fonte de carbono e

energia e também de suporte para crescimento microbiano (PANDEY, 2003; SOUZA et al., 2010).

A técnica de FSS está sendo preferida em relação aos outros bioprocessos por permitir a produção de enzimas em maior concentração e com baixo custo (SILVA et al., 2002; SOUZA et al., 2010). No entanto apresentam certas limitações, como a dificuldade de remoção do calor produzido pela atividade metabólica do micro-organismo (PALMA, 2003; SANTOS, 2007).

O processo fermentativo semi-sólido contribui para redução de contaminantes ambientais devido ao uso de substratos lignocelulosicos a exemplo da produção de ácidos orgânicos, de fitase, de ração animal e compostos biativos (PINTO et al., 2005; ALEXANDRINO et al., 2007; SUHET; FIOREZE, 2011; PEDROSO et al., 2011).

Para a produção desses compostos entre outros micro-organismos, as bactérias também são utilizadas no processo de fermentação semi-sólida, como o *Bacillus subtilis* empregado na produção de protease fibrinolítica em resíduos derivados de soja ou milho, além dos tradicionais alimentos fermentados (Natto) consumidos no Japão, China e Coreia (SUMI, et al., 1987; FUJITA, et al., 1993; KIM et al., 1996;. CHANG, et al., 2000;. PENG, et al., 2003; ZU et al., 2010).

Outro processo bastante utilizado na produção de biocompostos é a fermentação submersa (FSm), que representa mais de 95% dos processos biotecnológicos. Uma das maiores vantagens desse processo está na facilidade de manuseio das vazões líquidas de alimentação e saída do fermentador, permitindo diferentes manipulações dos processos em batelada, contínuo ou retro alimentado, esses dois últimos procedimentos permitem aumentar a produtividade e a eficiência de determinados processos com relação aos processos em batelada (FERNÁNDEZ, 2009).

Esta tecnologia é a mais empregada para a produção de enzimas devido à facilidade dos micro-organismos crescerem em condições controladas (pH, aeração e temperatura) (ELLIAH et al., 2004; MAHADIK et al., 2004; FEITOSA, 2009).

Segundo Roveda (2007), os meios que são utilizados nesses cultivos em meio líquido devem conter fontes de carbono (farinhas ricas em amido, licores de milho, soja, melaços e outros cereais), fontes de nitrogênio (farinha de peixe, gelatinas, licor de milho e licor de soja), substâncias minerais e fatores de crescimento (extrato de levedura, licor de milho e farinhas de sementes oleaginosas). No caso de produção de enzimas indutíveis, é necessária a presença de um indutor correspondente (exemplos: amido para amilase, uréia para uréase,

xilose para xilose isomerase). A escolha de um meio de cultivo é também, na maioria das vezes, um processo progressivo de aprimoramento.

Pesquisas atuais revelam que via fermentação submersa há produção de uma grande diversidade de compostos bioativos, como antimicrobianas, pigmentos e enzimas entre outros, visando potenciais aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e médica (MALAJOVICH, 2012). Diferentes micro-organismos são utilizados nesses bioprocessos para produção de proteases fibrinolítica dentre eles os gêneros *Streptomyces* e *Lentinus*, (KIRSCH et al., 2012; CLEMENTINO et al., 2012)

Proteases fibrinolíticas

Enzimas fibrinolíticas são proteases capazes de degradar diferentes tipos e coágulos sanguíneos, pois apresentam alta especificidade pela plasmina, haja vista, esta desempenhar importante papel na coagulação sanguínea (FRANCO, 2001; LIMA et al., 2006).

O sistema fibrinolítico ou sistema plasminogênio/plasmina está constituído por diversas proteínas, que regulam a fisiologia da coagulação do sangue. A regulação da coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas, proteases do plasma, denominada "cascata de coagulação" que explica a quebra da molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Esse processo divide a coagulação em duas fases, uma via extrínseca (elementos intravascular associados a elementos extravascular) e uma via intrínseca (exclusivo de elementos do espaço intravascular), que convergem para uma via comum, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (FRANCO, 2001; CARLOS; FREITAS, 2007; FERREIRA et al., 2010;).

As proteases fibrinolíticas foram descobertas a partir de estudos realizados com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus hemolyticus*, bactérias produtoras de estafiloquinase e estreptoquinase respectivamente, ambas são fármacos utilizados na terapia anti-trombolítica (COLLEN; LIJNEN, 1995; SANTOS, 2009).

Atualmente estas enzimas fibrinolíticas são produzidas por diferentes organismos, dentre os quais se destacam as bactérias, fungos, algas, minhocas e cobra (LEE et al., 2004; QINGHUA et al., 2006; SUN et al., 2006; SANTOS, 2009; LU et al., 2010; SIMKHADA et al., 2010).

Dos organismos fontes de enzimas, as bactérias são excelentes fontes desses biocatalizadores fibrinolíticos (Tabela 1), o táxa mais estudado, o gênero *Bacillus*, está representado por *Bacillus nattu*, *Bacillus firmus* NA-1, *Bacillus* sp. KDO 13, *Bacillus subtilis*

QK02, *Bacillus subtilis*1MR-NK1, todos produtores de enzima nattokinase (KO et al., 2004; PENG et al., 2004; HAN et al., 2009; WANG et al., 2010).

Tabela 01: Micro-organismos com aplicação proteolítica e fibrinolíticos produzidos em diferentes substratos e micro-organismos.

Micro-organismo	Substrato	Aplicação	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> TP-6	Soja	Fibrinolítica	Kim et al., 2006
<i>Fomitella fraxinea</i>	Meio complexo	Fibrinolítica	Lee et al., 2006
<i>Bacillus sp.</i> 2-5 strain	Meio complexo	Proteolítica	Falahatpishe et al., 2007
<i>Bacillus licheniformis</i> kj-31	Jeot-gal	Fibrinolítica	Hwang et al., 2007
<i>Bacillus sp.</i> termofílico	Meio complexo	Fibrinolítica	Nascimento et al., 2007
<i>Flammulina velutisp</i>	Meio complexo	Fibrinolítica	Park et al., 2007
<i>Clostridium perfringens</i>	Meio complexo	Proteolítica	Porto et al., 2007
<i>Bacillus sp.</i> nov. SK006	Shrimp Paste	Fibrinolítica	Hua et al., 2008
<i>Bacillus licheniformis</i> N-2	Soja; Meio complexo	Proteolítica	Nadeem et al., 2008
<i>Bacillus subtilis</i> s1	Soja	Proteolítica	Shaheen et al., 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	Girasol	Proteolítica	Castro; Pinto 2009
<i>Bacillus sp</i>	Resíduo de couro	Proteolítica	Santos et al., 2009
<i>Pseudomonas sp.</i> TKU015	Katsuobushi; shrimp shell powder	Fibrinolítica	Wang et al., 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> IV	Canola	Proteolítica	Freitas et al., 2010
<i>Bacillus sp</i>	Meio complexo	Proteolítica	Gupta et al., 2010
<i>Streptomyces violaceoruber</i> ; <i>Streptomyces spiroverticillatus</i>	Meio complexo	Fibrinolítica	Habib et al., 2010
Leveduras	Meio complexo	Fibrinolítica	Couto et al., 2011
<i>Aspergillus sp.</i> ; <i>Fusarium sp.</i> <i>Penicillium sp.</i> ; <i>Trichoderma sp</i>	Meio complexo	Fibrinolítica	Fernandes et al., 2011
<i>Bacillus polymaxa</i> NRC-A	Meio complexo	Fibrinolítica	Mahmoud et al., 2011
<i>Bacillus subtilis</i>	Soja	Fibrinolítica	Chang et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i> ICTF-1	Meio complexo	Fibrinolítica	Mahajan et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	Meio complexo	Fibrinolítica	Raafat et al., 2012

As proteases fibrinolíticas são de grande importância na medicina, principalmente, nas intervenções em doenças cardiovasculares, na indústria de alimentos como complemento alimentar, cosméticos e nos mais variados processos biotecnológicos (PENG et al., 2005; JUNG et al., 2005; ERIKSSON et al., 2008; LU et al., 2010; KIM et al., 2010;). Somada a essas ações, com base nos mecanismos catalíticos das enzimas microbianas, as fibrinolíticas são classificadas em três tipos: serino-protease (*Bacillus natto*) metaloprotease (*Armillaria mellea*), e a mistura de ambas serina e metaloprotease (*Streptomyces sp.* Y405) (CHANG et al., 2005; HUA et al., 2008; SIMKHADA et al., 2010).

O uso de enzimas na produção de medicamentos e a utilização destas como agentes terapêuticos possuem uma significativa fatia do mercado farmacêutico a nível global, com excelentes probabilidades de expansão, haja vista, o surgimento de novas informações referentes aos caminhos que esses biocatalisadores percorrem para executar seus efeitos terapêuticos nos processos clínicos aos quais são empregados (SEO; LEE, 2004; VLIEGHE et al., 2010).

1 De acordo com um relatório pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 17 milhões
2 de pessoas morrem de doenças cardiovasculares a cada ano. Em função desta estatística da
3 OMS estima-se que as vendas globais de mercado potencial de trombolíticos possuirão um
4 montante de US \$ 14 bilhões até 2010 (WANG et al., 2009).
5

DETALHES DA INVENÇÃO

1 Micro-organismos e manutenção das culturas

Nesta pesquisa foi avaliado *Bacillus stearothermophilus* como fonte de enzimas fibrinolíticas, do acervo da Coleção Bactérias da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, preservado a 4 °C, em tubo de ensaio contendo ágar nutritivo inclinado. Para obtenção da cultura estoque os subcultivos foram realizados segundo a metodologia descrita por Santos (2009).

2 Produção de Protease fibrinolítica por *Bacillus stearothermophilus*

2.1. Fermentação Submersa (FSm)

2.1.1 Perfil de crescimento *Bacillus stearothermophilus*

Para a produção de protease em meio líquido adicionado de substratos naturais (tapioca, crueira e araruta), o *Bacillus stearothermophilus* foi cultivado em 100 mL do meio líquido [(g/L) KH_2PO_4 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL] pH 7,2 (SILVA NEVES et al., 2006; MACIEL et al., 2010). O meio padrão da fermentação foi suplementado com gelatina 0,5%, em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. O crescimento da bactéria foi determinado a 610 nm, de 2 em 2 horas, durante 36 horas (CRUZ FILHO et al., 2007). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 μm), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica, conforme descrito a seguir. Todos os experimentos foram realizados em triplicata

2.1.2 Produção de protease fibrinolítica utilizando tapioca, crueira e araruta como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio

Para determinação da atividade de protease fibrinolítica por FSm foram utilizadas como fonte de carbono os seguintes substratos naturais, tapioca, crueira e araruta 1,0% (p/v). E as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas foram peptona, extrato de levedura e caseína 1,0% (p/v). A fermentação foi realizada em 100 mL de meio, em frescos de Erlenmeyer de 250 mL (BOOMINADHAN et al., 2009). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (TEIXEIRA et al., 2000).

2.1.2.1 Determinação da influência das concentrações de fonte de carbono e nitrogênio na produção da protease

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de fonte de carbono selecionado no item 2.1.2 para produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, no meio de fermentação (item 2.1) foi adicionado as seguintes concentrações 0,25%; 0,50 e 1,0% (p/v). A suplementação do meio de fermentação com a fonte de nitrogênio selecionada no item 3.3.4 foi utilizada a 0,05%; 0,1% e 0,15% (p/v). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (PARIS et al., 2010).

Todos os cultivos foram realizados em 100 mL de meio em frescos de Erlenmeyer de 250 mL. Nestes experimentos foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 , com 4 repetições no ponto central para avaliar os parâmetros, concentração das fontes de carbono e nitrogênio (Tabela 2). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 μ m), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica de acordo com o citado no item 2.2

Tabela 2 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações das fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Fontes C (%)	0,25	0,50	1,0
Fontes N (g)	0,5	1,0	1,5

2.2 Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica no extrato bruto foi utilizado 0,25 mL do substrato [azocaseína 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6] e 0,15 mL do extrato enzimático. O sistema foi incubado por 1 hora a 25 °C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (m/v). As amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 0,8 mL foram transferidas para tubos de ensaios contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. O sistema de reação incluindo o branco foi preparado em triplicata e a leitura feita a 440 nm Leighton et al. (1973). Uma unidade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 440 nm igual a 0,1 em 60 minutos expressa em U.mL⁻¹ (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

2.3 Determinação da Atividade Fibrinolítica

2.3.1 Teste de degradação in vitro do coágulo em placa de fibrina

A atividade da enzima fibrinolítica de do extrato purificado de *Bacillus stearothermophilus* foi determinada pelo método de placa de fibrina. A placa de Petri (9 cm

de diâmetro contendo 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL de fibrinogénio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/mL), após a solidificação da mesma foi mantida em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida furos de 3 mm de diâmetro foram perfurados no gel para aplicação de 20 µL do extrato bruto da enzima fibrinolítica, em seguida incubadas a 37 °C durante 18 horas (SEO; LEE, 2004; YEO et al., 2011).

2.3.2 Teste de degradação in vitro do coágulo sanguíneo em tubo: Método degradação do coágulo artificial

A atividade enzimática em tubo foi verificada frente a um coágulo sanguíneo artificial *in vitro*. Um coágulo artificial de sangue foi formado pela coagulação espontânea, em um tubo de ensaio usando sangue de *Rattusno vergicus* Wister (Biotério Central-UFAM, protocolo CEUA: 111/2012). A ação fibrinolítica foi verificada pela degradação total do coágulo artificial após 24 h. O coágulo de sangue artificial foi mergulhada em 2 ml de do extrato fibrinolítico. Como controle negativo, foi utilizada solução salina (HWANG et al., 2007).

3 Fermentação Semi-Sólida (FSS)

3.1 Tratamento do substrato feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. manteiguinha]

Neste bioprocesso foi utilizando 10 g de feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] como substrato. Os grãos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. foram triturados em triturador Walita HR 2943/00. Para esterilização do substrato a 120 °C por 30 min, as amostras foram acondicionados em Erlenmeyers de 250 mL.

3.2 Inoculação de *Bacillus stearothermophilus* no substrato

Após resfriamento do substrato triturado e esterilizado, a umidade foi corrigida para 60%, adicionando-se solução tampão (pH 5,0). Em seguida foi inoculado 1000 µL de suspensão celular de *Bacillus stearothermophilus* com turbidez semelhante a escala um de McFarland 1. A fermentação foi conduzida a 25 °C por 24 h.

3.3 Extração das enzimas proteolíticas fibrinolíticas

Ao término da fermentação, o substrato foi hidratado na proporção 1/10 (p/v), logo após centrifugado, e em seguida o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22 µm. A determinação da atividade proteolítica foi realizada como citado no item 2.2.

3.4. Determinação da atividade proteolítica e fibrinolítica

A atividade das enzimas no extrato aquoso recuperado foi determinada como descrito nos itens 2.2. E o teste da degradação *in vitro* do coágulo sanguíneo foi feito de acordo com o item 2.3.

4 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina*

4.1 Eclosão dos cistos

Para eclosão dos cistos de *A. salina* utilizou-se solução de sal marinho 3% (p/v), pH 6,5 esterilizada a 121 °C por 15 minutos. O quantitativo de 0,1 g de cistos do microcrustáceo foi adicionado nessa solução e incubado durante 30 horas, a 30 °C, sob luminosidade (40watts), agitação constante (140 rpm), conforme o método de Harwig e Scott (1971) modificado por Atayde et al. (2011).

4.2 Teste de toxicidade

Após eclosão dos cistos, 100 µL da solução contendo náuplios foi transferido para poços individuais de placas multipoços (6x4), seguindo-se a inoculação do extrato enzimático em diferentes concentrações (1000mg/mL a 100mg/L) completando-se o volume final de cada poço para 1 mL com solução salina sem larvas. Após 16 horas de contato com o extrato enzimático e com o branco foi determinada a taxa de mortalidade (grau de toxicidade %) segundo a classificação de Harwig e Scott (1971): 0–9 %= não tóxico (NT); 10 – 49% = ligeiramente tóxico (LT); 50–89% = tóxico (T); 90–100% = altamente tóxico (AT).

5 Determinação da composição centesimal do feijão manteiginha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

A umidade foi determinada em estufa a 105 °C, conforme o procedimento descrito nas Normas Analíticas do IAL (2008). As cinzas foram determinadas por meio da calcinação das amostras em mufla a 550 °C. A determinação de proteínas foi realizada segundo o método de Kjeldahl, que consiste na quantificação do nitrogênio total, e o conteúdo proteico foi calculado por multiplicação pelo fator 6,25. A determinação de lipídios foi realizada por

extração em Soxhlet. Já a determinação de carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraída de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas (AOAC, 2001; RAMÍREZ-CÁRDENAS et al., 2008).

6 Análise estatística

Para identificar diferenças significativas entre as variáveis foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software MINITAB 16.

Resultados de Discussão

1 Perfil de crescimento *Bacillus stearothermophilus*

A figura 1 mostra o perfil de crescimento do tipo diáuxico de *Bacillus stearothermophilus*, com a primeira fase exponencial até as 14 horas, um declínio, outra fase exponencial, uma fase estacionária curta seguida de outra fase exponencial até as 24h. Segundo Narang (2006) e Gómez-Marín et al. (2009) diáuxia é quando o micro-organismo cresce na presença de duas fontes de carbono distintas. Para Pungartnik et al. (2002) o crescimento do tipo diáuxico é benéfico a célula microbiana, pois confere a mesma resistência aos compostos gerados pelo “stress” oxidativo da fermentação.

No que se refere à produção de protease versus o crescimento bacteriano verificou-se que a máxima atividade proteolítica (9,43 U/mL) foi determinada no final da primeira fase exponencial, ou seja, quando pode ter exaurido a principal fonte de carbono. Estes dados corroboram com os estudos realizados por Nascimento e Martins (2006) e Nascimento et al. (2007) que constataram a máxima produção de protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico que ocorreu no final da fase exponencial utilizando soro de leite em pó e água de maceração de milho como fonte de carbono. Resultados similares também foram obtidos por Ladeira et al. (2010) quando utilizou pectina de maçã, proteínas de soro de queijo e água de maceração de milho na produção de protease de *Bacillus* sp. AK1.

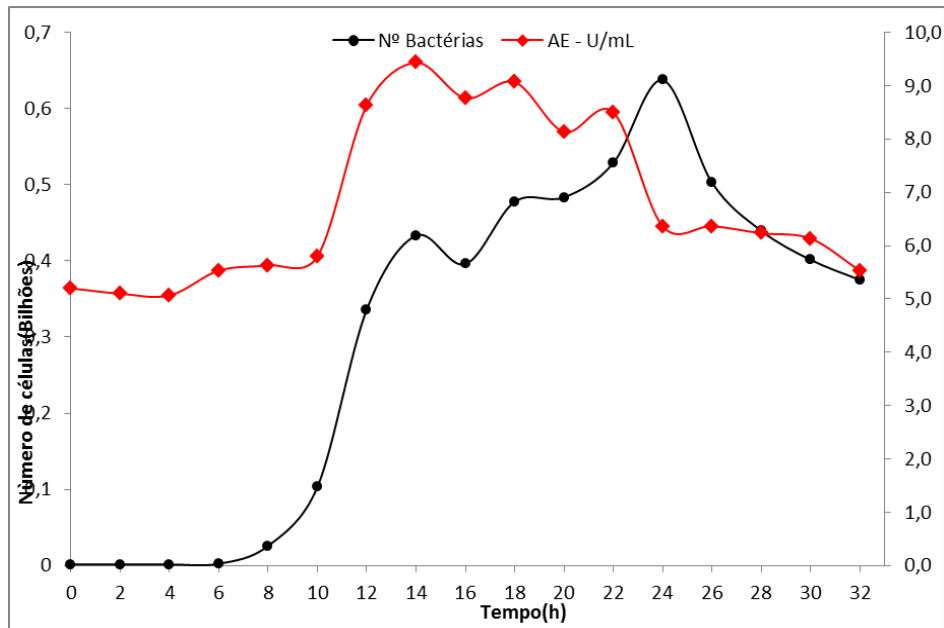


Figura 1: Perfil de crescimento de *Bacillus stearothermophilus* em relação a produção de protease.

2 Produção de protease fibrinolítica utilizando tapioca, crueira e araruta como fonte de carbono e extrato de levedura, caseína e peptona como fontes de nitrogênio por FSm

Nos experimentos realizados para selecionar uma fonte de carbono e de nitrogênio há diferença significativa entre os valores de atividade proteolítica obtida no extrato bruto recuperado da fermentação realizada com tapioca e araruta (fonte de carbono) e extrato de levedura e peptona (fonte de levedura) em comparação a crueira e peptona (Tabela 3). Estes resultados corroboram com os obtidos por Bhunia et al. (2010) nos estudos realizados com *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, ao utilizarem diferentes fontes de carbono (amido, manitol, glicerina, maltose, lactose, sacarose, glicose, manose e frutose) e nitrogênio (farelo de soja, ácido casamínico, peptona, gelatina, triptona, uréia, extracto de levedura, nitrato de sódio, nitrato de amônio, cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de potássio).

Patel et al. (2005) e Chaud et al. (2007) afirmam que a produção de protease por *Bacillus* sp. depende da disponibilidade de carbono e nitrogênio no meio de cultura. Todavia, o crescimento e a produção de protease foram inibidos por altas concentrações de fonte de carbono.

Tabela 3: Influência das fontes de carbono e fonte de nitrogênio na produção da protease.

Fonte (C)*	N	Média(U/mL)	Fonte (N)**	Média (U/mL)
Tapioca	3	42,489a	Caseína	37,222a
Araruta	3	40,311a	Ex. Levedura	36,489a
Cruera	3	3,133b	Peptona	29,400b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (teste de Tukey, 5%).
(C)* Fonte de carbono; (N)** Fonte de nitrogênio

Na figura 2 os resultados do desenho experimental 2^2 mostram efeitos da concentração de tapioca e extrato de levedura na atividade proteolítica. A interação desses fatores é significativo, mas, os efeitos foram negativos. Este resultado comprovou que para a obtenção de altas atividades de protease o quantitativo desses substratos deve ser adicionado em menores concentrações.

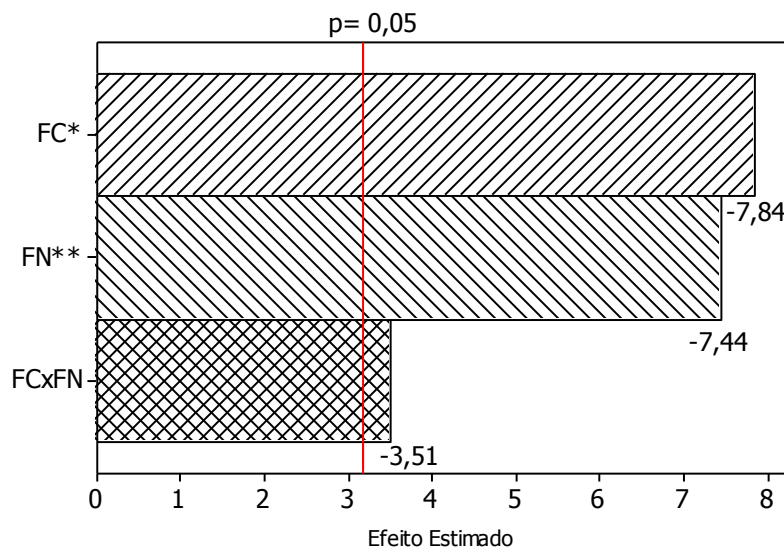


Figura 2: Efeito das variáveis independentes estudadas e de suas interações: Fonte de Carbono (FC*); Fonte de Nitrogênio (FN**) na produção de protease por do *Bacillus stearothermophilus*, para um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3 Degradação *in vitro* do coágulo em placa de fibrina

No teste pelo método da placa de fibrina que foi utilizado para verificar a atividade fibrinolítica, no extrato bruto obtido por fermentação submersa contendo tapioca foi observado halo translúcido medindo 34 mm (figura 3). Resultados semelhantes foi verificado por Mahajan et al. (2012), Agrebi et al. (2009) e Han et al. (2009), por FSm sem no entanto especificarem as dimensões dos valores dos halos.

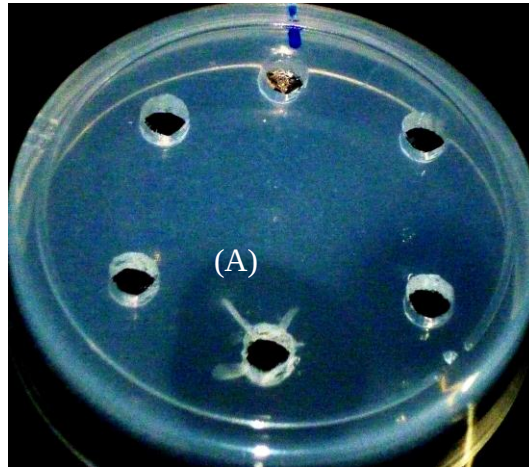


Figura 3: Resultado referente à placa de fibrina demonstrando atividade enzimática em 24h. (A) fermentação submersa utilizando tapioca como fonte de carbono.

4 Teste de degradação do coágulo sanguíneo em tubo

No teste de degradação do coágulo artificial utilizando sangue de rato Wister (*Rattusno vergicus* Wister) (Figura 4) foi constatado a ação fibrinolítica do extrato bruto enzimático da FSm na degradação de um coágulo sanguíneo. Nesse teste, a degradação do coágulo ocorreu de forma parcial, ou seja, após 24 horas não foi detectada a desintegração do coágulo, apenas a diferença na coloração do controle negativo [solução salina (9% p/v)] ao longo do tempo. Provavelmente este resultado pode está associado a redução do quantitativo de protease fibrinolítica excretada pela bactéria ou por repressão cartabólica devido a ação do produto final. No trabalho realizado por Hwang et al. (2007) foi verificado a degradação de coágulo em tubo em 60 minutos nos teste utilizando protease fibrinolítica de *Bacillus licheniformis* KJ-31 produzido por FSm.

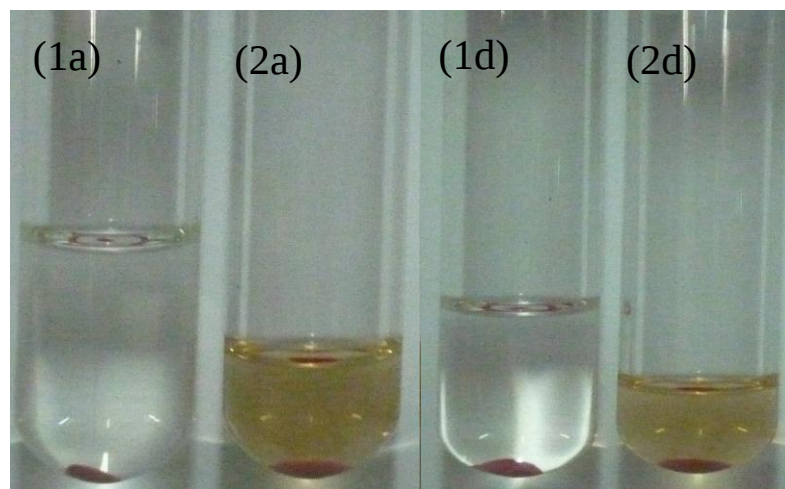


Figura 4: Resultado referente à atividade enzimática in vitro do coágulo sanguíneo em tubo em 24h. (1) Tubo controle contendo salina (0.9% p/v) (2) fermentação submersa utilizando tapioca como fonte de carbono, (a) antes, (d) depois.

5 Atividade proteolítica e fibrinolítica do extrato bruto por FSS

A atividade proteolítica do extrato bruto produzida por fermentação semi-sólida foi em média de $8,87 \pm 0,2$ U/mL. Na placa de fibrina a atividade deste extrato correspondeu a um halo translucido de 23 mm (Figura 5).

Chang et al. (2012) analisando o fermentado de *Bacillus subtilis* utilizando como substrato soja vermelha [*Phaseolus radiatus* L. var. Aurea] verificou halo de 16,5 mm e 20 mm em placas de fibrina.

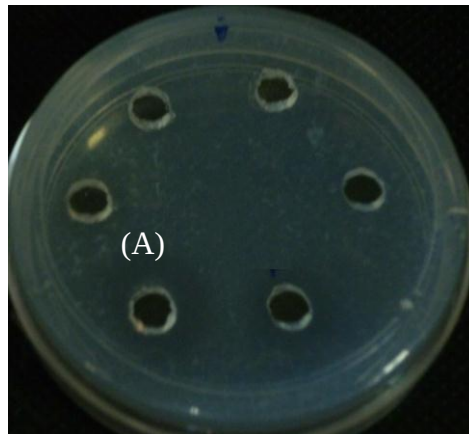


Figura 5: Resultado referente à placa de fibrina demonstrando atividade enzimática em 24h. (A) fermentação semi-sólida com feijão manteiguinha e (B) fermentação submersa utilizando tapioca como fonte de carbono

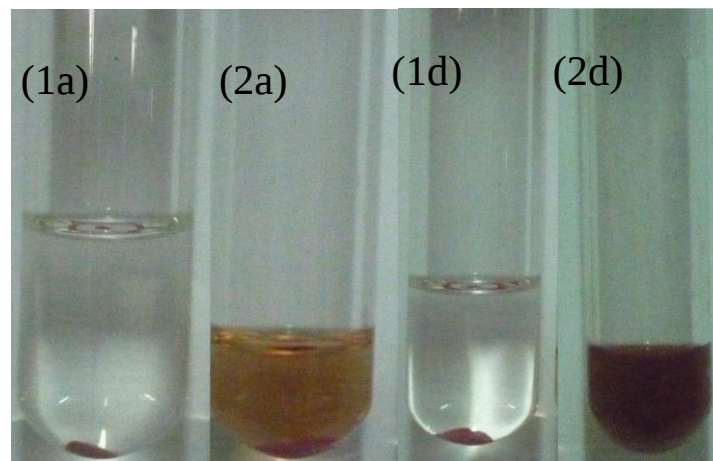


Figura 6: Resultado referente à atividade enzimática in vitro do coágulo sanguíneo em tubo em 24h. (1) Tubo controle contendo salina (0.9% p/v) (2) fermentação semi-sólida com feijão manteiguinha. (a) antes, (d) depois.

Quando examinado a atividade fibrinolítica no coágulo artificial usando sangue de rato Wister (*Rattusno vergicus* Wister), após 24 horas foi visualizada a dissolução total do coágulo teste.

6 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina*

Quando analisados os extratos brutos produzidos por *Bacillus stearotherophilus* os

resultados revelaram a inexistência de toxicidade frente a *Artemias salina*.

7 Determinação da composição centesimal do feijão manteiguinha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. manteiguinha]

O teor de proteínas do feijão Manteiguinha (15,85%) apresentados nesta pesquisa é inferior aos resultados citados por Maia et al. (2000) 19,5 a 25% e Salgado et al. (2005) 25,71%, de diversos cultivares de feijão caupi. As diferenças quantitativas do conteúdo proteico das sementes segundo Castellón et al. (2003), está relacionado ao melhoramento genético realizado nesses cultivares. O quantitativo de lipídico obtido neste trabalho (4,79%) foi superior aos encontrado por Salgado et al. (2005) e Frota et al. (2008) que verificaram 2,2% e 0,8 a 2,23% respectivamente, dados que estão dentro da faixa de leguminosas (COSTA et al. 2006; IQBAL et al., 2006).

As fibras do feijão Manteiguinha (1,83%) são equivalentes as outras variedades estudada por Salgado et al. (2005) e Costa et al. (2006), 1,61 a 2,42%, ou seja dentro da faixa de leguminosas. Tratando-se de cinzas os valores foram 2,94% dentro da faixa descrita por Castellón et al. (2003), Salgado et al. (2005) e Frota et al. (2008), 2,30 a 3,56%. Sendo que Frota et al. (2008) cita que estas variações são decorrentes das diferenças das condições de cultivo de cada plantação.

Quanto ao perfil dos carboidratos do feijão manteiguinha (65,80%) o valor está em concordância com os resultados da literatura (51,4 a 74,5%) (CASTLLÓN et al., 2003; SALGADO et al., 2005; FROTA et al., 2008).

Tabela 4: Composição centesimal de grãos de feijão manteiguinha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

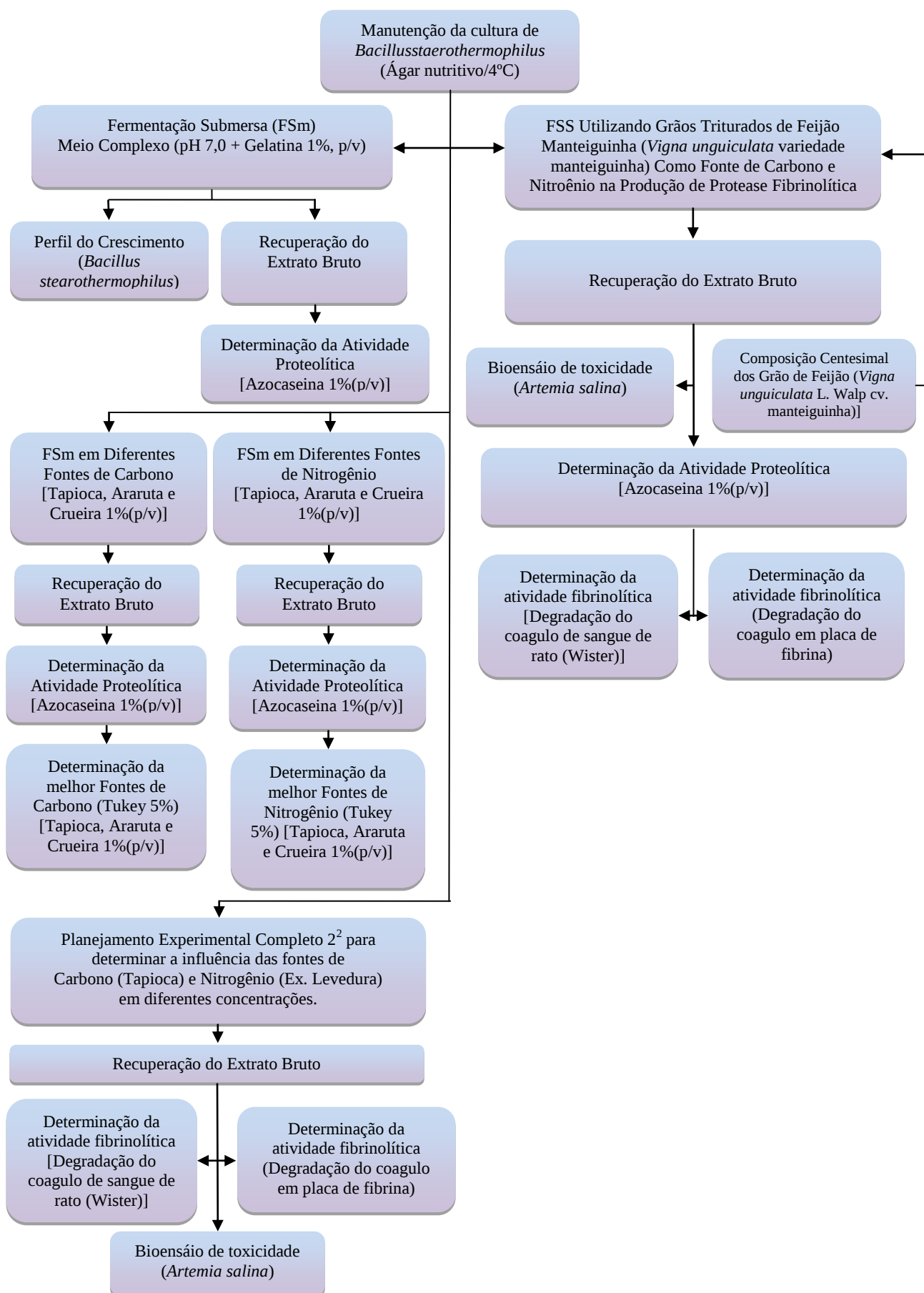
Componentes	Feijão Manteiguinha
Umidade	8,81±0,01
Cinzas	2,94±0,04
Lipídios	4,79±0,32
Proteína	15,83±0,06
Fibra	1,83±0,32
Carboidrato	65,80±0,01

Valores expressos em média ± desvio padrão.

Em conclusão, nas condições de fermentação *Bacillus stearothermophilus* sintetiza e excreta proteases fibrinolíticas que eficientemente degrada coágulo sanguíneo, condição que proporciona sua utilização na bioindústria, seja esta um fármacos ou complemento alimentar.

- 1 O bioprocessos mais eficientes foi a fermentação semi-sólida quando se utilizou o feijão
- 2 manteiguinha [*Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. manteiguinha].
- 3

Fluxograma do processo de produção, caracterização e fermentação



Referências Bibliográficas

- AGREBI, R.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; JELLOULI, K.; MANNI, L.; NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1252–1259, 2009.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemistry. 12 ed. Washington, DC, 2001.
- ATAYDE, H. M.; CARNEIRO, A. L. B.; MARTINS, M. S.; PALHETA, R. A. Bioensaio de toxicidade com espécie de *Artemia*. In: Teixeira, Maria Francisca Simas et al. (Org). *Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada. (Aplicações Biotecnológicas)*. Manaus. Edua, 2011. Cap. 11, p. 190-207.
- BHUNIA, B.; DUTTA, D.; CHAUDHURI, S. Selection of suitable carbon, nitrogen and sulphate source for the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. *Not. Sci. Biol.*, v. 2, n. 2, p. 56-59, 2010.
- BOOMINADHAN, U.; RAJAKUMAR, R.; SIVAKUMAAR, P. K. V.; JOE, M. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. *Botany Research International*, v. 2, n. 2, p. 83-87, 2009.
- CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. *Acta Veterinária Brasília*, v.1, n.2, p.49-55, 2007.
- CASTELLÓN, R. E. R. et al. Composição elementar e caracterização das frações lipídicas de seis cultivares de caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 7, n. 1, p. 149-153, 2003.
- CASTRO, R. J. S.; PINTO, G. A. S. Estudo Comparativo da Produção de Proteases por *Aspergillus oryzae* em Fermentação Semi-sólida Utilizando Tortas de Girassol. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Natal-RN. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)*, 2009.
- CHANG, A.K.; KIM, H.Y.; PARK, J.E.; ACHARYA, P.; PARK, I.S.; YOON, S.M. *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 6909-6916, 2005.
- CHANG, C. T.; FAN, M. H.; KUO, F. C.; SUNG, H. Y. (2000). Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, n. 8, p. 3210-3216 2000.
- CHANG, C.; WANG, P.; HUNG, Y.; CHUNGY, Y. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean, *Food Chemistry*, v. 133, p. 1611–1617, 2012.

- 1 CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e
2 aplicações de proteases. *Nucleus*, v.4. n.1-2 , p.87-97, 2007.
- 3 CLEMENTINO, E. L.; SILVA, J. M.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L.
4 F.; PORTO, C. S. Produção de protease fibrinolítica por *Streptomyces* sp.DPUA 1573 In: XXI
5 Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM). Santos-SP. Anais do XXI
6 Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012.
- 7 COLLEN, D.; LIJNEN, H.R. New thrombolytic agents and strategies. *Baillière's Clinical*
8 *Haematology*, v. 8, n. 2, p. 425-435, June, 1995.
- 9 CORREIA, R. T. P. (2004), Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por
10 *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal
11 do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.
- 12 COSTA, G. E. A.; QUEIROZ-MONICI, K. S.; REIS, S.M. P.M.; OLIVEIRA, A. C.
13 Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea,
14 common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, v. 94, p. 327–330, 2006
- 15 COUTO, V. R. F.; SOUZA, K. P. S.; NASCIMENTO, T. P.; HERCULANO, P. N.; SILVA,
16 A. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Produção de proteases com atividade
17 fibrinolítica por leveduras isoladas de pólen da região amazônica. In: XVIII Simpósio
18 Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Caxias do Saul- RS. Anais do XVIII Simpósio
19 Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2011.
- 20 CRUZ FILHO, R. F.; PORTO, A. L.F.; TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, O. C. C.
21 Produção de pigmentos por espécies de *Serratia* isoladas da Amazônia. In: XVI Simpósio
22 Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), Curitiba-PR. Anais do XVI Simpósio Nacional de
23 Bioprocessos (SINAFERM), 2007.
- 24 ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; A. THAER TALEB, K.
25 ADINARAYANA. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process*
26 *Biochemistry*, v.39, p. 525–528, 2004.
- 27 ERIKSSON, M.; JOHNSON, O.; BOMAN, K.; HALLMANS, G.; HELLSTEN, G.;
28 NILSSON, T.K.; SÖDERBERG, S. Improved fibrinolytic activity during exercise may be an
29 effect of the adipocyte-derived hormones leptin and adiponectin. *Thrombosis Research*, v.
30 122, p. 701–708, jan., 2008.
- 31 FALAHATPISHE, H.; JALALI, M.; BADAMI, N. MARDANI, N.; KHOSRAVI-DARANI1,
32 K. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain
33 isolated from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*, Short Communication, v. 5, n. 2, 2007.
- 34 FEITOSA, I. C. Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com
35 histórico de contato com petróleo em fermentação submersa. (2009). 104f. Dissertação.
36 Programa De Pós-Graduação em Engenharia de Processos. Universidade Tiradentes Aracaju,
37 Se.
- 38 FERNANDES, .O. C. C.; SILVA, J. C.; LIMA, A. C. S.; MELO, P. D. S.; CRUZ, P. C. A.;
39 CRUZ FILHO, R. F. Screening de proteases com ação fibrinolítica de fungos isolados do solo
40 de várzea da RDS- Mamirauá-Tefé -Amazonas-Brasil. In: XVIII Simpósio Nacional de

- 1 Bioprocessos (SINAFERM), Caxias do Saul- RS. Anais do XVIII Simpósio Nacional de
2 Bioprocessos (SINAFERM), 2011.
- 3 FERNÁNDEZ, D. E. R. Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado
4 sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. (2009). Tese. Curso de Pós-
5 Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do
6 Paraná, Curitiba-PR.
- 7 FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo
8 da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. Rev Bras
9 Hematol Hemoter, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.
- 10 FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina, Ribeirão
11 Preto, v. 34, p.229-237, jul./dez., 2001.
- 12 FREITAS, A. C.; CASTRO, R. J. S.; PINTO, G. A. S. Estudo das condições de extração de
13 protease em processo fermentativo semi-sólido. . In: XVIII Congresso brasileiro de
14 engenharia química (COBEQ), Foz do Iguaçu (PR). Anais do XVIII Congresso brasileiro de
15 engenharia química (COBEQ), 2010.
- 16 FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão
17 caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 28, n.
18 2, p. 470-476, 2008.
- 19 FUJITA, M.; NOMURA, K.; HONG, K.; ITO, Y.; ASADA, A.; NISHIMURO, S. Purification
20 and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese
21 Natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochemical and Biophysical Research
22 Communications, v. 197, n. 3, p. 1340-1347, 1993.
- 23 GÓMEZ-MARÍN, A. M.; NARANJO-FERNÁNDEZ, D.; MONTOYA, O. I.; GALLEGU, D.
24 J. Efecto de Algunos Componentes del Medio de Cultivo en la Producción de Melanina
25 Bacteriana. BioTecnología, v. 13, n. 2, p. 11-23, 2009.
- 26 GUPTA, A. V. N.; EMMANUEL, S.; LAKSHMINARAS, M. Protease production by newly
27 isolated *Bacillus* sp.: Statistical media optimization. Arch. Appl. Sci. Res., v. 2, n. 2, p. 109-
28 123, 2010.
- 29 HABIB S. A.; ABO DOUBARA, M. I.; ABDEL-MALAK CAMELIA. A. ;BADAWY
30 RASHA. M. Optimization of fibrinase productivity from Actinomycetes. The Egyptian
31 Journal of Hospital Medicine. v. 40, p. 375 – 388, 2010.
- 32 HAN, X.; GUO, R.; YU, H.; JIA, Y. Cloning and Expression of One Fibrinolytic Enzyme
33 from *Bacillus* sp. zlw-2. Agricultural Sciences in China, v. 8, n. 5, p. 591-596, may, 2009.
- 34 HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for
35 fungal toxins. Applied Microbiology, v. 21, n. 6, p. 1011-1016, 1971.
- 36 HUA, Y.; JIANG, B, MINE Y, MU W. Purification and characterization of a novel
37 fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional
38 fermented shrimp paste. J. Agric. Food Chem., v. 56, p. 1451-1457, 2008.

- 1 HWANG, K.; CHOI, K.; KIM, K.; PARK, C.; CHA, J. Purification and Characterization of a
2 New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, Isolated from Korean Traditional
3 Jeot-gal. J. Microbiol. Biotechnol., v. 9, p. 1469–1476, 2007.
- 4 INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de
5 alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglela -- São Paulo:
6 Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020
- 7 IQBAL, A.; KHALIL, I. A.; ATEEQ, N.; KHAN, M. S. Nutritional quality of important food
8 legumes. Food Chemistry, v. 97, p. 331–335, 2006.
- 9 JUNG, K.; SONG, T.; HAN, D.; KIM, I.; KIM, Y.; LEE, C. Cardiovascular Protective
10 Properties of Kiwifruit Extracts in Vitro. Biol. Pharm. Bull., v. 28, n. 9, p.1782-1785, April,
11 2005.
- 12 KIM, J.; SAPKOTA, K.; PARK, S.; CHOI, B.; KIM, K.; HIEP, N. T.; KIM, C.; CHOI, H.;
13 KIM, M.; CHUN, H.; PARK, Y.; KIM, S. A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal
14 Mushroom *Cordyceps militaris*. The Journal of Microbiology, December. V. 44, n. 6, p. 622-
15 631 2006.
- 16 KIM, K.; LIM, K.; KIM, C.; SHIN, H.; SEO, D.; LEE, S.; NOH, J.; BAE, O.; SHIN, S.;
17 CHUNG, J. Black soybean extract can attenuate thrombosis through inhibition of collagen-
18 induced platelet activation. Journal of Nutritional Biochemistry, in press, 2010.
- 19 KIM, W.; CHOI, K.; KIM, Y.; PARK, H.; CHOI, J.; LEE, Y.; OH, H.; KWON, I.; LEE, S.
20 Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain
21 CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Applied and Environmental Microbiology, v. 62, n.
22 7, p. 2482-2488, 1996.
- 23 KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.
24 Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous
25 two-phase system, Quim. Nova, v. 35, n. 10, p. 1912-1915, 2012.
- 26 KO, J.H; YAN, J.P.; ZHU, L.; QI, Y.P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from
27 *Bacillus subtilis* QK02. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, v. 137, p. 65-74,
28 2004.
- 29 LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; EREZ, V. H.; MARTINS,
30 M. L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico
31 *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de
32 planejamento experimental, Quim. Nova, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.
- 33 LEE, B.C.; BAE, J.T.; PYO, H.B.; CHOE, T.B.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; YUN, J.W.
34 Submerged culture conditions for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides
35 by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p.
36 369-376, 2004.
- 37 LEE, J.; BRAIK, H.; PARK, S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic
38 proteases from mushroom, *Fomitella fraxinea*. J. Microbial. Botechnol., v. 16, n. 2, p. 264-
39 271, 2006.

- 1 LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine
2 protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal
3 Molecular Biology, v. 76, p. 103-122. 1973.
- 4 LIMA, L.M.; CARVALHO,M.G.; SABINO, A.P.; SOUSA, M.O. Lipoproteína (a) e inibição
5 da fibrinólise na doença arterial coronariana. Rev. bras. hematol. hemoter., v. 28, n. 1, p. 53-
6 59, 2006.
- 7 LU, F.; LU, Z.; BIE, X.; YAO, Z.; WANG, Y.; LU, Y.; GUO, Y. Purification and
8 characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic
9 bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Thrombosis Research, v.126, p.349–e355, sept.,
10 2010.
- 11 MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N .B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção
12 de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por
13 petroderivados. Exacta, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.
- 14 MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; GOKHALE,
15 D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged
16 fermentation. Process Biochemistry, v.39, p. 2031–2034, 2004.
- 17 MAHAJAN, P. M.; NAYAK, S.; LELE, S. S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated
18 marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and
19 characterization. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 113, n. 3, p. 307-314, 2012.
- 20 MAHMOUD, M. G.; GHAZY, I. A.; IBRAHIM, G. S.; FAHMY, A. S.; EL-BADRY, M. O.;
21 ABDEL-ATY, A. M. Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of
22 *Bacillus polymyxa* NRC-A. International Journal of Academic Research, v. 3, n. 4.2011.
- 23 MAIA, F. M. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; MATOS, M. R. T.; MOREIRA, R. A.;
24 VASCONCELOS, I. M. Proximate composition, amino acid content and haemag-glutinating
25 and trypsin-inhibiting activities of some Brazilian *Vigna unguiculata* (L) Walp cultivars.
26 Journalofthe ScienceofFoodandAgriculture, v. 80, p. 453-458, 2000.
- 27 MALAJOVICH M. A. Biotecnologia 2011. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer
28 do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.
- 29 NADEEM, M.; QAZI, J. I.; BAIG, S.; SYED, Q. Effect of Medium Composition on
30 Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-2. Food
31 Technol. Biotechnol., v. 46, n. 4, p. 388–394, 2008.
- 32 NARANG, A. Comparative analysis of some models of gene regulation in mixed-substrate
33 microbial growth. Journal of Theoretical Biolog, v. 242, p. 489–501, 2006.
- 34 NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de Proteases Por *Bacillus* sp.
35 SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das
36 enzimas com detergentes comerciais. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 26, n. 3, p. 582-
37 588, 2006.
- 38 NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R. CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L.
39 Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp.

- 1 Termofílico Optimization of a culture medium for protease production by *Bacillus* sp.
2 thermophilic. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.
- 3 PALMA, M.B. Produção de xilanases por *thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado
4 sólido. Florianópolis, 2003. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Centro
5 Tecnológico, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade
6 Federal de Santa Catarina.
- 7 PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.13, n.8, p.81-84,
8 2003.
- 9 PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; TEIXEIRA JÚNIOR, A.; GUERREIRO, T. L.; HASAN,
10 S. D. M. Estudo do crescimento de *A. asiellus* em farelo de soja convencional para produção
11 de enzimas. *Estudos tecnológicos*, v. 6, n. 1, p. 22-35, 2010.
- 12 PARK, S.; LI, M.; KIM, J.; SAPKOTA, K.; KIM, J.; CHOI, B.; YOON, Y.; LEE, J.; LEE,
13 H.; KIM, C.; KIM, S. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from a
14 Culture Supernatant of *Flammulina velutipes* Mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 71, n.
15 9, p. 2214–2222, 2007.
- 16 PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S. Extracellular alkaline protease from a newly isolated
17 haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry*, v. 40, p.
18 3569–3575, 2005.
- 19 PEDROSO, R. C. R.; PERALBA, M. C. R.; SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M.;
20 FRÖEHLICH, P. E. Desenvolvimento de métodos de análise por clae-uv para os
21 antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de
22 sílica como sistemas de pré-concentração. *Quim. Nova*, v. 34, n. 2, p. 206-212, 2011.
- 23 PENG, Y.; HUANG, Q.; ZHANG, R. H.; ZHANG, Y. Z. Purification and characterization of
24 a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a
25 traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:*
26 *Biochemistry and Molecular Biology*, v. 134, n. 1, p. 45-52, 2003.
- 27 PENG, Y.; YANG, X.; XIAO, L.; ZHANG, Y. Cloning and expression of a fibrinolytic
28 enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*.
29 *Research in Microbiology*, v. 155, p. 167–173, 2004.
- 30 PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source,
31 production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 69,
32 p.126-132, October, 2005.
- 33 PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A.M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B.
34 Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de
35 resíduos agroindustriais tropicais. Embrapa Comunicado técnico 102, ISSN 1679-6535, 2005.
- 36 PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, P. A. P.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J. L.;
37 CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR, A. Removal of proteases from *Clostridium*
38 *perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *J. Ind. Microbiol*
39 *Biotechnol.*, v. 34, p. 547–552, 2007.

- 1 PUNGARTNIK, C., PICADA, N.; BRENDL, M. B.; HENRIQUES, J. A. P. Further
2 phenotypic characterization of *pso* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with respect to DNA
3 repair and response to oxidative stress. *Genetics Molecular Research*, v. 1, n. 1, p. 79-89.
4 2002.
- 5 QINGHUA, L.; XIAOWEI, Z.; WEI, Y.; CHENJI, L.; YIJUN, H.; PENGXIN, Q.;
6 XINGWEN, S.; SONGNIAN, H.; GUANGMEI, Y. A catalog for transcripts in the venom
7 gland of the *Agkistrodon acutus*: Identification of the toxins potentially involved in
8 coagulopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, p. 522-531,
9 2006.
- 10 RAAFAT, A. I.; ARABY, E.; LOTFY, S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production
11 from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized
12 starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 1369–
13 1374, 2012.
- 14 RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento
15 doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de
16 feijão comum. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.
- 17 ROVEDA, M. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios
18 através de fermentação submersa. (2007) Dissertação. Programa de Pós-Graduação em
19 Engenharia. Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo
20 Fundo-RS.
- 21 SALGADO, S. M.; GUERRA, N. B.; ANDRADE, S. A. C.; LIVERA, A.V.S.
22 Caracterização físico-química do grânulo do amido do feijão caupi. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*,
23 Campinas, v. 25, n. 3, p. 525-530, 2005.
- 24 SANTOS, F. M. S. (2007), Estudo da produção de pectinases por fermentação e estado sólido
25 utilizando pedúnculo de caju como substrato. Tese de Doutorado. Universidade Federal do
26 Rio Grande do Norte, Natal, Brasil.
- 27 SANTOS, J. G.; CRUZ FILHO, R. F.; LIMA, L. A.; MONTENEGRO, P. C. C.;
28 FERNANDES, O. C. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de Proteases Alcalinas por *Bacillus*
29 sp Isolado do Solo Contendo Resíduos Industriais de Couro. In: XVII Simpósio Nacional de
30 Bioprocessos (SINAFERM), Natal-RN. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos
31 (SINAFERM), 2009.
- 32 SANTOS, Januário Gama dos. Caracterização de proteases produzidas por bactérias da
33 Amazônia com potencial fibrinolítico. 2009. 44f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)
34 Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- 35 SEO, J.; LEE, S. Production of Fibrinolytic Enzyme from Soybean Grits Fermented by
36 *Bacillus firmus* NA-1. *Journal of Medicinal Food*, v. 7, n. 4, p.442- 449, 2004.
- 37 SHAHEEN, M.; SHAH, A. A.; HAMEED, A.; HASAN, F. Influence of culture conditions on
38 production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot.*, v. 40, n. 5, p.
39 2161-2169, 2008.

- 1 SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região
2 Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306,
3 2006.
- 4 SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium*
5 *viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-
6 products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.318-324, 2002.
- 7 SIMKHADA, J.R.; MANDER, P.; CHO, S.S.; YOO, J.C. A novel fibrinolytic protease from
8 *Streptomyces* sp. CS684. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 88–93, 2010.
- 9 SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F.; MORIM, B. C. Caracterização da
10 poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá
11 como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* v. 14, n. 9, p. 987–
12 992, 2010.
- 13 SUHET, M. I.; FIOREZE, R. Fermentação semissólida do resíduo do abacaxi. *Tecnol. e Ciên.*
14 *Agropec.*, v .5, n.1, p.47-52, 2011.
- 15 SUMI, H.; HAMADA, H.; TSUSHIMA, H.; MIHARA, H.; MURIKI, H. A novel fibrinolytic
16 enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in
17 the Japanese diet. *Experientia*, v. 43, n. 10, p. 1110-1111, 1987.
- 18 SUN, M.; LIU, S.; GREENAWAY, F.T. Characterization of a fibrinolytic enzyme
19 (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii* ussurensis snake venom: Insights into the effects of
20 Ca²⁺ on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1764, p.1340-1348, 2006.
- 21 TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase
22 production from *Aspergillus japonicus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p.286-290,
23 2000.
- 24 VLIEGHE, P.; LISOWSKI, V.; MARTINEZ, J.; KHRESTCHATISKY, M. Synthetic
25 therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, v.15, n. ½, January, 2010.
- 26 WANG, C.; DU, M.; ZHENG, D.; KONG, F.; ZU, G.; FENG, Y. Purification and
27 Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12. *J. Agric. Food Chem.* v.
28 57, p. 9722–9729, 2009.
- 29 WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a
30 nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New*
31 *Biotechnology*, in press, 2010.
- 32 YEO, W. S.; SEO, M. J.; KIM, M. J.; LEE, H. H.; KANG, B. W.; PARK, J. U.; CHOI Y. H.;
33 JEONG, Y. K. Biochemical analysis of a fibrinolytic enzyme purified from *Bacillus subtilis*
34 strain A1. *The Journal of Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 376-380, 2011.
- 35 ZU, X.; ZHANG, Z.; YANG, Y.; CHE, H.; ZHANG, G.; LI, J. Thrombolytic Activities of
36 Nattokinase Extracted from *Bacillus subtilis* Fermented Soybean Curd Residues. *International*
37 *Journal of Biology*, v. 2, n. 2; p. 120-125, 2010.

CAPÍTULO 2

Artigo 1

Fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas-SDFA para produção de protease fibrinolítica de *Bacillus stearothermophilus*

**Fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas-SDFA para produção
de protease fibrinolítica de *Bacillus stearothermophilus***

Raimundo Felipe da Cruz Filho; Januário Gama dos Santos; Rosana Antunes Palheta;

Maria Francisca Simas Teixeira*

Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas - UFAM

/*mteixeira@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

Fermentação extrativa usando sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma alternativa promissora para produção de compostos com atividade biológica, uma vez que proporciona condições estáveis para células e biomoléculas. Esse processo de recuperação do produto *in situ* envolve a integração da extração para remoção do produto simultânea a sua síntese (BANIK et al., 2003; PANDEY; BANIK, 2011).

O SDFA fornece ambientes com diferentes características físico-químicas que permite a separação de biomoléculas, como exemplo as proteínas. Comumente este sistema é biocompatível devido o elevado teor de água, em ambas as fases, característica que proporciona a purificação por partição de biomoléculas entre as duas fases líquidas. Todavia o particionamento é influenciado por diversas variáveis: o tipo e a concentração do sal, o peso molecular e concentração do polímero, pH, temperatura e as propriedades dos bioativos (LIU et al., 2011).

Estudos estão demonstrando que a fermentação integrada ao SDFA proporciona uma melhor produção de enzima quando comparada com a fermentação simples ou homogenia. Além disso, está se tornando atraente por ser um processo simples, que envolve técnica de purificação ideal para separação, extração e concentração de biomoléculas devido à alta produtividade do sistema, curto tempo de processamento, custo e versatilidade, e além de ser realizável em grande escala (ANTOV; PERIČIN, 2001; SHOW et al., 2012).

As proteases fibrinolíticas degradam coágulos de fibrina, por isso têm um importante papel na indústria farmacêutica como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares (CHO et al., 2004; DAS; PRASAD, 2010; FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Estes biocatalisadores foram descobertos gradualmente a partir de plantas, insetos, anelídeos, serpentes e micro-organismos (bactérias e fungos) (WANG et al., 2006; PATEL et al., 2012).

Bacillus produzem uma variedade de biocatalisadores fibrinolíticos, especialmente em condições de fermentação submersa (CHANG et al., 2012; RAAFAT et al., 2012). Entretanto, estudos tem demonstrado que fatores nutricionais, incluindo fontes de carbono, nitrogênio, fatores físico-químicos, tal como temperatura, pH, além da concentração do inóculo e o taxa de crescimento influenciam de forma significativa na produção desses biocompostos (SINGH et al., 2004; BOOMINADHAN et al., 2009; SUNDARARAJAN et al., 2011).

Tendo em vista o grande potencial da biodiversidade microbiana regional Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na produção de alimentos e medicamentos, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar o processo de fermentação extrativa usando o SDFA no particionamento de protease fibrinolítica produzida por *Bacillus stearothermophilus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os polietilenoglicóis (PEG 1000; 4000 e 6000. g/mol⁻¹) e os outros produtos químicos de grau analítico usado para preparar os meios de fermentação, como fosfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de amônio, extracto de levedura e gelatina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany), Micromed e Sigma (St. Louis, MO).

Produção de protease fibrinolíticas

Micro-organismo

Bacillus stearothermophilus (DPUA-1729) foi cedido pela coleção de cultura DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-Amazonas-Brasil. O micro-organismo foi cultivado 37 °C em Agar Nutritivo inclinado. A cultura estoque preservada 4 °C foi subcultivada em intervalo regular de 7 dias.

Meio e condições de fermentação extrativa

Para produção de protease fibrinolítica o meio para fermentação extrativa utilizando o SDFA, foi preparado em frasco de Erlenmeyers de 125 mL com massa final corresponde a 49 g; solução de sais de fosfatos monobásico (NaH_2PO_4) e dibásico (Na_2HPO_4); PEG 1000; 4000 e 6000 g/mol^{-1} . O pH do meio foi ajustado para 5,0 (HCL 1M). Após homogeneização, o sistema foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos. O inóculo foi preparado em 50 mL de meio líquido [(g/L) KH_2PO_4 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL, Gelatina 0,5% (p/v) e tapioca 0,25 (p/v) (MACIEL et al., 2010; SILVA NEVES et al., 2006)] em frasco de Erlenmeyer 125 mL, a 25 °C, a 180 rpm por 14 horas.

Procedimento Experimental

A fermentação extrativa foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central (Tabela 1). O delineamento experimental foi composto por 12 ensaios experimentais. As variáveis utilizadas foram concentração do PEG, massa molar do PEG e concentração de sais.

Tabela 1 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações e massa molar do PEG e sais de fosfato.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Con. PEG	10%	15%	20%
MM PEG	1000	4000	6000
Con Sais	15%	20%	25%

Produção de protease fibrinolítica

A fermentação foi realizada no SDFA pela adição de 1 g de suspensão celular em 50 g de meio em cada frasco de Erlenmeyer e conduzida a 25 °C, 180 rpm . Após 14 h os volumes das fases foram medidos, no topo e na fase inferior e retirados separadamente. Os parâmetros avaliados incluíram as seguintes variáveis respostas: (1) coeficiente de partição (K); (2) fator de purificação (FP); (3) rendimento (Y) (KIRSCH et al., 2012; PANDEY; BANIK, 2011).

O coeficiente de partição (K) da enzima foi definido como a relação entre a atividade da enzima fase superior (As) e a fase inferior (Ai):

$$K = \frac{As}{Ai}$$

O fator de purificação (FP) foi calculado pela relação entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato bruto (Aeb), “Cs” e Ceb” são as concentrações totais de proteínas, expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$, na fase superior e no extrato bruto inicial, respectivamente.

$$PF = \frac{As/Cs}{Aeb/Ceb}$$

A atividade de recuperação foi determinada como sendo a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato bruto e é expressa em percentagem, “Vs” e “Veb” são os volumes da fase superior e do extrato bruto respectivamente.

$$Y = \left(\frac{As \times Vs}{Aeb \times Veb} \right) \times 100$$

Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica foi utilizado 250 μL do substrato (azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1 M , pH 7,6) e 150 μL do extrato enzimático. O sistema foi incubado por 1 hora a 25 °C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de 1200 μL de ácido tricloroacético 10% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 8000 xg por

10 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 0,8mL foram transferidas para tubos de ensaios contendo 1400 µL de hidróxido de sódio 1 M. Os sistema de reação incluindo o branco foi preparado em triplicata e a leitura feita a 440 nm (LEIGTON et al., 1973). Uma unidade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 440 nm igual a 0,1 em 60 minutos expressa em U.mL⁻¹ (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

Determinação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais presente no extrato enzimático bruto foi realizada através do método de Bradford (1976), utilizando como corante o "Coomassie Brilliant Blue". A relação entre a concentração de proteína e a absorbância produzida a 595 nm, foi realizada em soluções de soro albumina bovina em concentrações de 0-100 µg/mL.

Teste de degradação do coágulo *in vitro*

A atividade da enzima fibrinolítica do extrato purificado de *Bacillus stearothermophilus* foi determinada pelo método de placa de fibrina. A placa de Petri (6 cm de diâmetro contendo 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL de fibrinogênio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/ml), após solidificada a mesma foi mantida em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida furos de 3 mm de diâmetro foram perfurados no gel para aplicação de enzima fibrinolítica (20 µL da amostra), e incubadas a 37 °C durante 18 horas(SEO; LEE, 2004; WANG et al., 2011).

Análise estatística

Para identificar diferenças significativas entre as variáveis foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software MINITAB 16.2.1 (2010).

Resultados e Discussão

Fermentação extrativa e purificação de protease em SDFA

Na fermentação extrativa em SDFA foi observada a formação das duas fases aquosas em 11 ensaios experimentais e uma interfase rica em biomassa. O primeiro ensaio formado pelos menores valores do desenho fatorial [PEG (1000 g.mol⁻¹ / 10% (p/p) e 15% (p/p) concentração de fosfato] não apresentou fase, Kirsch et al. (2012) também observaram resultados semelhantes quando estudaram o particionamento das proteases de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 em PEG (550; 4000 e 6000) e sais de fosfato, e segundo esses autores a não formação das fases nos níveis mais baixos de massa molar do PEG e as concentrações de PEG/sais está relacionado as condições de interação estarem abaixo da curva binodal. Porto et al. (2007) utilizando PEG (400 g.mol⁻¹ / em diferentes concentrações e 15% (p/v)) de concentração de citrato também não visualizaram a formação bifásica do sistema.

Os resultados obtidos nos 11 ensaios experimentais que formaram fase, referente ao planejamento fatorial (Tabela 2), o coeficiente de partição da protease (K), que quando for igual ou superior a um (1), confere a partição da enzima para a fase PEG (fase superior) apenas o ensaio 3 não apresentou essa expectativa, porém, os demais ensaios o particionamento da enzima tendeu para a fase PEG, promovido pelo fenômeno "salting out". Segundo Porto et al. (2007) e Khadpoon et al. (2010) esse fenômeno pode ser explicado pela elevada concentração de fosfato na fase rica em sal (fase inferior). Além desse processo, Kirsch et al. (2012) sugerem que os íons de fosfato influenciam a partição de proteínas por diferença de cargas eletrostáticas entre as proteínas particionadas e as dos componentes do SDFA.

Nos ensaios em que enzima migrou para a fase rica em PEG a partição foi significativamente influenciada de forma positiva pela concentração do PEG e do sal com uma interação negativa entre essas variáveis (Figura 2). Os resultados aqui apresentados corroboram com Kirsch et al. (2012) que particionou protease de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 em sistema de PEG/Fosfato e Porto et al. (2007) que semi-purificou protease de

Clostridium perfringens em SDFA utilizando PEG/Citrato, esses autores demonstram a influencia da concentração dos sais no particionamento de protease.

As variáveis independentes [MMPEG (4,26), concentração do PEG (12,74) e concentração do fosfato (21,07)] e a interação entre elas (9,43) influenciaram o particionamento da protease de forma significativa e positiva (Figura 1), ou seja, o aumento no quantitativo dessas variáveis eleva o fator de purificação melhorando a recuperação da protease. A condição ótima foi obtida no ensaio 2 [(20% (p/p) de concentração do PEG; PEG 1000 g/mol-1; 15% (p/p) de sais fosfato] por apresentar coeficiente de partição e fator de purificação maior que 1 e um rendimento teórico superior a 100% (Tabela 2). Segundo Meyerhoff et al. (2004) o uso de PEG's com baixo peso e alta concentração de sais promove a exclusão de inibidores da fase de PEG promovendo um rendimento enzimático superior a 100%.

Tabela 2: Planejamento experimental; resultados do particionamento da protease do extrato bruto de *Bacillus stearothermophilus* por SDFA.

Ensaio	MM PEG ^a (g/mol ⁻¹)	Con PEG ^b (%)	Con Sais ^c (%)	K ^d	FP ^e	Y(%) ^f
1	1000	10	15	0	0	0
2	1000	20	15	1,05	1,00	152,54
3	6000	10	15	0,89	0,74	74,51
4	6000	20	15	1,11	0,83	118,31
5	1000	10	25	1,45	1,09	77,72
6	1000	20	25	1,40	0,92	130,85
7	6000	10	25	1,13	0,99	58,39
8	6000	20	25	1,19	0,81	106,24
9 ^g	4000	15	20	1,35	0,96	116,03
10 ^g	4000	15	20	1,36	0,66	118,82
11 ^g	4000	15	20	1,28	0,88	117,53
12 ^g	4000	15	20	1,32	0,83	118,82

^a Massa molar do PEG; ^b Concentração do PEG; ^c Concentração de Fosfato; ^d Coeficiente de partição; ^e Fator de Purificação; ^f Rendimento teórico. ^g Ponto Central. (0) não formação de fase.

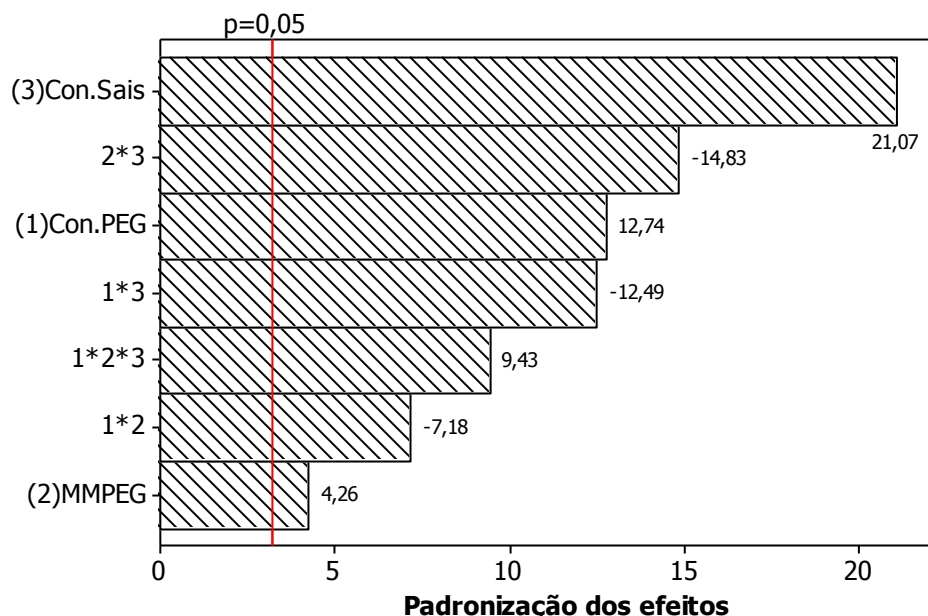


Figura 1: Efeito da (1) Massa molar do PEG; (2) Concentração do PEG e Concentração do sal, e suas interações.

Teste de degradação *in vitro* do coágulo

No teste de degradação do coágulo em placa de fibrina foi utilizados a fase PEG com maior valor de K (ensaio 5) [PEG (1000 g.mol^{-1} / 10% (p/p) e 15% (p/p) concentração de fosfato] resultando em halo de $7,03 \pm 0,94$ mm em média (Figura 2). Resultados positivos em placa de fibrina foram também encontrados por Lu et al. (2010) com protease fibrinolítica (9 mm halo) utilizando *Schizophyllum commune* produzida em caldo Yeast Mold (YM). Inatsu et al. (2006) fermentando *Bacillus subtilis* em “Thua nao” (alimento Tailandês a base de soja), Lee et al. (2010) analisando prótese fibrinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1 isolado de “Cheonggukjang” (alimento Coreana a base de soja) e Tamura et al. (2011) usando extrato metabólico fibrinolítico de *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus* sp. em meio complexo, descreveram a presença de halo translucido em placas de fibrina como presença de atividade fibrinolítica. Todavia, não apresentaram valores em milímetro.

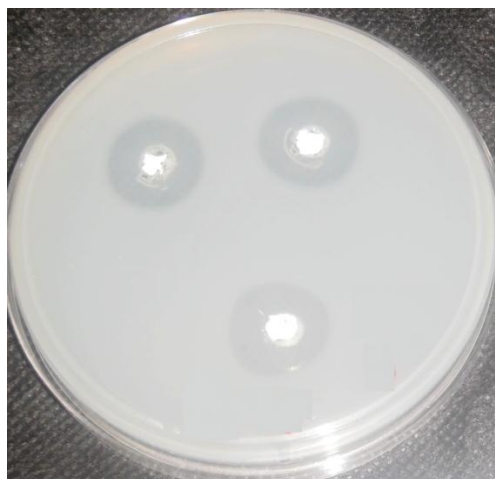


Figura 2: Método da placa de fibrina: halo com 7,03 mm em média (triplicata).

CONCLUSÃO

No presente estudo, protease fibrinolítica de *Bacillus stearrowthermophilus* produzido em fermentação extrativa, os melhores sistemas foram PEG 1000 (g/mol^{-1}) a 20% (p/p) e sais fosfato a 15% (p/p). Nestas condições, o fator de purificação 1 foi obtido com o coeficiente de partição 1,13 e rendimento teórico de 1152,54 %, e o halo em placa de fibrina foi em média de 7,07 mm.

REFERÊNCIAS

- ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M. Production of pectinases by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 467-472, 2001.
- BANIK, R. M.; SANTHIAGU, A.; KANARI, B.; SABARINATH, C.; UPADHYAY, S. N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 19, p. 337–348, 2003.
- BOOMINADHAN, U.; RAJAKUMAR, R.; SIVAKUMAAR, P. K. V.; JOE, M. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* sp. isolated from different wastes. *Botany Research International*, v. 2, n. 2, p. 83-87, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHANG, C.; WANG,.; HUNG, Y.; CHUNG, Y. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. *Food Chemistry*, v. 133, p. 1611–1617, 2012.

CHO, H.; CHOI, E. S.; LIM, H. G.; LEE, H. H. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from Earthworm *Lumbricus rubellus*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, v. 37, n. 2, p. 199-205, 2004.

DAS, G.; PRASAD, M. P. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. International Research Journals of microbiology, v. 1, n. 2, p. 026-031, 2010.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. Food Bioprocess Technol., Food and Bioprocess Technology, v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011.

INATSU, Y.; NAKAMURA, N.; YURIKO, Y.; FUSHIMI, T.; WATANASIRITUM. L.; KAWAMOTO. S. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. Letters in Applied Microbiology, v. 43p. 237–242, 2006.

KHADPOON, N.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Aqueous two phase partitioning of protease from *Calotropis procera* latex. Asian Journal of Food and Agro-Industry. V. 3, n. 01, p. 82-92, 2010.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PROTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the PEG/phosphate aqueous two-phase system. Quim. Nova, v. 35, n. 10, p. 1912-1915, 2012.

LEE, A. R.; KIM, G. M.; PARK, J.; JO, H. D.; CHA, J. SONG, Y.; CHUN, J.; KIM, J. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1 isolated from Cheonggukjang. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., v. 53, n. 1, p. 56-61, 2010.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. Journal Molecular Biology, v. 76, p. 103-122. 1973.

LIU, Y.; YU, Y. L.; CHEN M. Z.; XIAO X. Advances in aqueous two-phase systems and applications in protein separation and purification. Canadian Journal on Chemical Engineering e Technology, v. 2, n. 2, 2011.

LU, C.; WANG, J.; CHEN, S. Protease purified from *Schizophyllum commune* culture broth digests fibrins without activating plasminogen. The American Journal of Chinese Medicine, v. 38, n. 6, p. 1223–1231, 2010.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N .B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. Exacta, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de Proteases Por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

- PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4226-4231, 2011.
- PATEL, G. K.; KAWALE, A. A.; SHARMA, A. K. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 52, p. 104-111, 2012.
- PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, P. A.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *J Ind Microbiol Biotechnol.*, v. 34, p. 547–552, 2007.
- RAAFAT, A. I.; ARABY, E.; LOTFY, S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 369-1374, 2012.
- SEO, J.; LEE, S. Production of Fibrinolytic Enzyme from Soybean Grits Fermented by *Bacillus firmus* NA-1. *Jjournal of medicinal food*, v. 7, n. 4, p.442- 449, 2004.
- SHOW, P. L.; TAN, C. P.; ANUAR, M. S.; ARIFF, A.; YUSOF, Y. A.; CHEN, S. K.; LING, T. C. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 116, p. 226–233, 2012.
- SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.
- SINGH, J.; VOHRA, R. M.; SAHOO, D. K. Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1093–1101, 2004.
- SUNDARARAJAN, S.; KANNAN, C. N.; CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, n. 2, p. 128–133, 2011.
- TAMURA, Y.; OKADA, K.; KAWAO, N.; YANO, M.; UESHIMA, S.; NAGAI, N.; MATSUO, O. Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus*. *J. Thromb. Thrombolysis*, v. 32, n. 2, p. 195-200, 2011.
- WANG, C. T.; JI, B. P.; LI, B. NOUT, R.; LI, P. L.; JI, H.; CHEN, L. F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, v. 33, p. 750–758, 2006.
- WANG, S.; WU, Y.; LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, *New Biotechnology*. v. 28, n. 2, p. 196- 202, 2011.

CAPÍTULO 3

Artigo 2

Parâmetros para produção e partição de protease de *Bacillus stearoothermophilus* isolados de solo Amazônicos em sistema de duas fases aquosas-SDFA

Parâmetros para produção e partição de protease de *Bacillus stearothermophilus*

isolados de solo Amazônicos em sistema de duas fases aquosas-SDFA

Raimundo Felipe da Cruz Filho; Januário Gama dos Santos; Rosana Antunes Palheta; Nelly

Mara Vinhote Marinho; Maria Francisca Simas Teixeira*

Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas - UFAM

/*meteixeira@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

Proteases constituem um dos grupos de enzimas de maior importância industrial, principalmente as de origem microbiana que predominam no mercado mundial, na fabricação de alimentos, hidrolisados de proteínas, produtos farmacêuticos, com participação de dois terços da indústria de detergentes (AL-SHEHRI; MOSTAFA, 2004; NASCIMENTO et al., 2007).

Para bioindústria os micro-organismos são as fontes mais comuns de enzimas, considerando às suas propriedades fisiológicas, a facilidade de cultivo e da manipulação de suas células em condições *in vitro* (RODARTE et al. 2011). No entanto, certas espécies de bactérias não sintetizam proteases em quantidades suficientes, propriedade que desfavorece a aplicação industrial por não atender demanda para comercialização (PUNITHA et al., 2009; SUNDARARAJAN et al., 2011). Diversas pesquisas estão sendo realizadas com a finalidade de encontrar espécies de micro-organismos como fonte de proteases com características fisiológicas viáveis à otimização de bioprocessos. A produção de enzimas está agregada ao custo do processo e, comumente, entre outros fatores, o valor do substrato para crescimento do micro-organismo influencia de forma significativa, considerando que 30-40% do valor investido corresponde ao valor do meio de cultivo (NASCIMENTO et al., 2007).

Para aumentar o rendimento das enzimas, a avaliação das variáveis que influenciam na produção e na redução do custo do processo tem grande importância para o sucesso produtivo

(NASCIMENTO; MARTINS, 2006). Além disso, as proteases para fins terapêuticos apresentam outras desvantagens, o valor do processo de purificação e os efeitos colaterais em pacientes são barreiras limitantes para investimento pela bioindústria (PENG et al., 2005; SILVA et al., 2013)

Neste contexto, o SDFA pode ser uma alternativa potencial devido o baixo custo dos compostos e os rendimentos que promove na fermentação, inclusive em alguns casos substituindo os tradicionais sistemas cromatográficos (SILVA; LOH, 2006; MEHRNOUSH et al., 2012; SILVA et al., 2013).

SDFA é frequentemente formado por dois polímeros hidrossolúveis ou um polímero e, uma substância de baixo peso molecular (sal inorgânico). Em solução aquosa, as fases formadas apresentam elevado teor de água, 80 a 90% (p/p) favorecendo a não desnaturação das moléculas de interesse (SILVA; LOH, 2006; OLIVEIRA et al. 2009; LIU et al. 2011).

Este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a influência de condições do cultivo e proceder a extração de protease por *Bacillus stearothermophilus* em SDFA usando PEG/fosfato.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Os polietilenoglicóis (PEG) e todos os outros produtos químicos (grau analítico) usados para preparar os meios de fermentação, como fosfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de amônio, extrato de levedura e gelatina foram adquiridos da Merck® (Darmstadt, Germany), Micromed® e Sigma® (St. Louis, MO).

Micro-organismo

Bacillus stearothermophilus (DPUA-1729) foi cedido pela coleção de cultura DPUA da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus-Amazonas-Brasil. A bactéria foi cultivada 37 °C em ágar nutritivo inclinado, em tubo de ensaio. A cultura estoque foi preservada a 4 °C e subcultivada em intervalo regular de 7 dias.

Determinação das melhores condições de cultivo

Avaliação da influência do pH; da agitação e da temperatura na produção de protease

Para determinar o efeito do pH, da agitação e da temperatura na produção de protease por *Bacillus stearothermophilus* foram realizados cultivos em meio líquido [(g/L) KH₂PO₄ 2 g; (NH₄)₂SO₄ 1 g; MgSO₄ 7H₂O 0,1 g; Na₂HPO₄ 2H₂O 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL (SILVA NEVES et al., 2006; MACIEL et al., 2010)], pH 5,0; 7,2 e 9,0. Os cultivos foram submetidos a 120, 150 e 180 rpm nas seguintes temperaturas: 25 °C, 35 °C; 45°C (Tabela 1) (RODARTE, 2005; CUCOLO et al., 2006). A recuperação do extrato bruto foi feita por filtração em membrana (0,22 µm), seguindo-se a determinação da atividade proteolítica.

Tabela 1: Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2³) com quatro repetições no ponto central para se determinar o efeito do pH, agitação e temperatura na produção da protease.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	5,0	7,2	9,0
Agitação (rpm)	120	150	180
Temperatura (°C)	25	35	45

Determinação da influência da idade do inóculo e da concentração do substrato na produção de protease

Nas condições experimentais, para a produção de protease por *Bacillus stearothermophilus*, os cultivos foram realizados em 100 mL de meio líquido supracitado, adicionado de gelatina 0,25%; 0,50% e 1,0 % (p/v), como substrato. A fermentação nas

melhores condições identificadas no item anterior foi realizada em frescos de Erlenmeyer de 250 mL por 36 horas, com retirada de amostra a cada 12 horas (SILVA NEVES et al., 2006). Para estes experimentos foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central para avaliar os parâmetros, idade do inóculo e da concentração do substrato [(gelatina) p/v] (Tabela 2). Ao término do processo de fermentação a biomassa foi separada por filtração em membrana (0,22 μ m), e no extrato bruto foi determinada da atividade proteolítica.

Tabela 2: Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^2) com quatro repetições no ponto central para determinar a influência da idade do inóculo e da concentração do substrato.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Idade do inóculo (h)	12	24	36
Concentração do substrato [(%) p/v]	0,25	0,50	1,0

Preparação dos sistemas de duas fases aquosa-SDFA em planejamento fatorial

Após escolha das melhores condições para produção de protease por fermentação submersa, foi realizado estudo utilizando um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central para determinar as influências e interações das concentrações e massa molar do PEG e das concentrações dos sais de fosfato (tabela 3).

Tabela 3: Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações e massa molar do PEG e sais de fosfato.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Con. PEG	10%	15%	20%
MM PEG	1000	4000	6000
Com Sais	15%	20%	25%

Todos os sistemas de PEG/fosfato foram preparados para uma massa final de 6 g, formulados com mistura de soluções de PEG [PEG 1000; 4000 e 6000 g/mol⁻¹ (50% p/p)] e soluções de sais de fosfatos monobásico (NaH₂PO₄) e dibásico (Na₂HPO₄) (40% p/p), pH 5,0 e água desionizada, em tubos do tipo Falcon de 15 mL. O extrato bruto (0,5 mL) foi adicionado aos sistemas e homogeneizado em vortex durante um minuto. A mistura foi

deixada em repouso por 1 hora. As duas fases (superior e inferior) foram separadas com auxílio de pipeta. Após esse procedimento foi determinada a atividade de protease e a concentração de proteína em cada uma das fases.

Determinação da atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica no extrato bruto e em cada fase devidamente separadas, foi utilizado 0,25 mL do substrato (azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6) e 150 µL do extrato enzimático. O sistema foi incubado por 1 hora a 25 °C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de 1200 µL de ácido tricloroacético 10 % (p/v). As amostras foram centrifugadas a 8000 xg por 10 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 800 µL foram transferidas para tubos de ensaios contendo 1400 µL de hidróxido de sódio 1 M. Os sistema de reação incluindo o branco foi preparado em triplicata e a leitura feita a 440 nm (LEIGTON et al., 1973). Uma unidade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 440 nm igual a 0,1 em 60 minutos expressa em U.mL⁻¹ (NASCIMENTO; MARTINS, 2006)

Determinação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais no extrato enzimático bruto e semi-purificado foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando como corante o "Coomassie Brilliant Blue". A relação entre a concentração de proteína e a absorbância a 595 nm foi realizada em soluções de soro albumina bovina em concentrações de 0-100 µg/mL.

Determinação do coeficiente de partição, recuperação e fator de purificação

Para avaliar a purificação parcial pelo SDFA foram analisadas as respostas do coeficiente de partição (K) da enzima, definido como a relação entre a atividade da enzima fase superior (As) e a fase inferior (Ai):

$$K = \frac{As}{Ai}$$

O fator de purificação (FP) foi calculado pela relação entre a atividade específica na fase superior e a atividade específica do extrato bruto (Aeb):

$$PF = \frac{As/Cs}{Aeb/Ceb}$$

“Cs” e “Ceb” são as concentrações totais de proteínas, expressas em µg/mL, na fase superior e no extrato bruto inicial, respectivamente.

A atividade de recuperação foi determinada como sendo a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato bruto e é expressa em percentagem:

$$Y = \left(\frac{As \times Vs}{Aeb \times Veb} \right) \times 100$$

“Vs” e “Veb” são os volumes da fase superior e do extrato bruto respectivamente (PANDEY; BANIK, 2011; KIRSCH et al., 2012).

Análise estatística

Para identificar diferenças significativas entre as variáveis foi realizada análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey a 5 % de significância utilizando o software MINITAB 16.2.1 (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4 apresenta os dados do planejamento experimental 2^3 utilizado na FSm para verificar a influencia do pH, agitação e temperatura na produção de protease por *B.*

stearothermophilus. Das condições experimentais avaliadas, no ensaio 3 foi determinada a maior atividade proteolítica 40,2 U/mL quando comparado aos demais ensaios. Nos demais ensaios houve uma redução entre 92,54% a 96,34% da atividade proteolítica em relação ao quantitativo máximo.

Os experimentos de 1 a 4 foram os que apresentaram os maiores quantitativos de protease quando mantidos nas seguintes condições, 25 °C, pH do meio de cultura alternando entre 5,0 e 9,0, a 120 e 180 rpm. Dessa forma, pode-se inferir que nas condições de fermentação testadas, todas as variáveis influenciaram no desempenho do micro-organismo em relação a produção das enzimas. No entanto, a temperatura foi o que mais contribui para a redução da atividade proteolítica de *B. stearothermophilus* em comparação com a máxima atividade expressada por essa espécie. A resposta à temperatura por *B. stearothermophilus* observada neste estudo está em concordância aos apresentados por Jaswal et al. (2008) que verificaram temperatura ótima de 25 °C para produção de protease de *Bacillus circulans* utilizando como substrato resíduo agroindustrial 1% (v/v) na fermentação submersa.

A figura 1 apresentam dados referentes às influências das variáveis independentes, e suas interações na produção de protease por *B. stearothermophilus*, no planejamento experimental 2³. A influência da temperatura e pH foi significativa e negativa, ou seja, os menores valores deste parâmetros maximizam a produção de protease. Já à agitação, os valores foram significativos com interação positiva, ou seja, o aumento da agitação é proporcional ao aumento da atividade proteolítica.

Segundo Moon e Parulekar (1991) e Sandhya et al. (2005) o pH do meio de fermentação interfere nos processos enzimáticos além de danificarem o sistema de transporte da membrana da celular. No que se refere à agitação, os resultados estão semelhantes aos publicados por Padmapriya e Williams (2012) ao produziram protease neutra com *Bacillus subtilis*, 180 rpm em meio complexo. Contudo, outras citações verificaram que a variável

agitação também interfere na produção das enzimas por ser um fator limitante na transferência de oxigênio para a célula microbiana (AMARAL et al., 2008; ABUSHAM et al., 2009; CHAWLA et al., 2009).

Tabela 4: Atividade proteolítica (U/mL) de *B. stearrowthermophilus* em meio líquido referente ao planejamento experimental 2^3 para verificação das melhores condições de pH, agitação e temperatura.

Ensaios	pH	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	AE (U/mL)
1	5	120	25	21,00
2	9	120	25	25,13
3	5	180	25	40,20
4	9	180	25	28,93
5	5	120	45	3,00
6	9	120	45	2,87
7	5	180	45	1,87
8	9	180	45	1,47
9	7	150	35	1,73
10	7	150	35	1,87
11	7	150	35	1,93
12	7	150	35	2,53

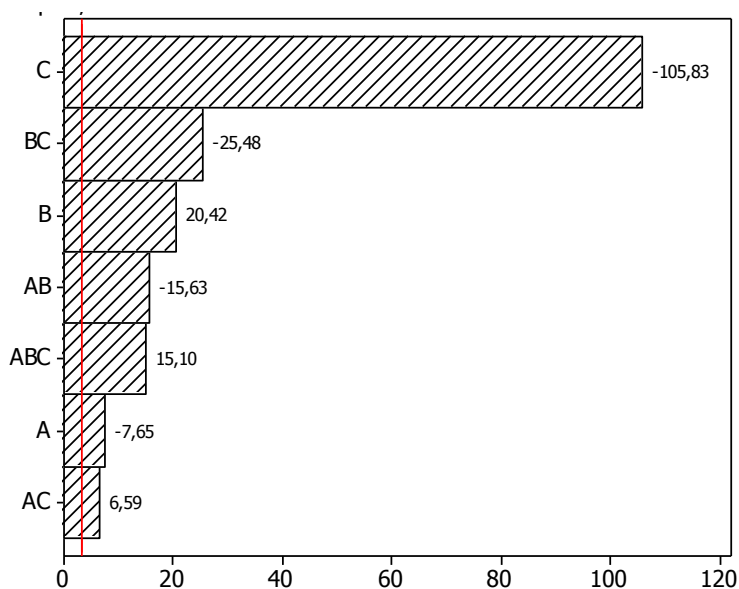


Figura 1: Influência do pH (A); agitação (B) e temperatura (C) na atividade de protease e suas interações ($p=0,5$).

Nos dados do design experimental 2^2 para verificar a influência da idade do inóculo e concentração do substrato na atividade de protease (Tabela 5) apenas o tempo de fermentação

apresentou dados significativos e influência negativa, a concentração do substrato não foi relevante para produção de protease (Figura 2). Os dados apresentados nesta pesquisa são semelhantes aos de Loperena et al. (1994) que obtiveram 2700 U/ml de protease produzida por *Bacillus subtilis* em 12 horas de fermentação. Contudo, a literatura apresenta valores bastante variados quanto ao fator tempo de fermentação na produção protease utilizando o gênero *Bacillus* (ADINARAYANA et al., 2003; NADEEM et al., 2006; NADEEM et al., 2008;).

Tabela 5: Atividade enzimática [AE (U/mL)] referente ao planejamento experimental 2^2 para verificação da influência e as interações da concentração do substrato e da idade do inóculo para produção de protease fibrinolítica.

Ensaios	C. S. ^a % (p/v)	I. I. ^b (h)	AE ^c (U/mL)
1	0,25	12	51,07
2	0,75	12	50,93
3	0,25	36	42,47
4	0,75	36	41,13
5	0,5	24	42,93
6	0,5	24	43,67
7	0,5	24	45,33
8	0,5	24	43,93

^aC.S. (concentração do substrato); ^bI.I. (idade do inóculo); ^cAE (atividade enzimática)

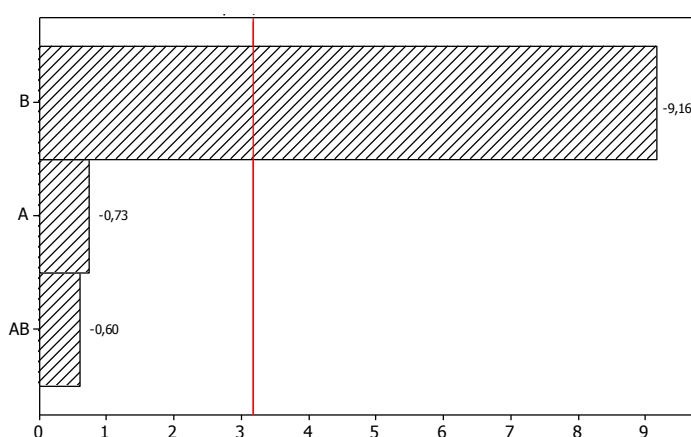


Figura 2: Influência da concentração do substrato (A) e idade do inóculo (B) na produção de protease e suas interações ($p=0,05$).

Tabela 6 apresenta os resultados do desenho experimental 2^3 utilizado para verificar o particinamento de protease em SDFA utilizando PEG/sais de fosfato. Nas condições

experimentais, o ensaio 1 [(10% (p/p) do PEG; MMPEG 1000 g/mol⁻¹ e 15% (p/p) de sais fosfato] não apresentou separação de fases, isto é, as concentrações dos sais e do PEG do sistema ficaram abaixo da curva binodal para formar as fases (PORTO et al., 2007). Nos demais ensaios, a partição da protease ocorreu preferencialmente na fase rica em PEG (superior) com exceção do ensaio 3 [(10% (p/p) do PEG; PEG 6000 g/mol⁻¹; 15% (p/p) de sais fosfato] que apresentou partição da enzima para a fase rica em sal (inferior). No que se refere ao fator de purificação (FP) apenas dois ensaios (2 e 5) foram iguais ou superior a 1,0. O rendimento teórico (Y%) os ensaios 2, 4 e 6 foram superiores a 100%.

Figura 3 apresenta a influência e a interação das variáveis independentes em relação ao coeficiente de partição da enzima (K), que foi significativa e positiva, ou seja, o aumento no quantitativo dessas variáveis eleva o coeficiente de partição melhorando o fator de purificação e consequentemente a recuperação da protease. Neste estudo, nos ensaios em que houve formação bifásica, os valores de K foram iguais ou superiores a um (1) indicando da afinidade da enzima pela fase superior. A condição ótima observada neste experimento foi apresentada no ensaio 2 [(20% (p/p) do PEG; MMPEG 1000 g/mol⁻¹; 15% (p/p) de sais fosfato].

Porto et al. (2007) utilizando PEG (400 g/mol⁻¹) e baixa concentração de sal (15% p/p) não obtiveram formação bifásica em três de seus ensaios na purificação de protease de *Clostridium perfringens*, dados que corroboram aos apresentados neste estudo, no ensaio 1.

O rendimento teórico nos ensaios 2, 4 e 6 ficaram acima de 100% (Tabela 6), de acordo com Meyerhoff et al. (2004) o uso de PEG's com baixo peso molar associado a concentração de sais entre 15% a 20% (p/p) permite a remoção de inibidores da fase de PEG durante a extração resultando em recuperações e rendimentos da enzima superior a 100%. No entanto, para Pancera et al (2002) que estudou o efeito do PEG na atividade e na estrutura

molecular de glucose-6-fosfato desidrogenase, afirma que este polímero altera a estrutura do sítio ativo da enzima, aumentando sua atividade relativa.

Tabela 6: Partição de protease do extrato bruto do cultivo de *B. stearothermophilus* em meio líquido referente ao planejamento experimental 2^3 para verificação do coeficiente de partição (K), fator de purificação (FP) e rendimento teórico (Y%).

Ensaio	Con PEG [% (p/p)]	MM PEG (g/mol ⁻¹)	Con Sais [% (p/p)]	K	FP	Y(%)
1	10	1000	15	-	-	-
2	20	1000	15	1,13	1,00	137,45
3	10	6000	15	0,80	0,74	68,35
4	20	6000	15	1,04	0,83	101,63
5	10	1000	25	1,38	1,09	63,89
6	20	1000	25	1,08	0,92	146,89
7	10	6000	25	1,08	0,99	49,75
8	20	6000	25	1,16	0,81	89,08
9	15	4000	20	1,07	0,96	78,11
10	15	4000	20	1,07	0,67	78,60
11	15	4000	20	1,14	0,88	79,13
12	15	4000	20	1,06	0,83	78,86

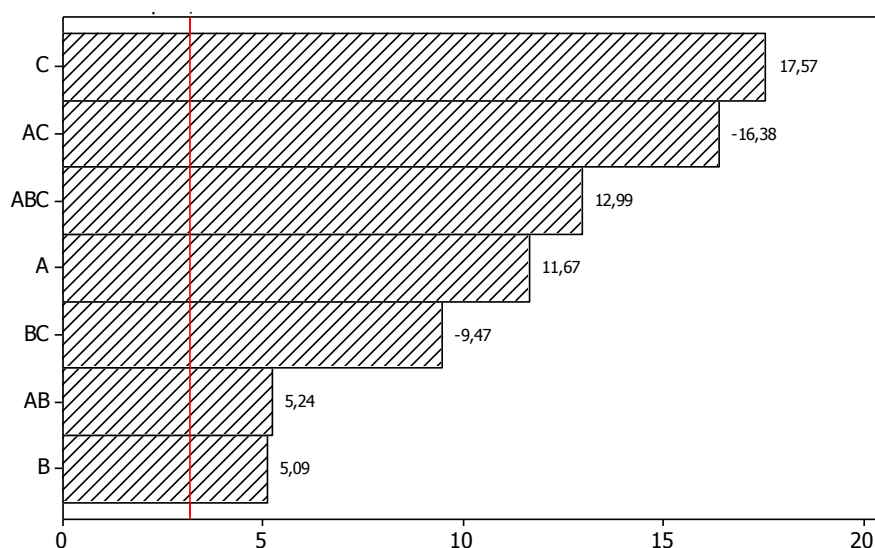


Figura 3: Influência e interação da concentração do PEG (A), massa molar do PEG (B) e da concentração de sais de fosfato (C) na produção de protease ($p=0,05$).

CONCLUSÃO

No presente estudo, protease de *Bacillus stearothermophilus* produzido em fermentação submersa foi avaliada, demonstrando que as condições ótimas de cultivo para essa produção foram a 25 °C, pH5,0 e 180 rpm. O particionamento da enzima utilizando

SDFA ocorreu na fase superior ($K < 1$) rica em PEG. As variáveis que tiveram o efeito de maior importância sobre o coeficiente de partição foram massa molar do PEG e a concentração de sais de fosfato. O sistema que permitiu a maior partição foi o ensaio 2 [(20% (p/p) de PEG; PEG 1000 g/mol⁻¹; 15% (p/p) de sais fosfato] em pH 5,0. Nestas condições, o fator de purificação 1 foi obtido com o coeficiente de partição 1,13 e rendimento teórico de 137,42 %.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAM, R. A.; RAHMAN, R. N.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand. *Microbial Cell Factories.*, v. 8, n. 20, p. 1-9, 2009.
- ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P.; PRASAD, D. S. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE11., v. AAPS Pharm. Sci. Tech., v. 4, n. 4, 2003.
- AL-SHEHRI, M. A.; MOSTAFA, S. Y. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Terhamet Asser, Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biologiacal Sceiences.* v. 7, n. 9, p. 1631-1635, 2004.
- AMARAL, P. F. F.; FREIRE, M. G.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P.; COELHO, M. A. Z. Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 99, n. 3, p. 588-598, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.
- CUCOLO, G. R.; ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Otimização da produção de CGTase de *Bacillus* sp subgrupo alcalophilus E16 em polvilho doce em fermentação submersa. *Braz. J. Food Technol.*, v. 9, n. 3, p. 201-208, 2006.
- JASWAL, R. K.; KOCHER, G. S.; VIRK, M. S. Production of alkaline protease by *Bacillus circulnas* using agricultural residues: A statistical approach. *Indian Journal of Biotechnology.* v. 7, p. 365-360, 2008.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous two-phase system, *Quim. Nova*, v. 35, n. 10, p. 1912-1915, 2012.

LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal Molecular Biology*, v. 76, p. 103-122. 1973.

LIU, Y.; YU, Y. L.; CHEN M. Z.; XIAO X. Advances in aqueous two-phase systems and applications in protein separation and purification. *Canadian Journal on Chemical Engineering e Technology*, v. 2, n. 2, 2011.

LOPERENA, L.; FERRARI, M. D.; BELOBRAJDIC, L.; WEYRAUCH, R.; VARELA H. Study of *Bacillus* sp. culture conditions to promote production of unhairing proteases. *Rev. Argent. Microbiol.*, v. 26, n. 3, p. 105-115, 1994.

MACIEL, C. C. S.; SOUZA, M. A.; GUSMÃO, N .B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

MEHRNOUSH, A.; MUSTAFA, S.; SARKER, M. Z. I.; YAZID, A. M. M. Optimization of Serine Protease Purification from Mango (*Mangifera indica* cv. Chokanan) Peel in Polyethylene Glycol/Dextran Aqueous Two Phase System. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 13, p. 3636-3649, 2012.

MOON, S.H., PARULEKAR, S.J. A parametric study of protein production in batch and fed-batch culture of *B. firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* v. 37, p. 467-483, 1991.

NADEEM, M.; BAIG, S.; SYED, Q.; QAZI, J. V. I. Microbial production of alkaline proteases by locally isolated *Bacillus subtilis* PCSIR-5. *Pakistan J. Zool.*, v. 38, n. 1, p. 109-114, 2006.

NADEEM, M.; QAZI, J. I.; SYED, Q.; BAIG, S. Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2 and kinetics studies in batch fermentation. *Turkish Journal of Biology*, v. 32, p. 243-251, 2008.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de Proteases Por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R V.; MARTINS, M. L .L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D, B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina c: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2142-2150, 2009.

PADMAPRIYA, M.; WILLIAMS, B. C. Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. v. 2, n. 4, p. 612-618, 2012.

PANCERA, S. M.; SILVA, L. H. M.; LOH, W.; ITRI, R.; PESSOA-JR, A. PETRI, D. F. S. The effect of poly(ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 26, p. 291–300, 2002.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4226-4231, 2011.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 69, p. 126–132, 2005.

PORTO, T. S.; PESSÔA-FILHO, P. A.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA JR, A. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). *J Ind Microbiol Biotechnol.*, v. 34, p. 547–552, 2007.

PUNITHA, V.; KANNAN, P.; SARAVANABHAVAN, S.; THANIKAIVELAN, P.; RAGHAVA-RA, J.; NAIR, B. U. Chemical degradation of melanin in enzyme based dehairing and fibre opening of buff calfskins. *Clean Technol. Environ. Policy*, v. 11, p.299-306, 2009.

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.) *Acta Scientiarum. Agronomy*. v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazônica*, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

SILVA, G. M. M.; MARQUES, D. A. V.; PORTO, T. S.; LIMA FILHO, J. L.; TEIXEIRA, J. A. C.; PESSOA-JÚNIOR, A.; PORTO, A. L. F. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*. v. 339, n. 52–57, 2013.

SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.

SUNDARARAJAN, S.; KANNAN, C. N.; CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, n. 2, p. 128–133, 2011.